

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 244**

51 Int. Cl.:

A61K 31/683 (2006.01)
A61K 31/685 (2006.01)
A01K 51/00 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)
A23K 50/90 (2006.01)
A23K 20/158 (2006.01)
A61K 35/644 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2014 PCT/EP2014/060553**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2014 WO14187906**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2014 E 14725994 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2999329**

54 Título: **Lisofosfolípidos y alquil-lisofosfolípidos contra enfermedades de la cría de abeja melífera**

30 Prioridad:

22.05.2013 EP 13168757

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.07.2018

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF GRAZ (100.0%)
Universitaetsplatz 3
8010 Graz, AT

72 Inventor/es:

SCHÜHLY, WOLFGANG;
RIESSBERGER-GALLÉ, ULRIKE;
HERNÁNDEZ-LÓPEZ, JAVIER y
CRAILSHEIM, KARL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 676 244 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Lisofosfolípidos y alquil-lisofosfolípidos contra enfermedades de la cría de abeja melífera

- 5 La presente invención se refiere a la aplicación de lisofosfolípidos y alquil-lisofosfolípidos (ALP) en enfermedades de la cría de abeja melífera.

Los mecanismos de defensa contra los agentes patógenos de los insectos se atribuyen comúnmente a i) la presencia de moléculas pequeñas activas no específicas tales como el ácido láctico, ii) la acción de péptidos antimicrobianos, por ejemplo, apidecinas en abejas melíferas o iii) las respuestas inmunitarias inducidas específicamente que dan lugar a una memoria inmunológica. Además, la interacción entre las bacterias intestinales y las patógenas, por ejemplo, la presencia de una flora intestinal de bacterias acidolácticas (LAB) y su producción de bacteriocinas como parte de un mecanismo de defensa contra bacterias patógenas, se ha expuesto para *Apis mellifera* [Carina Audisio et al. 2011. Microbiol Res 166:1-13] y *Apis cerana japonica* [Yoshiyama y Kimura. 2009. J Invertebr Pathol 102:91-96]. Además de esto, la inmunidad social, es decir, las defensas cuya eficacia aumenta con la sociabilidad del insecto eusocial respectivo, tiene un papel principal, en particular en la abeja melífera. Por lo tanto, los mecanismos de resistencias que no están relacionados con la presencia de proteínas o péptidos ni son el resultado del comportamiento social son escasos.

20 La loque americana (AFB) es una plaga devastadora de la abeja que está causada por una bacteria esporulada grampositiva, *Paenibacillus larvae* (*Pl*) (anteriormente descrita como *Bacillus larvae*), que existe en varios genotipos tales como ERIC I y ERIC II [Genersch et al. 2006. Intern J Syst Evol Microbiol 56:501-511]. Las esporas de *Pl* germinan en el intestino medio de las larvas, desde donde – tras proliferación – invaden el hemocele [Yue et al. 2008. Environm Microbiol 10:1612-1620]. Las larvas infectadas mueren de septicemia y se vuelven masas blandas. 25 La esporulación de *Pl* se produce en los restos muertos de la larva cuando los nutrientes escasean. Como consecuencia del comportamiento higiénico de las abejas obreras, los restos de la larva se retiran y se transfieren las esporas a las larvas jóvenes mediante los cuidados, lo que inicia un ciclo de reinfección que puede terminar fatal para la colonia de abejas. Tarr [Tarr. 1937. Ann Appl Biol 24:377-384] demostró que los estadios vegetativos de *Pl* no son infecciosos, sin embargo, las esporas pueden permanecer infecciosas durante largos periodos, siendo la 30 única forma infecciosa de *Pl*. Debido a su presencia en todo el mundo y su alta infectividad, la loque americana supone un peligro para la producción de miel y la polinización.

La loque europea (EFB) es una enfermedad de la cría de abeja que está producida por la bacteria grampositiva *Melissococcus plutonius* (*M. pl.*). Esta enfermedad potencialmente letal tiene una distribución casi mundial, cuyos brotes son estacionales y a menudo endémicos. [Forsgren, 2010. J of Invertebr Pathol 103:S5-S9]. La EFB de lugar a pérdidas de cría de abejas en una colonia debido a la muerte de las larvas a una edad de 4-5 días. El contagio de las larvas con *M. pl.*, tiene lugar mediante la ingestión de *M. pl.* contenida en el alimento. La bacteria se multiplica en el intestino medio de la abeja melífera y se excreta en las heces durante la pupación. Puede permanecer viable durante un largo periodo y es resistente a la desecación. [Bailey 1959. J Insect Pathol 1:80-85]. La enfermedad se 40 transite por las abejas obreras adultas que entran en contacto con la bacteria en la colmena. *M. pl.* crece en condiciones microaerófilas a anaeróbicas y se puede cultivar en una atmosfera enriquecida en dióxido de carbono. *M. pl.* está relacionada estrechamente con la bacteria *Enterococcus*. Una infección con *M. pl.* se asocia a menudo con otras infecciones bacterianas del intestino medio de las abejas melíferas. Las larvas de abeja melífera son más susceptibles a esta bacteria en los estadios larvarios tempranos, pero se mantienen susceptibles en cualquier 45 estadio.

La dieta de las larvas de abeja melífera está habitualmente protegida de que se estropee y se mantiene no contagiosa por componentes que presentan una fuerte actividad antibacteriana, por ejemplo, mediante la presencia de la potente proteína antibacteriana defensina 1 [Ilyasov et al. 2012. J Apicultural Sci 56:115-124].

