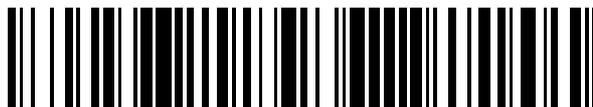


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 494 617**

21 Número de solicitud: 201300260

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A23L 3/3463 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

15.03.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

15.09.2014

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(50.0%)**

**Avda. de Séneca, 2
28040 Madrid ES y
BIONATURIS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GIBELLO PRIETO , Alicia ;
BLANCO GUTIÉRREZ , M^a Del Mar ;
RODRÍGUEZ GÓMEZ , Juan Miguel ;
CARDENAS CARDENAS , Nivia ;
FERNÁNDEZ-GARAYZABAL FERNÁNDEZ , José
Francisco ;
DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ , Lucas José ;
MALDONADO BARRAGÁN , Antonio ;
ASPIROZ SANCHO , M^a Carmen ;
DE LAS HERAS SÁNCHEZ , Ana Isabel ;
INFANTE VIÑOLO , Juan José y
INFANTE VIÑOLO , Víctor Manuel**

74 Agente/Representante:

PLUMET ORTEGA, Joaquín

54 Título: **Uso de la Garvicina A como producto antimicrobiano**

57 Resumen:

Uso de la Garvicina A como producto antimicrobiano.
La invención consiste en el uso de la Garvicina A como producto antimicrobiano la forma de obtención de la Garvicina A mediante aislamiento natural o de manera recombinante, así como la aplicación de formulaciones que comprenden Garvicina A como compuesto antimicrobiano de uso en salud animal, salud humana e industria alimentaria.

ES 2 494 617 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de la Garvicina A como producto antimicrobiano

SECTOR DE LA TÉCNICA:

La alta especificidad y gran actividad de la Garvicina A hace que esta bacteriocina tenga una utilización potencial, tanto en acuicultura como en la industria alimentaria, inhibiendo el crecimiento de cepas de *Lactococcus garvieae* (*L. garvieae*) patógenas para el hombre y/o los animales susceptibles.

En el caso de la acuicultura, la especificidad de la Garvicina A asegura que su utilización no afectaría a la microbiota intestinal de los peces, y que no interferiría con la actividad de las especies bacterianas utilizadas como probióticos como *Lactobacillus* spp., que se podrían aplicar de forma simultánea.

En el caso de los alimentos, la utilización de esta bacteriocina podría evitar la contaminación de los mismos con cepas patógenas de *L. garvieae*, que podrían estar implicadas en el desarrollo de casos clínicos en humanos, sin por ello inhibir el desarrollo de otras bacterias lácticas implicadas en las características organolépticas y en la elaboración de productos alimentarios.

ESTADO DE LA TÉCNICA:

La lactococosis de la trucha, cuyo agente etiológico es *L. garvieae*, es una enfermedad de gran importancia económica y sanitaria en la acuicultura de los países mediterráneos. España es uno de los principales países productores de trucha en la Unión Europea, ocupando el primer puesto en cuanto al nivel de producción y el quinto respecto a su valor (Informe APROMAR, 2008). La lactococosis afecta de forma significativa a esta producción, debido a la mortalidad inducida en la trucha (superior al 50%), la disminución de la tasa de crecimiento de los animales y la imposibilidad de comercializar los peces afectados (Vendrell *et al.*, 2006). Otras especies de peces afectadas por *L. garvieae* son la anguila, el seriola y el pez gato. Además, *L. garvieae* es capaz de infectar a otras especies animales y a humanos, y por ello es considerado un agente con potencial zoonótico. *L.*

garvieae es responsable de mastitis en ganado vacuno y búfalos (Teixeira *et al.*, 1996), y de procesos neumónicos en ganado porcino (Tejedor *et al.*, 2011). También se aísla frecuentemente de productos lácteos (quesos de fabricación artesanal), carne de cerdo y de pollo, y de verduras (Santos *et al.*, 2005; Kawanishi *et al.*, 2007, Foschino *et al.*, 2008). En el hombre, *L. garvieae* da lugar de forma esporádica a distintos procesos clínicos (Fefer *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 2007).

En la trucha, la lactococosis es una enfermedad septicémica generalizada que muestra una acusada estacionalidad. Está asociada a un aumento en la temperatura del agua, favorecida por deficiencias en la calidad del agua (Ghittino y Múzquiz, 1998, Vendrell *et al.*, 2006) y cursa con un alto porcentaje de mortalidad (50-80% de la producción). También es de señalar que *L. garvieae* puede permanecer durante largo tiempo en el agua sin perder viabilidad, contribuyendo de este modo al mantenimiento de la infección en las instalaciones y a su diseminación (Vendrell *et al.*, 2006). El tratamiento de esta enfermedad requiere la administración de antibióticos que resultan caros, difíciles de aplicar y en muchos casos son ineficaces debido a la aparición cada vez más frecuente de cepas de *L. garvieae* multirresistentes. En la actualidad, las medidas preventivas dirigidas contra la lactococosis en peces consisten en la utilización de vacunas y probióticos (Vendrell *et al.*, 2007 y 2008). Sin embargo, aunque la vacuna comercial resulta efectiva, es costosa económicamente y requiere medidas de manejo estresantes para los peces y complicadas en su aplicación. Por otra parte, aunque los probióticos estimulan la respuesta inmune de los peces, no se ha demostrado que sean totalmente efectivos frente a la infección por *L. garvieae*.

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados por diversas bacterias, y que presentan la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias similares o de cepas de la misma especie de la bacteria productora. En la actualidad, la nisina, una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*, es empleada como conservante en la industria alimentaria (Delves-Broughton, 1990), en especial en la prevención de las posibles alteraciones del queso y de diversas carnes (tanto crudas como pre-cocinadas), mostrando efectividad

frente a varias bacterias Gram positivas, como *Clostridium* spp., *Listeria monocytogenes* y diversas bacterias lácticas.

Hasta el momento sólo se han descrito tres bacteriocinas producidas por *L. garvieae*: Garviecin L1-5 (Villani *et al.*, 2001), Garvicin ML (Borrero *et al.*, 2011) y Garvieacin Q (Tosukhowong *et al.*, 2012). Todas estas bacteriocinas inhiben, en mayor o menor medida, el crecimiento tanto de *L. garvieae* como de otras bacterias Gram positivas, como *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Pediococcus* spp, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sakei*, *Propionibacterium* spp., *Clostridium* spp., *Streptococcus pneumoniae* y *Lactococcus lactis*.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION:

Usode la Garvicina A como producto antimicrobiano.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un producto que contiene al menos, un péptido llamado Garvicina A, que tiene actividad antimicrobiana y que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO:1, teniendo en cuenta que los aminoácidos que componen el péptido se seleccionan independientemente de los isómeros D o L.

Así mismo, la invención incluye formulaciones que incluyen fragmentos de dicho péptido de, al menos, 22 aminoácidos y sus derivados que presentan al menos un 55% de identidad con los aminoácidos de la secuencia descrita en SEQ ID NO:1, comprenden al menos una glicosilación, una amidación, una acilación, una acetilación, una metilación, o llevan un grupo protector, presentando dichos fragmentos y derivados una actividad antimicrobiana

Otro aspecto de la invención se refiere a un producto que contiene un polipéptido que comprende un péptido definido en los dos párrafos anteriores.

Otro aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido o un polipéptido según se han descrito en los párrafos anteriores. También se refiere a una construcción de ácido nucleico que codifica un péptido o polipéptido de los descritos aquí, en la que el ácido nucleico está enlazado a una o más secuencias control que

dirigen la producción de dichos péptidos en un hospedador adecuado, e incluye , así mismo, vectores de expresión recombinante, células u organismos hospedadores que comprenden dicha construcción de ácidos nucleicos.

5 La invención también se refiere a un método para producir uno de los péptidos o polipéptidos de la invención, que comprende: cultivar células u organismos hospedadores recombinantes o células de cualquiera de las cepas descritas en la invención bajo condiciones adecuadas para la producción del péptido o polipéptido; recolectar dichas células u organismos o
10 tomar una muestra del medio de cultivo de las células o del cuerpo del organismo y, si procede; preparar un extracto crudo o extracto clarificado homogeneizado; y, si procede, enriquecer el nivel de pureza del péptido o polipéptido en el extracto homogeneizado o extracto crudo; y, si procede, añadir una o varias sustancias que modifiquen las propiedades fisicoquímicas
15 de la formulación final. Entre las células y organismos hospedadores que se pueden utilizar en dicho método, se encuentran las células de insectos, larvas de insectos o insectos en estado pupa.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de dicha composición como bactericida o bacteriostático para aplicaciones en la industria alimentaria,
20 especialmente en alimentación animal, y/o como agente profiláctico y/o terapéutico en acuicultura o en otra producción ganadera, frente a enfermedades infecciosas producidas por *Lactococcus garvieae*, otras lactococcosis u otras enfermedades.

Como consecuencia de la secuenciación de una cepa de *L. garvieae* en
25 nuestro laboratorio (Aguado-Urda et al., 2011), se han caracterizado a nivel molecular las secuencias de ADN de los cinco plásmidos que forman el genoma completo de la cepa 21881 de *L. garvieae* (Aguado-Urda et al., 2012). La cepa 21881 de *L. garvieae* ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Campus de
30 Burjassot, Edificio de Investigación, 46100 Burjassot (Valencia) donde le ha sido asignado el número de depósito CECT8279. El análisis de los posibles ORFs correspondientes a los plásmidos pGL1 (4.536 bp), pGL2 (4.572 bp) y

pGL5 (68.798 bp), muestra la existencia de genes que podrían codificar tres posibles bacteriocinas (Figura 1). En el plásmido pGL1, el gen *orf3* codificaría potencialmente una proteína de 72 aminoácidos (aa) que es idéntica en un 57% a una posible bacteriocina de *Streptococcus pyogenes* y en un 46% a una posible bacteriocina de *Enterococcus faecalis*. En el plásmido pGL2, el gen *orf1* podría codificar una bacteriocina de 71 aa, idéntica en un 57% a una posible bacteriocina de *Streptococcus mitis* y cuya secuencia líder es 70% idéntica a la de la Garvieacina Q (Tosukhowong *et al.*, 2012). Separados por 2 nucleótidos, anexo al gen *orf1* de pGL2 se localiza el gen *entI* que parece codificar una proteína de 97 aa involucrada, aparentemente, en la inmunidad frente a la acción bactericida que podría tener *orf1*. De hecho, *entI* presenta el dominio estructural correspondiente al de la familia "Enterocin A Immunity" (pfam 08951). Por último, en el plásmido pGL5, el gen *orf37* parece codificar una proteína de 63 aa que, aunque no presenta ninguna homología significativa con ninguna bacteriocina descrita, podría tener actividad antimicrobiana al estar formando parte de un operón junto a otros tres genes presentes en pGL5 (denominados *IgnCDI*), que presentan una gran identidad (57-74%) con las proteínas implicadas en la inmunidad (*IgnI*) y en el procesamiento y secreción (*IgnD*, *IgnC*), de la lactococina A (Stoddard *et al.*, 1992).

Con el fin de esclarecer qué bacteriocinas produce esta cepa de *L. garvieae*, se ha llevado a cabo la purificación de la/s proteína/s con actividad bacteriocina. A partir de cultivos de 5 litros de *L. garvieae* 21881 crecido en medio MRS ($DO_{600nm} = 3.0$) a 30°C, se procedió a la eliminación de las células bacterianas por centrifugación (10.000 rpm, 10 min) y a la filtración del sobrenadante por membranas de 0,2 micras. La mitad del sobrenadante se ajustó con NaOH hasta pH 6,15 y la otra mitad se dejó al pH del cultivo (pH 4,87). Los sobrenadantes se mantuvieron congelados a -20°C, hasta su posterior utilización en ensayos de actividad microbica en placa, por la técnica de difusión en agar, frente a diferentes especies de bacterias. De este modo, se estableció que los sobrenadantes de *L. garvieae* 21881 presentaban actividad microbica frente a *L. garvieae* exclusivamente (Tabla

1 y Figura 2a y 2b). Así mismo, a partir de los sobrenadantes de la cepa 21881 de *L. garvieae* crecida en medio MRS, se ha procedido a la purificación de la/s proteína/s con actividad bacteriocina mediante FPLC. El sobrenadante se mezcló con Amberlite XAD-16 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), a razón de
5 20 g por litro durante dos horas. Seguidamente, la matriz se lavó con 250 ml de agua destilada y 187,5 ml de etanol al 40% (v/v) en agua, y la fracción con actividad bacteriocina se eluyó con 500 ml de 2-propanol al 70% (v/v) en agua destilada (pH 2,0). El eluido fue posteriormente pasado por una columna de intercambio catiónico (SP-SepharoseFastFlow) e interacción hidrofóbica
10 (Octyl-Sepharose CL-4B), siguiendo el protocolo de Maldonado *et al.* (2003). El eluido con actividad bacteriocina se aplicó a una columna Resource RPC 3-ml de cromatografía en fase reversa acoplada a un sistema de cromatografía líquida Fast-system, eluyendo la bacteriocina con un gradiente lineal de 2-propanol en 0,1% de ácido trifluoroacético en agua (v/v).

15 Las fracciones eluidas en las diferentes etapas de purificación se analizaron en geles PAGE y en ensayos biológicos de actividad microbiciada (Figura 2a), utilizando cepas como indicadoras:

* *L. garvieae* 8831: aislada en nuestro laboratorio a partir de un brote agudo de lactococosis en trucha arcoíris en España en 2004.

20 * *L. garvieae* 4976: aislada en nuestro laboratorio a partir de un brote de alta mortalidad en anguila europea en 2006.

* *L. garvieae* 3AA7: aislada de queso Cabrales.

* *L. garvieae* Lg80: aislada de morcilla de Burgos en España (Santos *et al.*, 2005).

25 Además, las fracciones que contenían la bacteriocina purificada (Figura 5) se analizaron por MALDI-TOF-TOF (tiempo-de-vuelo-desorción/ionización láser asistida-por-una-matriz) (Figura 4) y de este modo, se ha podido establecer que la única bacteriocina secretada al medio de cultivo por la cepa *L. garvieae* 21881 es la codificada por el gen *orf37* del plásmido pGL5. Además,
30 la eliminación del plásmido pGL5 de la cepa *L. garvieae* 21881, mediante

dosis altas de novobiocina (0,125-8 µg/ml) en el medio de cultivo, según el protocolo de Ruiz-Barba y colaboradores (1991), condujo a la pérdida de la producción de la bacteriocina, confirmando la localización del gen responsable de su síntesis en dicho plásmido. Esta nueva bacteriocina se ha
5 denominado “**Garvicina A**”.

Tal y como se muestra en la Tabla 1, los estudios de la actividad antimicrobiana de la Garvicina A mediante ensayos de actividad microbicida en placa multipocillo, junto con la técnica de difusión en agar, demuestran que esta bacteriocina tiene un espectro de inhibición muy específico, siendo activa
10 exclusivamente frente a otras cepas de *L. garvieae*. Además, los ensayos de dilución de la actividad microbicida sobre la cepa indicadora *L. garvieae* 8831, muestran que la Garvicina A es más activa que otras bacteriocinas estudiadas, siendo activa a diluciones 1/512 y reteniendo el 42% de su actividad a pH 6,15 tras un tratamiento de 5 minutos a 121°C. La actividad
15 permanece durante períodos prolongados a temperatura ambiente, refrigeración o congelación a -20°C.

Por otro lado, los genes del operon *IgnAICD* se han clonado detrás del promotor constitutivo P59 de *Lactococcus lactis*, carente de su promotor original pero incluyendo el RBS (Figura 3). La fusión P59:*IgnAICD* se introdujo
20 en el vector pIL252 de bajo número de copias (6-9 copias), y el plásmido recombinante se introdujo por electroporación en la cepa *Lactococcus lactis* MG1363. La utilización del plásmido pIL252 que es un plásmido natural de bajo número de copias, estable y no “autotransmisible”, así como la utilización de la cepa *L. lactis* MG1363, que está considerada como una cepa “segura”
25 (GRAS), permite la purificación de la bacteriocina en fermentadores a partir de medios de cultivo asequibles.

En la actualidad, las medidas preventivas dirigidas contra la lactococosis en peces consisten en la utilización de vacunas y probióticos. Sin embargo, aunque la vacuna comercial resulta efectiva, es costosa económicamente,
30 requiere medidas de manejo estresantes para los peces y su aplicación es complicada, ya que debe realizarse por inyección intraperitoneal. Por otra parte, los probióticos, aunque estimulan la respuesta inmune de los peces, no

se han demostrado totalmente efectivos frente a la infección por *L. garvieae*. En el caso de la acuicultura, la especificidad de la Garvicina A permitiría eliminar la infección por las cepas de *L. garvieae* responsables de lactococosis. Además, la especificidad de la Garvicina A asegura que su
 5 utilización no afectaría a la microbiota intestinal de los peces, y que no interferiría con la actividad de los probióticos que se podrían aplicar de forma simultánea.

Por otra parte, *L. garvieae* es una bacteria que se aísla en diferentes especies animales y también en humanos, siendo la posible fuente de infección en
 10 estos casos, la ingestión de alimentos en los que se ha detectado esta bacteria: pescado, productos lácteos (quesos de fabricación artesanal), carne de cerdo y de pollo y verduras. En el caso de los alimentos, la utilización de esta bacteriocina podría evitar la contaminación de los mismos con cepas patógenas de *L. garvieae*, que podrían estar implicadas en el desarrollo de
 15 casos clínicos en humanos, sin por ello inhibir el desarrollo de otras bacterias lácticas implicadas en las características organolépticas y en la elaboración de los alimentos.

Por último, se ha estudiado el efecto a nivel fisiológico de Garvicina A sobre las cepas indicadoras mediante microscopía electrónica de transmisión
 20 (TAM). La Figura 5 muestra que esta bacteriocina parece afectar a la formación del septo durante la división celular, obteniéndose células anormalmente alargadas y no viables (Figura 5B). Este efecto es similar al de la bacteriocina Lcn972 de *L. lactis* IPLA972 (Martínez *et al.*, 1999 y 2000).