50 Riessberger-Galle et al. [Riessberger-Galle et al. 2001. J Invertebr Pathol 77:231-236] informaba de una sustancia estable al calor, no inducida en el intestino medio de abejas adultas que presenta una fuerte actividad contra el estadio vegetativo de *Paenibacillus larvae*. Se podía demostrar que aproximadamente un décimo de una preparación de intestino medio homogeneizado era capaz de inhibir el crecimiento de *Pl* en un tubo de ensayo utilizando un volumen de 1,0 ml. La actividad antimicrobiana del intestino medio de la abeja melífera adulta no se reducía significativamente después de un tratamiento con calor, precipitación etanólica y la aplicación de 55 proteínas. Además, se descubrió que las larvas homogeneizadas desde el día 3 presentaban un aumento de la actividad contra *Pl* [Crailsheim y Riessberger-Galle. 2001. Apidologie 32:91-103; Wedenig et al. 2003. Apidologie 34:43-51].

60 El documento WO 2007/027636 A2 describe el tratamiento de afecciones tales como sepsis, choque séptico, síndromes de respuesta inflamatoria sistémicos y SIRS, producidas por bacterias grampositivas mediante la administración de composiciones que contienen un fosfolípido, un lípido neutro y un ácido biliar o una sal de ácido biliar.

65 El documento WO 9926632 A1 desvela que los fosfolípidos tales como MPPA y DPPS presentan un efecto

antimicrobiano contra bacterias gramnegativas y grampositivas, en el que los fosfolípidos pueden combinarse con fármacos antibióticos, antimicrobianos, antifúngicos, antivíricos y antiprotozoarios para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

5 Se conoce bien en la técnica que los ácidos grasos libres mono y poliinsaturados poseen actividad antibiótica lo que se demostró también contra *Paenibacillus larvae* [Feldlaufer et al. 1993. Adipologie 24:95-99]. Sin embargo, estos ácidos grasos libres presentan una alta toxicidad con respecto a las larvas de abeja melífera y, por lo tanto, no son adecuados para el tratamiento o profilaxis de AFB.

10 Se informó que la lisofosfatidilcolina tenía actividad antimicrobiana contra el *Bacillus subtilis* grampositivo mediante un mecanismo autolítico. La actividad antimicrobiana depende de la longitud de la cadena de carbono del resto acilo en la molécula de LPC, siendo más eficaz con palmitoil LPC [Tsuchido. 1994. Appl Microbiol Biotechnol 41:106-109].

Los métodos para producir lisofosfatidilcolina se desvelan en el documento EP 0882136 A1.

15 No hay disponible hasta la fecha ningún tratamiento aplicable globalmente en enfermedades de la cría de abeja, en particular loque americana y loque europea.

20 Aunque se utilizan antibióticos frecuentemente en los Estados Unidos de América, Canadá y China para el tratamiento de infecciones por *Pl* y *M. pl.* [Gochnauer 1951. Minn Home Fam Sci 9:15; Oldroyd et al. 1989. Austr J Agric Res. 40:691-697], el uso de antibióticos está prohibido en Europa ya que esto da lugar inevitablemente a la formación de resistencias [Miyagi et al. 2000. J Invertebr Pathol 75:95-96] y restos detectables en los productos apícolas. En la mayoría de los estados europeos la AFB y EFB son plagas de abejas de declaración obligatoria y las colonias de abejas infectadas con *Pl* o *M. pl.* tienen que quemarse, dando lugar a pérdidas económicas considerables para los apicultores. En consecuencia, existe una gran demanda de una opción de tratamiento seguro contra la loque americana y la loque europea, respectivamente, que esté sustancialmente libre de efectos secundarios.

30 Un objetivo de la presente invención es proporcionar una opción nueva y segura para el tratamiento y prevención de enfermedades de la cría de abeja melífera.

En particular, es un objetivo de la presente invención proporcionar una opción nueva y segura para el tratamiento y prevención de enfermedades de la cría de abeja producidas por bacterias grampositivas, en particular para el tratamiento y prevención de la loque americana producida por el *Paenibacillus larvae* grampositivo y la loque europea producida *Melissococcus plutonius* sin la utilización de antibióticos.

40 La presente invención se refiere a un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en un lisofosfolípido y un alquil-lisofosfolípido (ALP) para su uso en el tratamiento o profilaxis de enfermedades de la cría de abeja producidas por bacterias grampositivas de acuerdo con la reivindicación 1.

Basándose en la observación de que el homogenado del intestino medio de abejas melíferas adultas (*Apis mellifera*) presenta una fuerte actividad antibacteriana contra el agente causal de la loque americana (AFB), *Paenibacillus larvae* (*Pl*), y loque europea (EFB) *Melissococcus plutonius* (*M. pl.*) se llevó a cabo un aislamiento y caracterización guiados por bioactividad del principio activo del intestino medio de la abeja melífera. Los experimentos con la fracción activa obtenida por fraccionamiento por HPLC semi-preparatoria indicaban que la sustancia no pertenece a las proteínas o péptidos antibacterianos conocidos. Un análisis espectrométrico de más de alta resolución posterior reveló entonces la presencia del 1-O-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina como el compuesto responsable de la actividad antibacteriana contra *Pl* y *M. pl.* Las concentraciones antibacterianas de lisofosfatidilcolina también se podía detectar en larvas. La presencia de lisofosfatidilcolina también se podía demostrar en los intestinos medios de avispa y abejorros, cuyo homogenado también presentaba una actividad inhibidora contra *Pl* y *M. pl.* Además, se pudo demostrar una buena actividad inhibidora de la 1-O-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina y los análogos fosfolípidicos hexadecilfosfocolina (miltefosina) y 1,1-dimetilpiperidinio-4-il-decilfosfato (perifosina).

55 El hallazgo de que un compuesto de lisofosfatidilcolina (LPC) que existe en el intestino medio de la abeja melífera es responsable de la actividad inhibidora contra *Pl* y *M. pl.* era inesperado. En general, las lisofosfatidilcolinas son moléculas multifuncionales bien examinadas que desencadenan distintos mecanismos celulares y genéticos en condiciones fisiológicas y patológicas. Se debe enfatizar en que la homeostasis de la LPC en los tejidos es de importancia crucial. Sin embargo, hasta la fecha, se conoce poco a cerca del metabolismo de fosfolípidos en el intestino medio de los insectos. Turunen y Kastari [Turunen y Kastari. 1979. Comp Biochem Physiol 62A:933-937] informan del destino metabólico de la fosfatidilcolina en el intestino de las larvas de *Pieris brassicae*, estos autores demostraron que la lecitina de la dieta se convierte en lisolecitina en la luz intestinal y que posteriormente la lisolecitina se absorbe desde la luz del intestino medio y se convierte en fosfatidilcolina. Sin embargo, no hay ningún informe disponible para abejas melíferas. Existe una falta general de conocimiento respecto al papel fisiológico de los fosfolípidos y su digestión, absorción o rutas biosintéticas en insectos.

65 Estos hallazgos inesperados permiten una nueva opción de tratamiento o profilaxis de las enfermedades de la cría

de abeja melífera sin el uso de antibióticos.

El compuesto de acuerdo con la presente invención se utiliza en el tratamiento o profilaxis de enfermedades de la cría de abeja producidas por bacterias grampositivas. En una realización, la enfermedad es la loque americana que está producida por *Paenibacillus larvae* (*Pl*). En otra realización la enfermedad es la loque europea producida por *Melissococcus plutonius* (*M. pl.*).

Se descubrió que una única dosis de lisofosfatidilcolina administradas a las larvas el día uno en concentraciones de hasta un 1-2 % de peso corporal de larva de abeja menor de un día no presenta mayor mortalidad que la que se encuentra en el grupo de control según se evalúa el día 7. Esta concentración excede en mucho la concentración necesaria para la actividad antimicrobiana contra *Paenibacillus larvae* y *Melissococcus plutonius*, por ejemplo, un valor MIC *in vitro* de 2-5 ppm. No se pueden esperar efectos de toxicidad debido a la acumulación de LPC después del tratamiento en los productos apícolas (por ejemplo, la miel). Los datos de efectos tóxicos de la LPC ingerida por vía oral debido a su actividad tensioactiva (por ejemplo, contra eritrocitos) en vertebrados son todavía escasos, sin embargo, la LCP está contenida en muchos artículos alimentarios. Además, la LPC es un compuesto que existe ubicuamente en sistemas biológicos, y se encuentra también en bajas concentraciones en el polen [Andrikopoulos et al. 1985. *Phytochemistry* 24:2953-2957]. Además, los lisofosfolípidos son compuestos que existen naturalmente en abejas. En consecuencia, no existe una razón para esperar ningún efecto adverso en las abejas melíferas y las larvas. Además, la resistencia de *Pl* y *M. pl.* contra los lisofosfolípidos no se conoce. En definitiva, los lisofosfolípidos representan una opción ventajosa y segura para el tratamiento y profilaxis de infecciones por *Pl* y *M. pl.* (loque americana y loque europea, respectivamente).

El término "lisofosfolípido" como se utiliza en el presente documento se refiere a lisofosfolípidos de origen natural y lisofosfolípidos sintéticos. El lisofosfolípido comprende preferentemente una estructura glicerol a la que se une un grupo polar (por ejemplo, un grupo fosfocolina), se une un grupo hidroxilo libre en la posición 2 de la estructura de glicerol y un resto de ácido graso saturado o insaturado a la estructura de glicerol. Preferentemente, el resto de ácido graso del lisofosfolípido tiene una cadena C_n -alquilo o una cadena C_n -alqueno, en los que $n > 4$. En algunas realizaciones, el lisofosfolípido comprende un resto de ácido graso oxidado.

La expresión "análogo de lisofosfolípido" como se utiliza en el presente documento se refiere a compuestos tales como la hexadecilfosfocolina (miltefosina) y 1,1-dimetilpiperidinio-4-il octadecil fosfato (perifosina) que son análogos estructurales de alquil-fosfolípidos. Preferentemente, el resto alquilo del alquil-lisofosfolípido tiene una cadena C_n -alquilo o una cadena C_n -alqueno, en los que $n > 4$.

De acuerdo con una realización preferida el lisofosfolípido es una lisofosfatidilcolina (LPC).

Preferentemente, la lisofosfatidilcolina comprende una cadena de ácido graso C_5 - C_{23} saturada o insaturada, en el que C_4 - C_{24} significa que el número (n) de átomos de carbono (longitud de la cadena) está entre $3 < n < 25$. Preferentemente, la cadena de ácido graso C_4 - C_{24} está unida en la posición 1 de la estructura de glicerol y el grupo hidroxilo libre está en la posición 2 de la estructura de glicerol.