Las secuencias de los genes que forman el operón *IgnAICD* están
 25 depositadas en la base de datos del EMBL, donde se describe únicamente la caracterización molecular de los plásmidos, incluido pGL5 con el acceso numérico HE651326. La secuencia aminoacídica de la Garvicina A purificada en la actualidad es la siguiente:

MENNNYTVLSDEELQKIDGGIGGALGNALNGLGTWANMMNGGGFVNQWQ
 30 VYANKGKINQYRPY, siendo el pre-péptido la secuencia subrayada. La Garvicina A no se produce en cultivos de *L. garvieae* 21881 crecidos en el medio de Luria Bertani (LB). Se desconoce en la actualidad qué cambios

post-traduccionales sufre la proteína activa en el medio de cultivo. El peso molecular (P.M.) de la Garvicina A se ha determinado experimentalmente por MALDI-TOF MS (espectrometría en masa tiempo-de-vuelo-desorción/ionización láser asistida-por-una-matriz) en 4.678,59 Da y difiere en 5 33 Da del P.M. teórico de la secuencia de la proteína, lo que podría deberse a una oxidación post-traducciona l de la Garvicina A en dos residuos de Metionina.

Tal y como se observa en la Figura 2b, la Garvicina A es eficaz tras cinco minutos de aplicación en cultivos bacterianos, y su eficacia es mayor en 10 cultivos en mitad de fase logarítmica que en fase estacionaria. Estos resultados, junto con los obtenidos del estudio de microscopía electrónica, indican que la bacteriocina afecta a la división celular de la bacteria (Figura 5). Por tanto, podría evitar la multiplicación de la bacteria tanto en los alimentos como en los tejidos del animal.

15 En definitiva, la presente invención propone la utilización de la nueva bacteriocina descrita, Garvicina A, en acuicultura o en la producción de alimentos en los que se requiera la inhibición específica de cepas patógenas de *L. garvieae*. La Garvicina A presenta una gran actividad bactericida que se mantiene durante varios meses tanto en refrigeración como en congelación, y 20 se mantiene estable tras un tratamiento de 50°C durante 10 min. A diferencia del resto de las bacteriocinas descritas hasta el momento producidas por *L. garvieae*, y a diferencia de los antibióticos permitidos en acuicultura, la actividad bactericida de la Garvicina A afecta únicamente a otras cepas de *L. garvieae*. Las características de actividad y especificidad de la nueva 25 bacteriocina (Garvicina A) suponen una ventaja considerable para su utilización en sistemas biológicos en los que se requiera específicamente la inhibición de crecimiento de *L. garvieae*, ya que no inhibe ni las cepas bacterianas utilizadas como probióticos en acuicultura, ni otras bacterias lácticas utilizadas en fermentaciones industriales para la obtención de 30 alimentos.

Tabla 1: Actividad inhibitoria del sobrenadante de un cultivo de *L. garvieae* 21881, a 30°C evaluada mediante la técnica de difusión en agar.

Indicadores	Diámetro del halo de inhibición (cm)	
	pH 4,85	pH 6
<i>Enterococcus faecalis</i> TAB 28	—	—
<i>Enterococcus faecium</i> P21	—	—
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	—	—
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT934	—	—
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 935	—	—
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CECT231	—	—
<i>Lactococcus lactis lactis</i> MG16 14	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 86	—	—
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CECT231	—	—
<i>Lactobacillus delbruecki</i> iCECT282	—	—
<i>Lactococcus lactis lactis</i> IL1403	—	—
<i>Lactococcus lactis cremoris</i> CECT697	—	—
<i>Lactococcus garvieae</i> 8831	2,1	2,2
<i>Lactococcus garvieae</i> DK-25	1,3	1,5
<i>Lactococcus garvieae</i> 306/79	1,4	1,3
<i>Lactococcus garvieae</i> 1205	1,6	1,6
<i>Lactococcus garvieae</i> Lg80	1,5	1,4
<i>Lactococcus garvieae</i> 4AB5	1,6	1,5
<i>Lactococcus garvieae</i> BM06/00349	1,5	1,4
<i>Lactococcus garvieae</i> 148/03	1,5	1,5
<i>Lactococcus garvieae</i> CP-1	2	1,8
<i>Lactococcus garvieae</i> 3AA7	1,9	1,8
<i>Lactococcus garvieae</i> T1-1	1,6	1,6
<i>Lactococcus garvieae</i> 201	1,6	1,6
<i>Lactococcus garvieae</i> 1204	1,8	1,8

<i>Lactococcus garvieae</i> T2-17	1,6	1,6
<i>Lactococcus garvieae</i> CAS-2	1,5	1,6
<i>Lactococcus garvieae</i> 4977	2	2
<i>Streptococcus bovis</i> DSM12643	—	—
<i>Streptococcus uberis</i> DSM20569	—	—
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> DSM20662	—	—
<i>Streptococcus oralis</i> CECT 907	—	—
<i>Streptococcus pyogenes</i> CECT191	—	—
<i>Streptococcus lactaris</i> DSM23027	—	—
<i>Streptococcus salivarius</i> CECT 803	—	—
<i>Pediococcus acidilactici</i> CECT98	—	—
<i>Escherichia coli</i> O57:H7	—	—
<i>Bordetella pertusis</i> NCTC8616	—	—

Bibliografía:

Aguado-UrdaM, López-Campos GH, Blanco MM, Fernández-Garayzábal JF, Cutuli MT, et al. (2011) Genome sequence of *Lactococcus garvieae* 21881, isolated from a case of human septicaemia. *J. Bacteriol.* 193:4033-4034.

eIAlami N, **Boquien CY**, **Corrieu G.**(1992). Batch cultures of recombinant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in a stirred fermentor. I. Effect of plasmid content on bacterial growth and on genetic stability in pure cultures. *Appl Microbiol Biotechnol.* 37:358-63.

Apromar (2008). [La Acuicultura Marina de Peces en España. www.apromar.es/Informes/Informe%20APROMAR%202008.pdf](http://www.apromar.es/Informes/Informe%20APROMAR%202008.pdf)

Borrero, J, Brede, DA, Skaugen M, Diep DB, Herranz C, Nes IF, Cintas LM, Hernández, P.E. (2011). Characterization of Garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 369-373.

- Delves-Broughton, J.** (1990). Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 44: 100-117.
- Fefer JJ, Ratzan KR, Sharp SE, Saiz E.** (1998). *Lactococcus garvieae* endocarditis: report of a case and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 32: 127-30.
- Foschino R, Nucera D, Volponi G, Picozzi C, Ortoffi M, Bottero MT.** (2008) Comparison of *Lactococcus garvieae* strains isolated in northern Italy from dairy products and fishes through molecular typing. *J Appl Microbiol* 105:652-662
- Ghittino C, Múzquiz, JL.** 1998. La estreptococosis de la trucha arco iris en España. Reunión de Piscicultores. Zaragoza. *Rev. Aquatic* 1998, 2.
- Kawanishi M, Yoshida T, Kijima M, Yagyu K, Nakai T, et al.** (2007) Characterization of *Lactococcus garvieae* isolated from radish and broccoli sprouts that exhibited a KG+ phenotype, lack of virulence and absence of a capsule. *Lett Appl Microbiol* 44: 481–487.
- Maldonado A, Ruiz-Barba JL, Jiménez-Díaz R.** 2003. Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel co-culture inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:383-389.
- Martínez B, Suárez J, Rodríguez A.** (1999). Lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiology* 145: 3155-61.
- Martínez B, Rodríguez A, Suárez, J.E.** (2000). Lactococcin 972, a bacteriocin that inhibits septum formation in lactococci. *Microbiology* 146: 949-955.
- Ruiz-Barba JL, Piard JC, Jimenez-Díaz R.** (1991). Plasmid profiles and curing of plasmids in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 71: 417-421
- Santos EM, Jaime I, Rovira J, Lyhs U, Korkeala H, et al.** (2005) Characterization and identification of lactic acid bacteria in “morcilla de Burgos”. *Int J Food Microbiol* 97:285-296.

- Stoddard, GW**, Petzel,JP, van Belkum, MJ, Kok, J and McKay, LL (1992). Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis biova rdiacetylactis* WM4. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1952-1961
- 5 **Teixeira LM**, Merquior VL, Vianni MC, Carvalho MG, Fracalanza SE, et al. (1996) Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *Int J Syst Bacteriol.* **46**: 664-668.
- 10 **Tejedor JL**, Vela AI, Gibello A, Casamayor A, Domínguez L and Fernández-Garayzábal JF (2011) A genetic comparison of pig, cow and trout isolates of *Lactococcus garvieae* by PFGE analysis. *Lett Appl Microbiol* **53**: 614-619.
- Tosukhowong A**, Zendo T, Visessanguan W, Roytrakul S, Pumpuang L, Jaresitthikunchai J, and Sonomoto K. (2012) Garvieacin Q, a novel class II bacteriocin from *Lactococcus garvieae* BCC 43578. Appl Environ Microbiol.**78**: 1619-1623.
- 15 **Vendrell D**, Balcázar JL, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Gironés O, Múzquiz JL. (2006) *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **29**: 177–198.
- 20 **Vendrell D**, Balcázar JL, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Gironés O, Múzquiz JL. (2007). Safety and efficacy of an inactivated vaccine against *Lactococcus garvieae* in rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). *Prev Vet Med.* **80**: 222-229.
- Vendrell D**, Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Gironés O, Luis Múzquiz J. (2008) Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria.*Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* **31**: 337-45.
- 25 **Villani, F.**, Aponte, M, Blaiotta G, Mauriello, G, Pepe, O., Moscheti G. (2001). Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 430-439.
- 30

Wang CY, Shie HS, Chen SC, Huang JP, Hsieh IC, et al. (2007) *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. Int. J. Clin. Pract. 61: 68–73.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Esquema de los plásmidos con genes potencialmente implicados en la producción de bacteriocinas.