Preferentemente, la lisofosfatidilcolina se selecciona de entre el grupo que consiste en 1-O-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina y 1-O-estearoil-sn-glicero-3-fosfocolina para las que los inventores demostraron una buena actividad inhibidora de *Pl in vitro* (véase, los ejemplos posteriores).

La fuente natural de carbohidratos de las abejas melíferas adultas es el néctar o ligamaza recolectada en la naturaleza. Dentro de la colmena, el contenido de agua de estos líquidos se reduce a un 16-20 %, y se añaden enzimas (invertasa, diastasa y glucosa oxidasa).

En una realización ventajosa, la lisofosfatidilcolina es la 1-O-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (a la que también se hace referencia en el presente documento como oleoil-LPC) que es el lisofosfolípido primario de origen natural del intestino medio de larvas mayores y abejas melíferas adultas. Por lo tanto, cualquier efecto adverso durante el tratamiento es muy improbable. Los inventores pudieron demostrar una actividad inhibidora de *Pl* y *M. pl. in vitro* de la 1-O-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina de una MIC de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (MIC = concentración inhibidora mínima). Las lisofosfatidilcolinas con otros restos de ácido graso distintos del ácido oleico también están presentes en los intestinos medios de la abeja, por solo hasta una extensión menor del 10 % del contenido de 1-O-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina.

De acuerdo con la invención, el compuesto es un alquil-lisofosfolípido (ALP) tal como hexadecilfosfocolina (miltefosina) y 1,1-dimetilpiperidinio-4-il octadecil fosfato (perifosina).

En realizaciones ventajosas el compuesto es hexadecilfosfocolina (miltefosina) o 1,1-dimetilpiperidinio-4-il octadecil fosfato (perifosina). Estos compuestos también presentaban una buena actividad inhibidora de *Pl* y *M. pl. in vitro* (véase el Ejemplo 1, Tablas 1.1 y 1.2 posteriormente), pero no son susceptibles a la hidrólisis, al contrario, por ejemplo, a la 1-O-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina. La miltefosina y perifosina son análogos estructurales de alquil-lisofosfolípidos. La miltefosina es un fármaco que se utiliza por vía oral para tratar la leishmaniasis visceral

[Sindermann et al. 2004. Med Microbiol Immunol 193:173-190].

5 En algunas realizaciones el compuesto de acuerdo con la invención se administra preferentemente a una colonia de abejas melíferas en una cantidad eficaz para eliminar el estadio vegetativo de *Paenibacillus larvae* yo eliminar las formas vegetativas de *PI* que resultan de la germinación de esporas. La dosificación puede ser cualquier dosificación terapéuticamente eficaz y segura, por ejemplo, una concentración de lisofosfolípido activo de aproximadamente un 0,01 %-0,05 % en una composición alimentaria para la colonia de abejas melíferas. La composición alimentaria se suministra preferentemente a las abejas melíferas obreras.

10 En otras realizaciones, el compuesto de acuerdo con la invención se administra preferentemente a una colonia de abejas melíferas en una cantidad eficaz para eliminar el *Melissococcus plutonius*. La dosificación puede ser cualquier dosificación apropiada terapéuticamente eficaz y segura, por ejemplo, una concentración de lisofosfolípido activo de aproximadamente 0,01-0,05 % en una composición alimentaria para la colonia de abejas melíferas. La composición alimentaria se administra preferentemente a las abejas melíferas obreras.

15 La expresión "colonia de abejas melíferas" como se utiliza en el presente documento se refiere a todos los tipos de abejas presentes en una colonia de abejas, incluyendo, por ejemplo, las abejas melíferas obreras y las larvas de abeja melífera. La colonia de abejas melíferas es una agregación de abejas melíferas con o sin reina y con o sin crías. El término colonia de abejas melíferas también se refiere a un enjambre de abejas melíferas. Además, la expresión colonia de abejas melíferas también engloba las abejas empaquetadas y los enjambres artificiales.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición para su uso en el tratamiento o profilaxis de enfermedades de la cría de abeja producidas por bacterias grampositivas, en el que la composición comprende un compuesto como se ha definido anteriormente y en el que la composición se administra a una colonia de abejas melíferas. En realizaciones específicas, la composición puede comprender un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste un lisofosfolípido y un análogo de lisofosfolípido. En realizaciones específicas la composición puede comprender una mezcla de dos o más de estos compuestos.

30 En una realización ventajosa, la composición es una composición alimentaria o un aditivo alimentario añadido a una composición alimentaria para abejas melíferas. En consecuencia, el compuesto es un principio activo en la composición alimentaria que se administra a la colonia de abejas melíferas para reducir la carga total de *PI* o *M. pl.* en una colonia y para facilitar el transporte del compuesto en pequeñas cantidades en el alimento de las larvas. Para obtener una composición alimentaria que comprende un compuesto de acuerdo con la invención, el compuesto se añade preferentemente con una concentración aproximadamente del 0,01-0,1 %, más preferentemente aproximadamente del 0,01- 0,05 %, a cualquier alimento que se pueda utilizar para alimentar abejas. Los alimentos para las abejas melíferas son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, soluciones de sacarosa, azúcares invertidos, jarabes de maíz altos en fructosa, distintos jarabes de fruta, papillas proteicas y otros alimentos proteicos sin restricción estacional. En una realización, la composición es una composición alimentaria para larvas de abeja melífera (tratamiento por contacto directo). En otras realizaciones, la composición es una composición alimentaria para las abejas nodriza de las abejas melíferas, en las que la composición se administra a las larvas de abeja melífera (tratamiento por alimentación, al que se hace referencia también como trofalaxia).

45 Preferentemente, la composición alimentaria comprende el compuesto de acuerdo con la invención con una concentración de aproximadamente 0,01-0,1 %, preferentemente con una concentración de aproximadamente 0,01-0,05 %.

50 En otro aspecto, la composición es una composición pulverizable que comprende un compuesto como se ha descrito anteriormente para el tratamiento o profilaxis de las enfermedades de la cría de abeja producidas por bacterias grampositivas, en el que la composición pulverizable se administra a una colonia de abejas mediante aplicación en pulverizador con la intención de que sea ingerida por las larvas. Esta composición pulverizable está preferentemente en forma de solución y puede contener emulsionantes, agentes humectantes, estabilizantes, agentes antiespumantes y anticongelantes, agentes dispersantes, agua, adyuvantes, agentes anti aglomerantes y potenciadores de la viscosidad. Debería dar lugar preferentemente a una concentración del lisofosfolípido o análogo de fosfolípido de aproximadamente 0,1-100 µg/celda de cría. El volumen de una célula de cría de abeja melífera obrera es conocido por los expertos en la técnica y, normalmente, varía de entre 250 a 350 µl.

60 En otro aspecto, la composición es una composición basada en liposomas, microesferas, o nanoesferas que comprende un compuesto como se ha descrito anteriormente para el tratamiento o profilaxis de enfermedades de la cría de abeja producidas por bacterias grampositivas:

- 65 • Por ejemplo, el lisofosfolípido o análogo de lisofosfolípido puede ser un principio activo en una composición liposómica pulverizable con, por ejemplo, fosfolípidos para facilitar la formación de liposomas. Esta composición pulverizable se puede administrar a una colonia de abejas mediante aplicación con un pulverizador con la intención de que sea ingerida por las larvas. Esta formulación liposómica de lisofosfolípidos pulverizable, preferentemente en forma de una solución, puede contener estabilizantes, agentes antiespumantes y anticongelantes, agentes dispersantes adicionales, agua, adyuvantes, agentes anti-aglomerantes y

potenciadores de la viscosidad. Preferentemente debería dar lugar a una concentración final del compuesto de acuerdo con la invención de aproximadamente 0,1-100 µg/celda de cría.

- 5 • En otro ejemplo, el compuesto (lisofosfolípido o su análogo) puede estar comprendido como un principio activo en micro o nanoesferas que están contenidos en una solución de inmersión para los panales de cría, en el que el principio activo se administra a una colonia de abejas sumergiendo los panales de cría en la solución de inmersión dando como resultado una concentración del compuesto en las celdas de cría del panal de cría eficaz para el tratamiento o profilaxis de las enfermedades de la cría de abeja. Esta solución de inmersión comprende aditivos para generar micro y nanoesferas tales como polietilenglicol (PEG), emulsionantes, estabilizantes, y potenciadores de la viscosidad. La inmersión de los panales de cría en la solución de inmersión preferentemente debería dar lugar a una concentración final de compuesto de aproximadamente 0,1-100 µg/celda de cría. El volumen de una celda de cría de abeja melífera obrera es conocido por los expertos en la técnica y, normalmente, varía entre 250 a 350 µl.
- 10
- 15 • En otro ejemplo, las formulaciones basadas en liposomas, micro o nanoesferas que contienen el principio activo de lisofosfatidilcolina se pueden utilizar para la aplicación sistémica en una colonia de abejas melíferas mediante la alimentación o dieta de las abejas melíferas. De esta manera, el principio activo alcanzará las larvas a través de la actividad trofaláctica de las abejas nodriza. Se recomienda la adición de emulsionantes y estabilizantes.
- 20
- 25 Los liposomas, micro o nanoesferas adecuadas para la presente invención resultan de procedimientos técnicos que están suficientemente representados en la bibliografía (véase, por ejemplo, Kumar, /. Pharm. Pharmaceut. Sci. 3:234-258, 2000; Malam, Trends in Pharmacol. Sci. 30:592-599, 2009; Collnot, /. Controlled Release 161:235-246, 2012).
- 30 En otro aspecto, la presente invención también se refiere a una solución de inmersión para panales de cría que comprende un compuesto como se ha definido en el presente documento, es decir un lisofosfolípido o su análogo, en el que el compuesto se administra a una colonia de abejas por inmersión de los panales de cría en la solución de inmersión, dando como resultado una concentración del compuesto en las células de cría de los panales de cría eficaz para el tratamiento o profilaxis de enfermedades de la cría de abeja causadas por bacterias grampositivas. En consecuencia, el lisofosfolípido o su análogo es un principio activo en la solución de inmersión para panales de cría. Esta solución de inmersión puede comprender adicionalmente emulsionantes, agentes humectantes, agentes antiespumantes, estabilizantes y potenciadores de la viscosidad.

35 La inmersión de los panales de cría en la solución de inmersión preferentemente debería dar lugar a una concentración final del compuesto de acuerdo con la invención de aproximadamente 0,1-100 µg/células de cría. El volumen de una célula de cría de abeja melífera obrera es conocido por los expertos en la técnica y, normalmente, varía de 250 a 350 µl.