5

Figura 2: Efecto del sobrenadante del cultivo de *L. garvieae* 21881 sobre la cepa indicadora *L. garvieae* 8831 en a) ensayos de actividad microbicida en placa por la técnica de difusión en agar y b) en distintos estadios de la curva de crecimiento.

10

Figura 3: Clonación del operón *IgnAICD* detrás del promotor fuerte constitutivo P59 de *L. lactis* en pIL252. RBS: sitio de unión del ribosoma; T: terminador de transcripción.

15

Figura 4: Resultados del análisis por MALDI_TOF_TOF de las fracciones que contenían la bacteriocina purificada. En todas las muestras, después de la digestión con tripsina se obtenían péptidos correspondientes a la proteína Orf37 de pGL5.

20

Figura 5: Gel SDS-PAGE de la Garvicina A purificada y de su actividad biológica.

25

Figura 6: A la izquierda se muestra un cultivo de *L. garvieae* 8831 antes del tratamiento con Garvicina A (A) y a la derecha el mismo tras la acción de la bacteriocina durante una hora (B).

Figura 7: Peces correspondientes a las infecciones experimentales con *L. garvieae* 8831 (A) y *L. garvieae* 22 (B)

30

Figura 8: Gráfica que muestra la inhibición del crecimiento producida por la Garvicina A sobre una cepa indicadora (*L. garvieae* Pw 1537) adicionada a leche estéril comercial.

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION:

La purificación de la bacteriocina, denominada Garvicina A, se puede realizar mediante las siguientes metodologías:

5 1) A partir de la cepa productora, *L. garvieae* 21881, portadora del plásmido pGL5 que contiene el operón *IgnAICD*, crecida a una rango de temperaturas entre 18°C y 37°C (los genes del operón se sobreexpresan a 37°C), en medio MRS durante 12 horas con o sin agitación. Tras el crecimiento bacteriano, se procederá a la eliminación de las células por centrifugación (10.000 rpm,
10 10min) y a la filtración del sobrenadante por membranas de 0,2 micras. A partir de estos sobrenadantes la Garvicina A se purificará mediante FPLC, de la siguiente manera:

a) Columna de Amberlita XAD-16 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y elución con 70% (vol/vol) 2-propanol en agua destilada (pH 2,0).

15 b) Columnas de Intercambio catiónico (SP-SepharoseFastFlow) e interacción hidrofóbica (Octyl-Sepharose CL-4B) (Maldonado et al., 2003).

c) Columna de cromatografía de fase reversa (GE Healthcare) acoplada a un sistema FPLC, con gradiente de elución lineal con una solución acuosa de 2-propanol (Merck) y 0.1% (vol/vol) de ácido trifluoroacético.

20

2) A partir de cepas recombinantes, transformadas con un plásmido en el que se introduzcan los genes del operón *IgnAICD* bajo la expresión de un promotor de expresión. En ese caso, el medio de cultivo empleado podrá ser un medio de cultivo económico con glucosa, sacarosa y fuente de nitrógeno
25 apropiada. El proceso de purificación por FPLC será semejante al descrito anteriormente.

Adicionalmente, se contempla la utilización de las cepas recombinantes de *L. lactis* adicionadas al suero de leche o al pienso de los animales, durante los procesos de fabricación de los mismos (procesos pre-fermentativos y
30 procesos térmicos).

3) A partir de la clonación y expresión en cualquier otro sistema biológico que pueda añadirse de forma inocua a piensos de peces, agua o alimentos en proceso de fabricación.

5 **APLICACIÓN INDUSTRIAL:**

La aplicación industrial de la Garvicina A como antimicrobiano deriva de sus características (ver apartado de la explicación de la invención) y la posible utilización tanto de Garvicina A purificada como del operón *IgnAICD* en otros sistemas biológicos, en cualquiera de sus posibles aplicaciones, tanto en la
10 producción animal como en la industria alimentaria.

A) APLICACIÓN EN ACUICULTURA:

Para valorar la aplicación industrial de la Garvicina A en acuicultura, se estudió la producción de la misma en cultivos bacterianos incubados a 18°C,
15 y en diferentes estadios de crecimiento, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 2: Sobrenadante de *L. garvieae* 21881 crecido a 18°C (DO 0,3). Las placas de medio MRS con el indicador se incuban a 32 °C durante 24 horas.

20

indicadores	Actividad inhibitoria (mm)	
	pH 4,85	pH 6,13
<i>L.garvieae</i> Pw 1537	16	14
<i>.L.garvieae</i> 8831	15	15
<i>L.garvieae</i> 2182-81	15	14

Tabla 3: Sobrenadante de *L. garvieae* 21881 crecido a 18°C (DO 1,7). Las placas de medio MRS con el indicador se incuban a 32°C en las mismas
25 condiciones.

Actividad inhibitoria (mm)

indicadores	pH 4,85	pH 6,13
<i>L. garvieae</i> Pw 1537	20	21
<i>L. garvieae</i> 8831	18	19
<i>L. garvieae</i> 2182-81	21	21

Estos resultados muestran que la Garvicina A se sintetiza también a 18°C, desde el comienzo de la fase logarítmica hasta la fase estacionaria de crecimiento bacteriano.

- 5 Así mismo, y con el fin de valorar su utilización en ensayos experimentales de infección en peces, se estudió la actividad de la Garvicina A obtenida de cultivos bacterianos a 30°C y a 18°C, temperatura normalmente asociada con los brotes de lactococosis en truchas. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

10

Tabla 4: Sobrenadante de *L. garvieae* 21881 crecido a 30 °C. Las placas de MRS con el indicador se incuban a 18°C

indicadores	Actividad inhibitoria (mm)	
	pH 4,85	pH 6,13
<i>L. garvieae</i> Pw 1537	25	25
<i>L. garvieae</i> 8831	26	25
<i>L. garvieae</i> 2182-81	25	23

- 15 Si comparamos estos datos con los mostrados en las Tablas 2 y 3, y con los de la Tabla 1 para las mismas cepas, observamos que la Garvicina A presenta una mayor actividad inhibitoria sobre otras cepas de *L. garvieae*, a 18°C. Este hecho propicia su posible utilidad como método preventivo de lactococosis en peces.

- 20 Con el fin de valorar la utilización del pez cebra (*Dario rerio*) como modelo de infección de *L. garvieae* en peces, se eligieron cuatro cepas bacterianas de diferente origen clínico, en los ensayos de "desafío":

- *L. garvieae* CP1: aislada de un brote de lactococosis en trucha en 1991

- *L. garvieae* 8831: aislada de un brote de lactococosis en trucha en 2004
- *L. garvieae* Lg22: aislada de un brote de lactococosis en seriola.
- *L. garvieae* 4976: aislada de un brote de lactococosis en anguila europea.

5 Se utilizaron diez acuarios de 1,5 litros de agua en los que se repartieron 5 peces por acuario, de aproximadamente 2-4 cm de longitud. Por cada grupo de infección y grupo control se utilizaron dos acuarios, realizando de este modo el ensayo por duplicado. Las cepas de *L. garvieae* patógenas se incubaron en medio MRS hasta una concentración de 10^9 UFC/ml. De cada
10 cultivo se realizaron diluciones 1/4 y de éstas, se tomaron 20 microlitros para inyectar a cada pez. Para las inyecciones intraperitoneales se emplearon jeringas estériles UI-1 ml (G29X1/2") con aguja incorporada.

Para la infección y el sacrificio, los animales fueron previamente anestesiados con Metansulfonato de tricaina o MS-222 en baño, a una dosis de 50 mg /L.

15 En el acuario utilizado como control, los animales fueron inoculados con 20 microlitros de medio MRS estéril. Tras la inoculación, se hizo el seguimiento de los animales, y se registraron las mortalidades. A de los animales muertos se realizaron necropsias para análisis microbiológico e histológico. Para el análisis histológico los animales fueron introducidos en una solución de
20 formaldehído al 10% en tampón fosfato sódico 80 mM, pH 6,7. A la finalización del experimento, los animales de acuario control fueron sacrificados y procesados para análisis microbiológico e histológico.

A las 48 horas post-infección, las mortalidades registradas fueron las siguientes:

- 25
- Infección con *L. garvieae* CP1: 40% de animales muertos. El análisis microbiológico de los peces muestra el aislamiento de una bacteria de perfil bioquímico (API Rapid ID32 Strep): 30223111130, correspondiente a la misma cepa de *L. garvieae* (99,8% identificación de especie).
- 30
- Infección con *L. garvieae* 8831: 66% de animales muertos. El análisis microbiológico de los peces muestra el aislamiento de una bacteria de perfil bioquímico (API Rapid ID32 Strep): 30223101131,

correspondiente a la misma cepa de *L. garvieae* (99,9% identificación de especie).