40 En otro aspecto más, la presente invención también se refiere a una composición de cera de abeja para su uso en el tratamiento o profilaxis de enfermedades de la cría de abeja por bacterias grampositivas, en el que un compuesto como se ha definido en el presente documento, es decir, un lisofosfolípido o su análogo, se añade como un principio activo a la composición de cera de abeja, que resulta en una concentración del compuesto en las células de la cría del panal de cría eficaz para el tratamiento o profilaxis de enfermedades de cría de abeja causadas por bacterias grampositivas. Esto se puede conseguir, revistiendo o enlanchando las bases de cera o panales de cera con la LPC, con la intención de administrar directamente la LPC para permitir el contacto directo de la larva con la LPC en la cera mediante el contacto de la piel o mediante la dieta. Se recomienda la adición de agentes humectantes, emulsionantes, y estabilizantes.

45 También se describe el uso de un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en un lisofosfolípido y un análogo de lisofosfolípido como se ha descrito en el presente documento como un desinfectante para eliminar los patógenos que causan las enfermedades de la cría de abeja. El agente patógeno preferentemente es una bacteria grampositiva que se selecciona preferentemente de entre el grupo que consiste en *Paenibacillus larvae* y *Melissococcus plutonius*. Por ejemplo, el lisofosfolípido o su análogo puede ser el componente desinfectante en micro o nanoesferas que están contenidas en una solución de inmersión que se puede utilizar para la desinfección para prevenir enfermedades de la cría de abeja tales como la loque americana o europea en las células de la cría o el equipamiento del apicultor. Esta solución de inmersión comprende aditivos para generar las micro o nanoesferas tales como el polietilenglicol (PEG), emulsionantes, estabilizantes y potenciadores de la viscosidad.

Ejemplo 1: Aislamiento de 1-O-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina del intestino medio de abeja melífera adulta

60 Se anestesiaron las abejas y se retiraron manualmente los intestinos medios manualmente, se aclararon con solución de Ringer y entonces se liofilizaron. Se prepararon los intestinos medios de acuerdo con el siguiente método. Se lavaron 10 intestinos en Ringer de abeja, se secaron y entonces se añadieron 200 µl de agua y 350 µl de etanol (al 96 %). Para la homogeneización, se aplicaron ultrasonidos durante 3 s y el homogenado se dejó en reposo durante una noche. A la mañana siguiente, el homogenado se centrifugó durante 1 min (3000 rpm) y se desechó el aglomerado. El sobrenadante se transfirió a nuevo vial de Eppendorf y se liofilizó. 10 intestinos medios

daban lugar a aproximadamente 5 mg. La preparación de intestinos medios liofilizados se mantienen secos a 4-6 °C hasta su posterior utilización.

5 Protocolo para obtener una fracción enriquecida lista para la HPLC preparatoria: Se disuelve una cantidad de 10 intestinos medios liofilizados (véase anteriormente) en metanol-agua (1:1). Se llevó a cabo una extracción en fase sólida (SPE, fase RP-18) para obtener una fracción del liofilizado de intestinos medios con actividad biológica enriquecida.

10 La fosfatidilcolina, así como las lisofosfatidilcolinas, lisofosfatidilinositol y los compuestos de ácidos grasos de referencia (ácido linoleico, oleico, palmítico y esteárico) se obtuvieron en Sigma-Aldrich.

15 Para asegurar que el compuesto antibacteriano no se recolectó de glándulas secretoras de la superficie de la abeja, se tomaron las abejas melíferas adultas y sus cuerpos se aclararon con etanol abs. Después de su concentración, se ensayó este eluido en cuanto a la actividad, así también se inyectó en la HPLC. Se descubrió que esta ablución ni presentaba actividad antibiótica contra *PI* ni se pudo encontrar lisofosfatidilcolina en el cromatograma LC-MS.

20 Los ácidos grasos nutricionales que se encuentra, por ejemplo, en el polen recolectado por las abejas [Szezesna. 2006. J Apic Sci 50:65-79] se habían identificado anteriormente como constituyentes antimicrobianos, es decir, los ácidos grasos de cadena corta y larga, este último con un aumento del número de enlaces dobles, presenta actividad contra *P. larvae* [Feldlaufer et al. 1993. Apidologie 24:95-99]. Sin embargo, dichos ácidos grasos en cuestión no se pudieron identificar en la fracción activa del extracto de intestino medio. Los experimentos de los inventores también demostraron que la 1-O-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina está presente solamente como trazas en la jalea real (los datos de la LC-MS demostraban que el pico de la 1-O-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina está presente en una concentración 500 veces menor en comparación con el tejido reciente de intestino medio de abeja melífera), mientras que se descubrió que la 1-O-estearoil-sn-glicero-3-fosfocolina existía por debajo del nivel cuantificable.

30 Debido a la recolección de fracciones de elución tardías (concentración con acetonitrilo > 80 %), se pudo descartar la posibilidad de que el ácido láctico, producido por la existencia potencial de una flora de bacterias acidolácticas (LAB) en el intestino medio era el responsable del efecto antibacteriano.