- Infección con *L. garvieae* Lg22: 75% de animales muertos. El análisis microbiológico de los peces muestra el aislamiento de una bacteria de perfil bioquímico (API Rapid ID32 Strep): 30223001010, correspondiente a la misma cepa de *L. garvieae* (99,6% identificación de especie).
- Infección con *L. garvieae* 4976: 73% de animales muertos. El análisis microbiológico de los peces muestra el aislamiento de una bacteria de perfil bioquímico (API Rapid ID32 Strep): 30223001010, correspondiente a la misma cepa de *L. garvieae* (99,6% identificación de especie)

En la mayoría de los animales muertos se observaron hemorragias externas, ascitis, exoftalmos y, en ocasiones, hemorragias oculares (Figuras 7A y B). Las lesiones histológicas detectadas en los animales infectados fueron significativas.

En ninguno de los animales del acuario control se aisló *L. garvieae*, siendo las bacterias aisladas identificadas como enterobacterias, *Aeromonas* spp. y *Enterococcus faecalis*.

La aplicación de la Garvicina A en acuicultura deriva de los experimentos de actividad biológica realizados *in vitro* y de los resultados de protección obtenidos en los experimentos de infección *in vivo* en pez cebra, realizados por inyección intraperitoneal con la cepa *L. garvieae* 8831 y la bacteriocina purificada. En los ensayos en los que se ensayó la protección proporcionada por la bacteriocina purificada en peces cebra se procedió de la siguiente manera:

1.- Se utilizaron 10 acuarios de 1,5 litros de agua en los que se repartieron 6-8 peces por acuario, de 2-4 cm de longitud. Los peces se mantuvieron a temperatura ambiente durante todo el ensayo

2.- Los peces de los acuarios 1, 2 y 3 se inocularon intraperitonealmente, con 10^8 UFC/pez de la cepa de *L. garvieae* elegida (cepa 8831) a la que se añadió una dilución 1/10 de Garvicina A purificada

(equivalente a 200UA/ml). En los acuarios 4 y 5, los animales se inyectaron con MRS estéril y Garvicina A, como control.

3. Los peces de los acuarios 6 y 7 sirvieron como control de infección. Se realizó la inoculación con la cepa *L.garvieae* 883 a una concentración 10⁸ UFC/pez por inyección intraperitoneal.

4. Los animales se mantuvieron en condiciones óptimas de alimentación y ambiente, y se observaron diariamente durante 4 días.

A las 96 horas post-infección las mortalidades registradas fueron las siguientes:

- Infección con *L. garvieae*8831: **53%** de mortalidad. El análisis microbiológico de los peces muestra el aislamiento de una bacteria de perfil bioquímico (API Rapid ID32 Strep): 30323101131, correspondiente a la misma cepa *L. garvieae* 8831 (99, 9% identificación de especie).
- Infección con *L. garvieae* 8831 y Garvicina A: 0% de mortalidad. En el análisis microbiológico más del 70% de los animales fueron negativos para el aislamiento de *L. garvieae*. En los animales restantes (29%), se aisló *L. garvieae* en cantidad inferior a la de la dosis infectiva.

Conclusión: La mortalidad en el control de infección fue mayor del 50%. El porcentaje relativo de supervivencia en los peces inoculados con *L. garvieae* junto con Garvicina A fue del 100%, con una reducción del patógeno superior al 70%.

B) APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA:

Para valorar la aplicación industrial de la Garvicina A en la industria alimentaria, se estudió la inhibición del crecimiento de una cepa indicadora (*L. garvieae* Pw 1537) adicionada a una concentración de 10⁸ UFC/ml de leche estéril comercial. A la muestra de leche una vez inoculada, se le adicionó 200 UA/ml de Garvicina A y se incubó a 30° C durante 6 horas. A diferentes

tiempos (15 min, 30 min, 1 hora, 2 horas y 4 horas) se recogieron muestras de 1 ml de leche para realizar recuentos de *L. garvieae* en placas de medio selectivo Columbia sangre/ nalidíxico/colistina (BioMérieux). Los resultados se muestran en la figura 8.

- 5 Tal y como se observa, a los cinco minutos y durante dos horas de incubación, la Garvicina A, a las concentraciones ensayadas, fue capaz de eliminar casi por completo la presencia de *L. garvieae* y de inhibir el crecimiento de este microorganismo en leche.

REIVINDICACIONES

- 1.- Uso de la Garvicina A, que consiste en la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO:1, en el que los aminoácidos que componen el péptido se seleccionan independientemente de los isómeros D o L., para preparar una composición con propiedades antimicrobianas.
- 2.- Composición antimicrobiana que incluye como principio activo Garvicina A o fragmentos de al menos 22 aminoácidos de su secuencia descrita en SEQ ID NO:1 y sus derivados, caracterizados porque presentan al menos un 55% de identidad con los aminoácidos de la secuencia descrita en SEQ ID NO:1, comprenden al menos una glicosilación, una amidación, una acilación, una acetilación, una metilación, o llevan un grupo protector, presentando dichos fragmentos y derivados una actividad antimicrobiana.
- 3.- Una composición antimicrobiana de acuerdo con la reivindicación 2 donde los péptidos o polipéptidos se obtienen de manera recombinante.
- 4.- Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 2 y 3 que comprende una célula u organismo hospedador recombinante capaz de producir la Garvicina A de secuencia ID NO:1.
- 5.- Una composición antimicrobiana de acuerdo a la reivindicación 4 comprendiendo la cepa *L. garvieae* de forma natural y/o la cepa *L. lactis* en forma transformada, con cualquiera de los genes del operón *Ign AICD*.
- 6.- Un proceso para la producción de Garvicina A de secuencia ID NO:1 o fragmentos de al menos 22 aminoácidos de su secuencia descrita en SEQ ID NO:1 y sus derivados que comprende: cultivar células u organismos hospedadores recombinantes, bajo condiciones adecuadas para la producción del péptido o polipéptido; recolectar dichas células u organismos o tomar una muestra del medio de cultivo de las células o del cuerpo del organismo y, si procede, preparar un extracto crudo o extracto clarificado homogeneizado; y, si procede, enriquecer el nivel de pureza del péptido o polipéptido en el extracto homogeneizado o extracto crudo; y, si procede,

añadir una o varias sustancias que modifiquen las propiedades fisicoquímicas de la formulación final.

7.- El proceso, de acuerdo con la reivindicación 6, donde las células hospedadoras u organismos hospedadores son células de insectos, larvas de insectos o insectos en estado pupa.

8- Un proceso para la producción de una composición antimicrobiana de acuerdo a las reivindicaciones 2-5, donde los péptidos o polipéptidos definidos se obtienen a través de un proceso fermentativo por el cultivo de cepas *L. garvieae* de forma natural y/o *L. lactis* de forma transformada con cualquiera de los genes del operón *Ign A/ICD*, bajo las condiciones adecuadas para la producción de la Garvicina A o de la composición antimicrobiana.

9.- El uso de la Garvicina A o de la composición antimicrobiana de las reivindicaciones 2-5 para la producción de un producto que tiene actividad bactericida o bacteriostática.

10.- El uso de la Garvicina A o de la composición antimicrobiana de las reivindicaciones 2-5 como agente bactericida o bacteriostático de aplicación en la industria alimentaria.

11.- El uso de la Garvicina A o de la composición antimicrobiana de las reivindicaciones 2-5 para la producción de un producto antimicrobiano como agente profiláctico y/o terapéutico.

12.- El uso de la Garvicina A o de la composición antimicrobiana de las reivindicaciones 2-5 para la producción de un producto antimicrobiano como agente profiláctico y/o terapéutico para aplicación en acuicultura o en otra producción ganadera.

13.- El uso de la Garvicina A o de la composición antimicrobiana de las reivindicaciones 2-5 para la producción de un producto antimicrobiano como agente profiláctico y/o terapéutico para aplicación en salud humana..

14.- El uso de la Garvicina A o de la composición antimicrobiana de las reivindicaciones 2-5 para la producción de un producto antimicrobiano como agente bactericida o bacteriostático para aplicación en alimentación animal.

Fig. 1

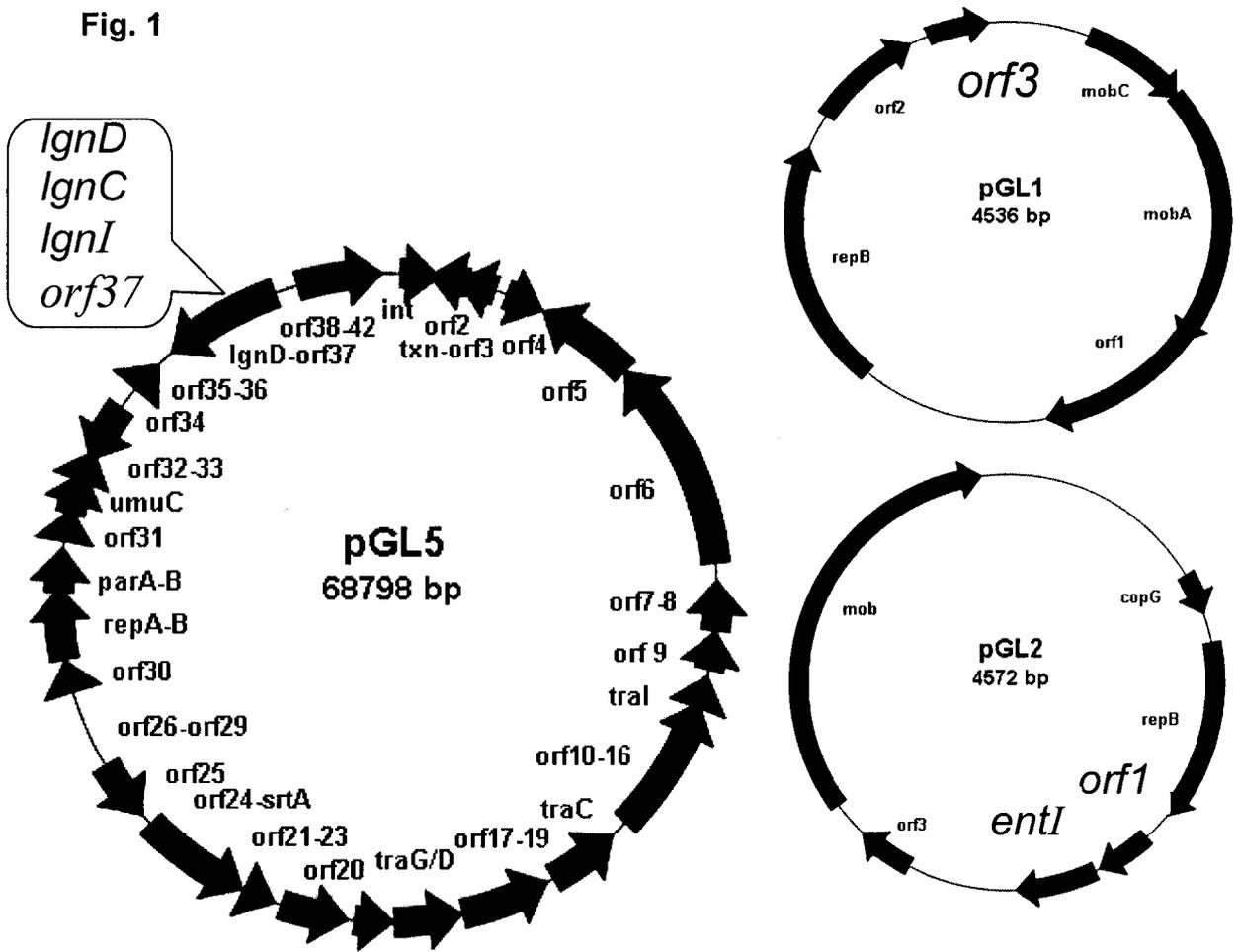


Fig. 2A



Fig. 2B

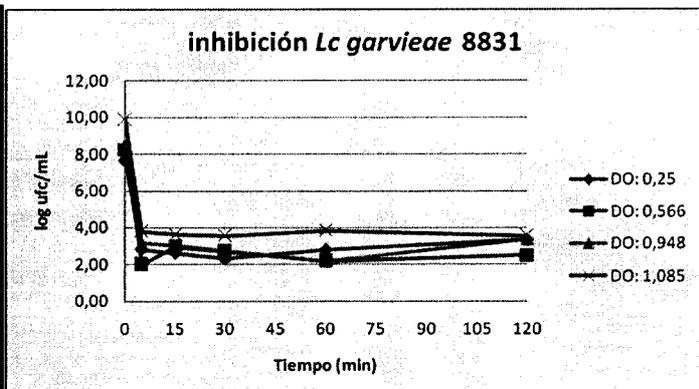


Fig. 3

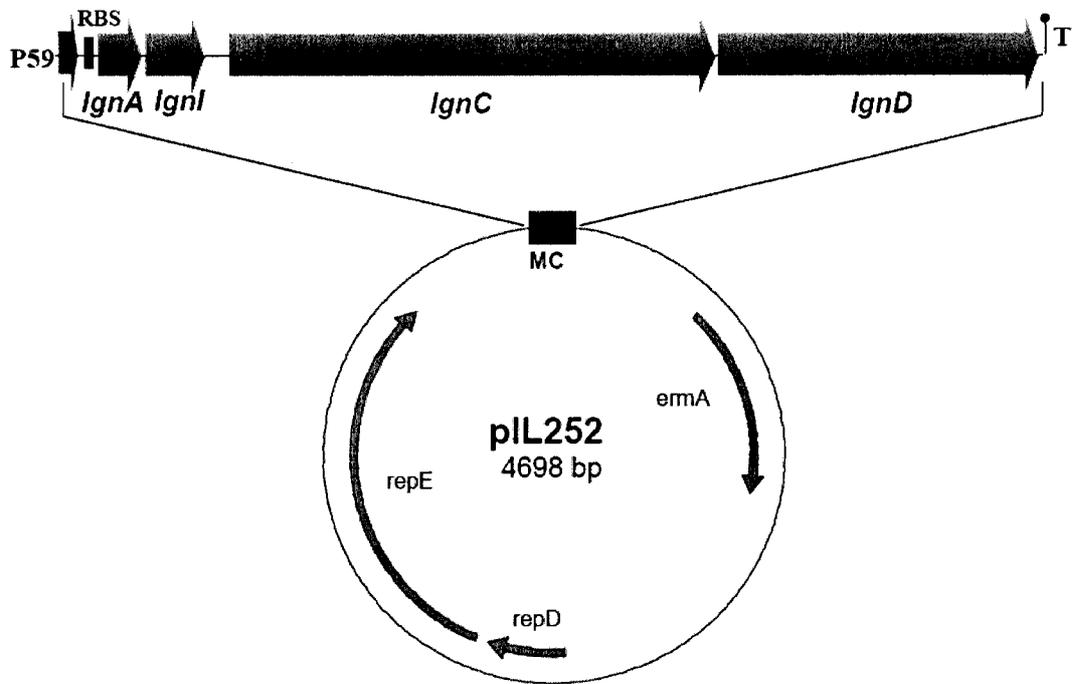


Fig. 4

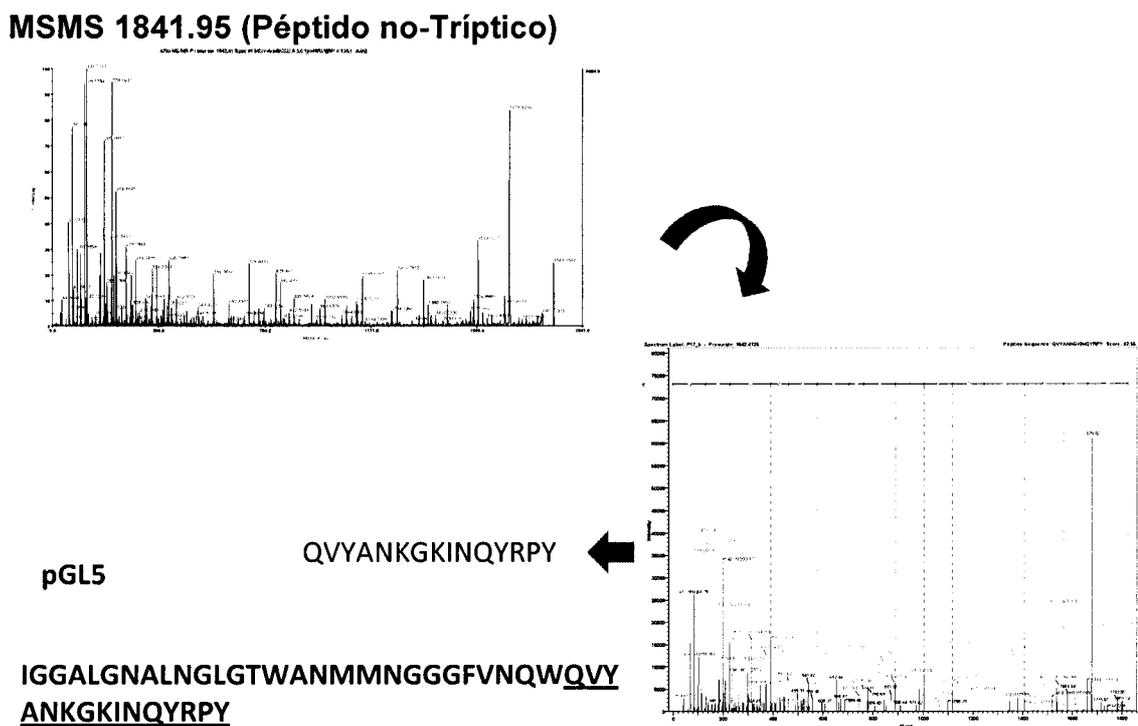
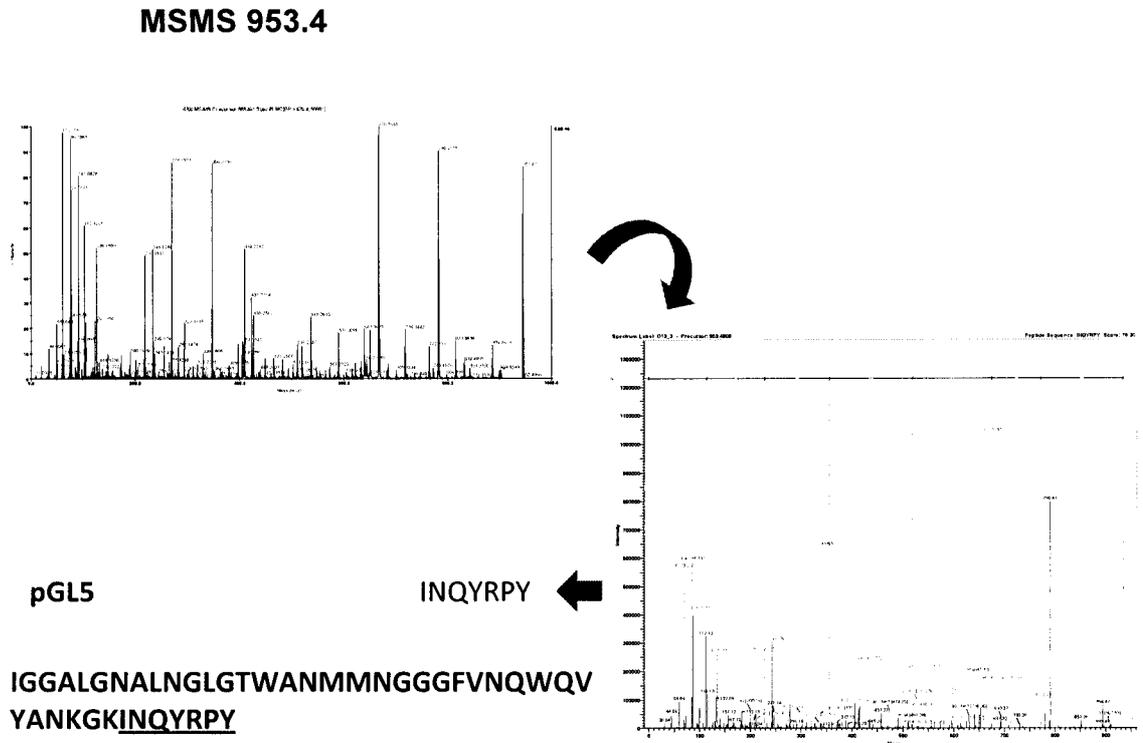