35 Los lípidos en el polen (varían entre un 0,8-18,9 %) están compuestos por ácidos grasos y ejercen propiedades antimicrobianas junto con su valor nutricional. Se encontraron palmítico, esteárico, oleico, linoleico en las 577 muestras de polen investigadas por Manning [Manning R. 2006. Dissertation. Murdoch University]. El hecho de que las abejas de invierno que se mantienen con una dieta libre de polen y lípidos (solamente con una solución de azúcar) también presentaran actividad contra *PI* en su intestino medio descarta la posibilidad de que esta actividad se debiera a la ingesta de lípidos en la dieta. Además, la actividad contra *PI* también se encontró en abejas completamente desarrolladas obtenidas de colonias naturales justo antes del cierre de sus células tapadas y en abejas criadas artificialmente.

40 Para la evaluación de ciertos ácidos grasos y fosfolípidos, se utilizaron cultivos de una noche de formas vegetativas de *PI* (para los resultados, véase la Tabla 1.1).

45 Se cultivaron *M. pl.* en Medio Basal (BM) líquido durante 4 días a 35 °C y se llevaron a cabo diluciones en serie desde aquí para estimar las UFC/ml colocándolas en placas de agar MB. 5 días más tarde se contaron las UFC y se estimó una concentración de $3,46 \cdot 10^6$ UFC/ml. Para el ensayo antimicrobiano, se añadió un inóculo de 50 µl del cultivo líquido a 1 ml de medio BM líquido. Se ensayó un conjunto de diferentes sustancias en las diferentes concentraciones (2, 5 y 10 ppm) con el fin de encontrar su efecto inhibitorio contra el crecimiento de *M. pl.* Para las sustancias ensayadas, la concentración aplicada y los resultados se ven en la Tabla 1.2. Se incluyeron en el experimento tres repeticiones por sustancia. 5 días después de comenzar el experimento, se midió la OE (extinción óptica) a 600 nm.

55 Los resultados que se muestran en las Tablas 1.1 y 1.2 indican que, para un ácido graso, la presencia de al menos un enlace doble es un pre-requisito para la actividad, mientras que esta característica solamente aumenta una actividad ya existente de lisofosfocolinas. Puede demostrarse claramente que los lisoderivados de fosfocolina son más potentes, pero también que el lisofosfatidilinositol no presentaba una actividad inhibitoria significativa señalando el hecho de que también tiene relevancia el grupo de cabeza de la colina. Por el protocolo utilizado para la purificación, se podía descartar la posibilidad de que el ácido láctico sea el compuesto responsable de la actividad antimicrobiana.

60

Tabla 1.1 Actividad antimicrobiana de los ácidos grasos y fosfolípidos contra *Paenibacillus larvae* (MIC en ppm)

Compuesto	MIC (ppm)	MIC (μ M)
Ácido linoleico ^{a,b}	0,5	1,8
Ácido oleico ^{a,b}	1	3,5
Ácido palmítico ^a	>20	>78
Ácido esteárico ^a	>20	>70
1-O-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina	2	>3,8
1-O-estearoil-sn-glicero-3-fosfocolina	5	>9,5
lisofosfatidilcolina (soja) ^c	2	
fosfatidilcolina (cerebro bovino) ^c	>50	
L- α -lisofosfatidilinositol	>50	>80
miltefosina	3	7,4
perifosina	2	4,3

^a se solubilizó utilizando DMSO, la concentración final no excedía el 5 % de DMSO en el caldo bacteriano, los experimentos se ejecutaron por triplicado

^b tóxico para las larvas de abeja melífera

^c el peso molecular no se ha definido exactamente debido a las mezclas con diferentes cadenas de ácido graso

Tabla 1.2 Actividad antimicrobiana de los ácidos grasos y fosfolípidos contra *Melissococcus plutonius* (MIC en ppm)

Compuesto	MIC (ppm)	MIC (μ M)
Ácido linoleico ^{a,b}	1	3,6
Ácido oleico ^{a,b}	1	3,5
Ácido palmítico ^a	>15	>40
Ácido esteárico ^a	>10	>35
1-O-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina	2	>3,8
1-O-estearoil-sn-glicero-3-fosfocolina	3	>5,7
lisofosfatidilcolina (soja) ^c	3	
fosfatidilcolina (cerebro bovino) ^c	>50	
L- α -lisofosfatidilinositol	>10	>15
miltefosina	2	4,9
perifosina	2	4,3

^a se solubilizó utilizando DMSO, la concentración final no excedía el 5 % de DMSO en el caldo bacteriano, los experimentos se ejecutaron por triplicado

^b tóxico para las larvas de abeja melífera

^c el peso molecular no se ha definido exactamente debido a las mezclas con diferentes cadenas de ácido graso