Fig. 5

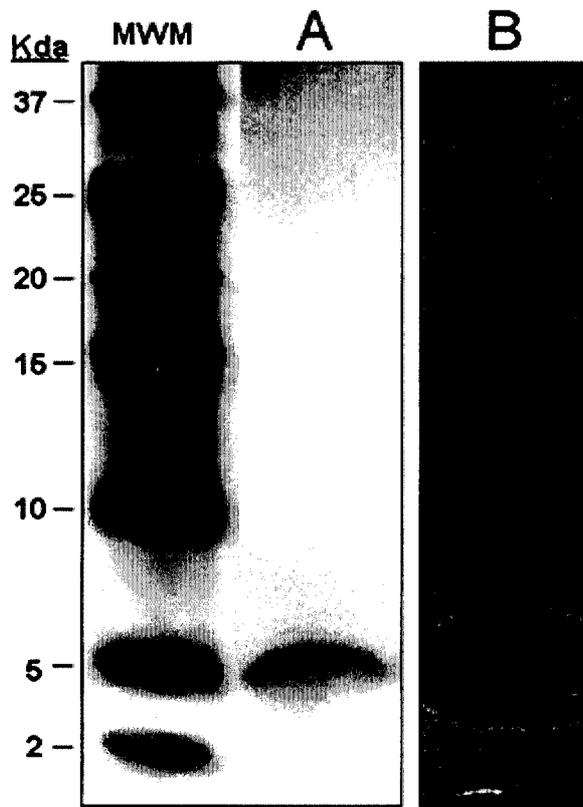


Fig. 6

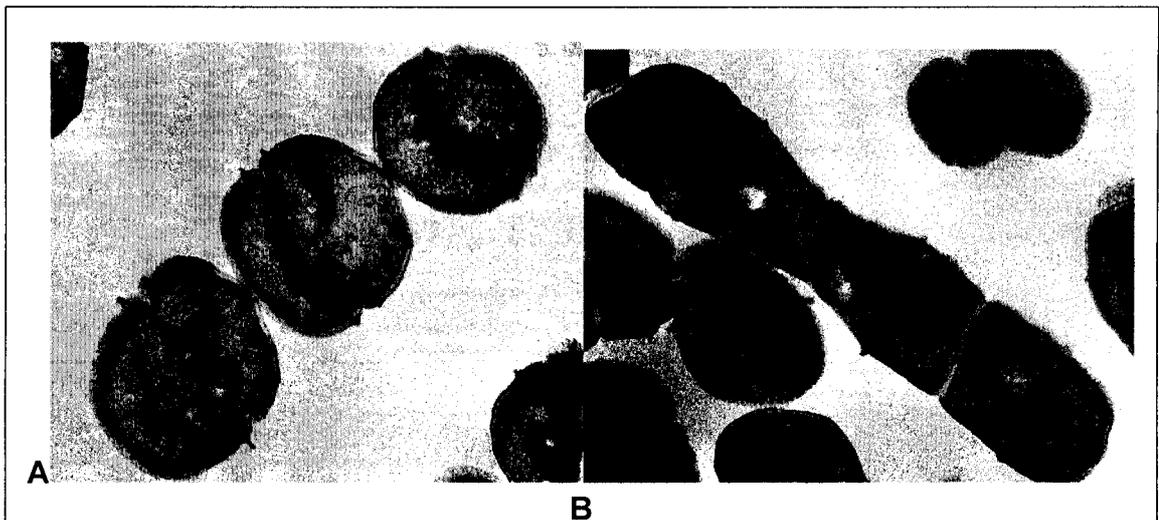


Fig. 7

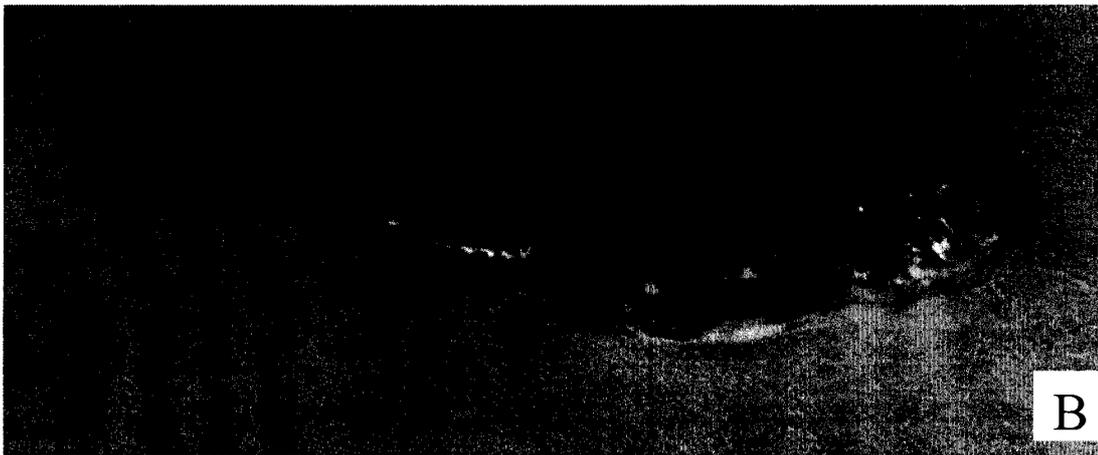
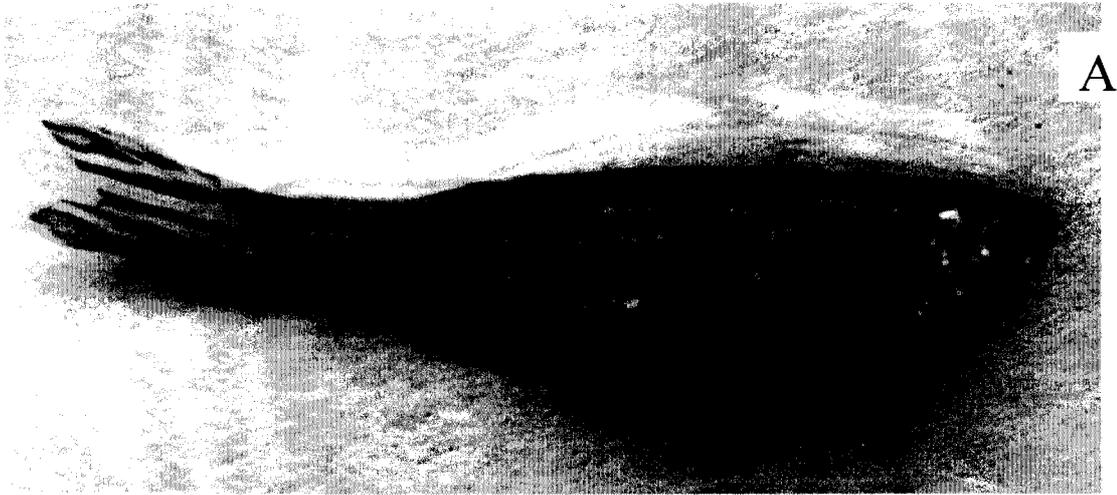
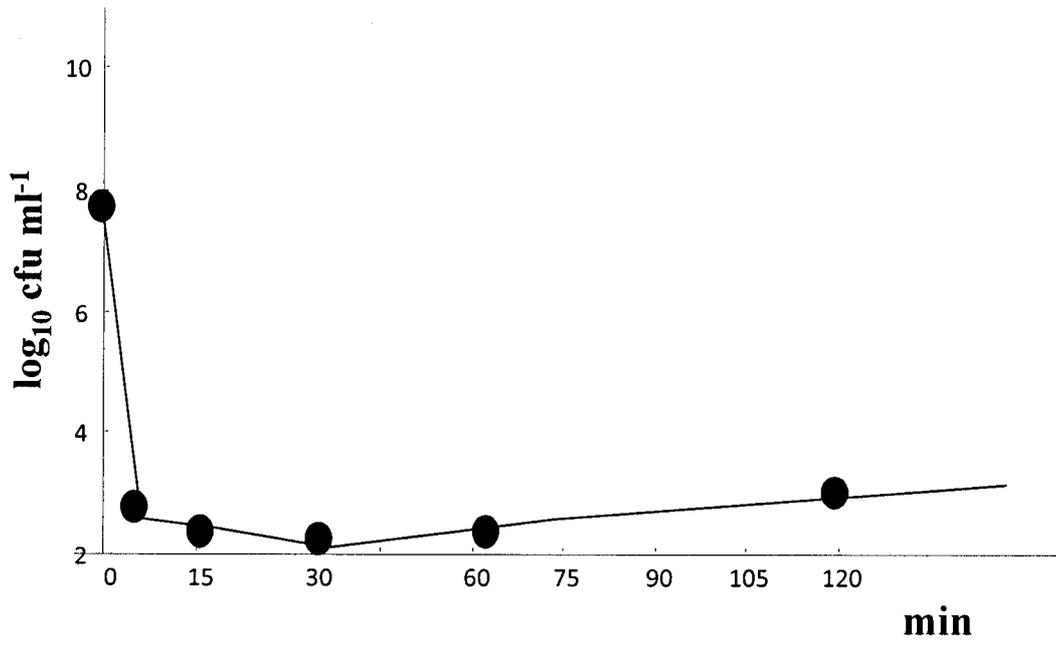


Fig. 8



ES 2 494 617 A1

Secuencia GarvicinaA

<110> Universidad Complutense de Madrid; Bioorganic Research and Services S.L

<120> Utilización de la Garvicina A para la inhibición selectiva de Lactococcus garvieae

<160> 1

<170> BISSAP 1.0

<210> 1

<211> 43

<212> PRT

<213> Lactococcus garvieae 21881

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..43

<223> /mol_type="protein"
/organism="Lactococcus garvieae 21881"

<400> 1

Ile Gly Gly Ala Leu Gly Asn Ala Leu Asn Gly Leu Gly Thr Trp Ala
1 5 10 15
Asn Met Met Asn Gly Gly Gly Phe Val Asn Gln Trp Gln Val Tyr Ala
20 25 30
Asn Lys Gly Lys Ile Asn Gln Tyr Arg Pro Tyr
35 40



- ②① N.º solicitud: 201300260
②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.03.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	AGUADO-URDA, M. et al. "Characterization of plasmids in a human clinical strain of <i>Lactococcus garvieae</i> ". PLOS ONE. Junio 2012. Vol. 7, Nº 6, artículo e40119, páginas 1-16. Figura 6; Tabla 2.	1-14
Y	BORRERO, J. et al. "Characterization of Garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by <i>Lactococcus garvieae</i> DCC43, isolated from Mallard ducks (<i>Anas platyrhynchos</i>)". APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. 01.01.2011. Vol. 77, Nº 1, páginas 369-373, todo el documento, especialmente página 372, columna 2.	1-14
Y	CLEVELAND, J. et al. "Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation". INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY. 04.12.2001. Vol. 71, Nº. 1, páginas 1-20, todo el documento.	1-14
Y	AGUADO-URDA, M. et al. "Genome sequence of <i>Lactococcus garvieae</i> 21881, isolated in a case of human septicemia". JOURNAL OF BACTERIOLOGY. 01.08.2011. Vol. 193, Nº 1, páginas 4033-4034, todo el documento.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 30.08.2013</p>	<p>Examinador M. Novoa Sanjurjo</p>	<p>Página 1/4</p>
---	--	------------------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K38/16 (2006.01)

C12P21/02 (2006.01)

A23L3/3463 (2006.01)

A61P31/04 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C12P, A23L, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.08.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-14	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-14	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

La invención, reivindica el uso de la bacteriocina Garvicina A de SEQ ID nº 1, producida por la cepa *Lactococcus garvieae* 21881, para preparar una composición antimicrobiana que tiene actividad bactericida y bacteriostática. La Garvicina A se puede utilizar como bactericida/bacteriostático en salud humana, en acuicultura y en alimentación animal.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	AGUADO-URDA, M. et al. "Characterization of plasmids in a human clinical strain of <i>Lactococcus garvieae</i> ". PLOS ONE. Junio 2012. Vol. 7, Nº 6, artículo e40119, páginas 1-16.	
D02	BORRERO, J. et al. "Characterization of Garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by <i>Lactococcus garvieae</i> DCC43, isolated from Mallard ducks (<i>Anas platyrhynchos</i>)". APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. 01.01.2011. Vol. 77, Nº 1, páginas 369-373.	
D03	CLEVELAND, J. et al. "Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation". INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY. 04.12.2001. Vol. 71, Nº. 1, páginas 1-20.	
D04	AGUADO-URDA, M. et al. "Genome sequence of <i>Lactococcus garvieae</i> 21881, isolated in a case of human septicemia". JOURNAL OF BACTERIOLOGY. 01.08.2011. Vol. 193, Nº1, páginas 4033-4034.	

El documento D01, describe la caracterización de 5 plásmidos presentes en la cepa de *Lactococcus garvieae* 21881.

El documento D02, describe la caracterización de la Garvicina ML, producida por una cepa de *Lactococcus garvieae*, como un péptido cíclico de 60 aminoácidos y menciona la capacidad de la bacteriocina, para inhibir el crecimiento de otras cepas de *Lactococcus garvieae*.

El documento D03, es una revisión de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas en la que además de estudiar su estructura, producción y espectro de acción, se menciona su importancia en la industria alimentaria para preservar alimentos.

El documento D04, es la publicación de la secuencia del genoma de la cepa de *Lactococcus garvieae* 21881, cuyos plásmidos son caracterizados en el documento D01.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

Reivindicaciones 1-14

El documento D01, describe la caracterización de 5 plásmidos presentes en la cepa de *Lactococcus garvieae* 21881. En el plásmido denominado pGL5, representado en la figura 6, se localiza la *orf37* donde se abre la lectura de los genes del operón *IGN AICD* que codifica para una bacteriocina, una proteína similar a la proteína de inmunidad de la bacteriocina de *Leuconostoc gelidum*, y proteínas similares a la proteína de secreción de la bacteriocina de *Lactococcus lactis* y el transportador ABC de la bacteriocina de *Lactococcus lactis* (consultar información adicional de D01, página 14, columna 2, en línea). El documento D02, describe la Garvicina ML, producida por una cepa de *Lactococcus garvieae*, como un péptido cíclico de 60 aminoácidos y menciona la capacidad de la bacteriocina (página 372, columna 2) para inhibir el crecimiento de otras cepas de *Lactococcus garvieae* relacionadas con la septicemia hemorrágica que afecta a pescados y crustáceos en piscifactorías. Las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, están ampliamente descritas en el estado de la técnica. Las bacteriocinas se caracterizan por tener naturaleza peptídica y matar o inhibir el crecimiento de otras bacterias (ver documento D03). La secuencia de la bacteriocina Garvicina A producida por la cepa *Lactococcus garvieae* 21881, ha sido descrita en el documento D01, pero este documento también incluye información que asocia el operón *AICD* a una actividad bacteriocina; por tanto, no pueden considerarse nuevos el uso de la Garvicina A para preparar una composición antimicrobiana, la composición antimicrobiana que contiene Garvicina A, el proceso de producción de Garvicina A ni el uso de la Garvicina A para producir un producto de aplicación en la industria farmacéutica, alimentaria o en acuicultura ya que la Garvicina A y su actividad bacteriocina han sido previamente descritas y el uso de las bacteriocinas como aditivo para preservar alimentos es ampliamente conocido en el estado de la técnica. También se ha descrito previamente la actividad inhibidora del crecimiento sobre otras cepas de *Lactococcus garvieae*, de la bacteriocina Garvicina ML y contemplado su utilidad inhibiendo el crecimiento de cepas de *Lactococcus garvieae* responsables de la septicemia hemorrágica de pescados de piscifactorías. Se considera que las reivindicaciones 1-14, no cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con los Artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes 11/1986.