Ejemplo 2: Cría larvaria artificial

Se transfirieron larvas en primera fase en celdas de reina de plástico y se alimentaron con las siguientes dietas: El primer día se alimentaron con 10 µl de dieta que contenía un 6 % de glucosa, un 6 % de fructosa, un 1 % de extracto de levadura y un 50 % de jalea real. Se añadieron sustancias de ensayo (1-O-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (oleoil-LPC), ácido esteárico, lisofosfatidilinositol y ácido linoleico) a la primera dieta en cantidades de 0,5 a 10 µg/larva. Para la infección con esporas de *Paenibacillus larvae*, se injertaron 5 µl de dieta que contenía las sustancias de ensayo y posteriormente se les dieron 5 µl de dieta con aproximadamente 40 esporas de *Pl* añadidas. Las larvas no se alimentaron el segundo día para asegurar el consumo de la dieta dada. El tercer día se alimentaron con 20 µl de dieta que contenía un 7,5 % de glucosa, un 7,5 % de fructosa, un 1,5 % de extracto de levadura y un 50 % de jalea real. Se les alimentó con cantidades de 30, 40 y 60 µl de dieta compuesta por un 9 % de glucosa, un 9 % de fructosa, un 2 % de extracto de levadura y un 50 % de jalea real los días 4º, 5º y 6º (método modificado después de Aupinel et al. [Aupinel et al. 2005. Bull Insectol 58:107-111]. Las larvas se incubaron a 34,5 °C y un 95 % de humedad relativa que se redujo al 80 % el día 7. La mortalidad se comprobó diariamente durante los primeros 7 días y cuando los individuos emergían de las celdas de reina el día 18 después de la transferencia en las celdas. Para reducir el tiempo de esporulación de *Pl* en el laboratorio por razones de seguridad, los ensayos de infección con esporas de *Pl* se detuvieron el día 7 con algunos experimentos extendidos hasta el día 12.

El polen es parte de la dieta larvaria en condiciones normales. Su contenido lipídico, que es altamente variable, tiene un papel en la nutrición y la función de la membrana celular. Se ha establecido que los ácidos grasos libres tales como el ácido linoleico, que está presente en ciertos pólenes disminuyen la susceptibilidad de las larvas a la loque americana [Feldlaufer et al. 1993. Apidologie 24:95-99]. En condiciones de cría artificial, la dieta carece de polen, por lo tanto, la influencia de los lípidos del polen en la dieta se puede descartar. Los resultados de los inventores están de acuerdo con una influencia observada del polen en la susceptibilidad de las larvas de abeja melífera a la edad de 6-18 h a *Paenibacillus larvae* que se podría asignar a la presencia de lípidos tales como los lisofosfolípidos y ácidos grasos libres del polen [Rinderer et al. 1974. Journal of Invertebrate Pathology 23:347-350].

La Fig. 1 muestra las tasas de supervivencia (curvas de Kaplan-Meier) de cada una de las 48 larvas alimentadas con diferentes sustancias (véase la leyenda: no tratada – control; Lino – ácido linoleico 12 µg/larva; Ster – ácido esteárico 10 ng/larva; LPI – lisofosfatidilinositol – 5 µg/larva; LPC10 - 1-O-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina – 10 µg/larva).

En un experimento de cría experimental distinto utilizando una dieta larvaria enriquecida con penicilina G y estreptomocina en condiciones axénicas, los inventores descartaron la posibilidad de que la flora bacteriana del intestino medio es responsable de la actividad antimicrobiana del intestino medio de la abeja melífera. Los intestinos medios de dichos imagos ejercían la misma actividad antimicrobiana contra *Pl* que la que se encuentra en imagos criados naturalmente.

Ejemplo 3: Ensayos bacterianos y preparación de esporas**3.1. Ensayos antimicrobianos (ensayo de zona de inhibición y ensayo de medio líquido) utilizando formas vegetativas de *Paenibacillus larvae* (*Pl*)**

Como organismos de ensayo, se utilizaron varias cepas diferentes de *Paenibacillus larvae*.

Se prepararon cultivos de una noche de formas vegetativas de bacterias en medio BHI (infusión de corazón y cerebro) líquido.

A partir de estos cultivos de una noche, se añadió un inóculo de 50 µl a 1,0 ml de medio CHI líquido para llevar a cabo el ensayo bacteriano en medio líquido. Se añadieron entonces el compuesto 1-O-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (oleoil-LPC) junto con un control positivo a concentraciones de 2, 5 y 10 ppm y se incubaron los tubos de ensayo durante 24 h a 34,5 °C. Entonces se midió fotométricamente la extinción de la solución. Se descubrió que la concentración inhibitoria mínima (MIC) para 1-O-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina y miltefosina (Sigma-Aldrich) era entre 2 y 5 ppm.

Para el ensayo de zona de inhibición, se añadieron 500 µl del cultivo de una noche a 15-20 ml de agar Columbia, se mezclaron y se vertieron en una placa de Petri. Después de solidificarse el agar, se llenaron agujeros pinchados con diferentes cantidades de los compuestos de ensayo o se pipetearon los compuestos en discos de papel (5 mm de ø). La placa se incubó entonces durante 24 h (34,5 °C) y se midieron las zonas de inhibición y se dio en mm. Los resultados se dan en la Fig. 2 y la Tabla 3.1. Se utilizaron ácido láctico y penicilina G como controles positivos.

Leyenda de la Fig. 2:

CA – Agar Columbia
LPC- 1-O-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
LA – ácido láctico

C+ - control positivo (ácido láctico)
 C- - agua en disco de papel
 EII – Eric II (cepa de ensayo de *P*)

5 *Tabla 3.1:*

Compuesto	Cantidad (µg)	Zona de inhibición (mm)
LPC	5	3,5
LPC	10	5
LA (C+)	30	5
C-	10.000	0

3.2. Preparación de esporas y ensayo de esporas

10 Se utilizó una solución de reserva que contiene esporas a una concentración conocida para inocular con c. 100 esporas/ml de medio. Este ensayo se llevó a cabo en tubos de cultivo de 20 ml que contenían 1,0 ml de medio BHI (infusión de corazón y cerebro) líquido. . A este medio que contenía c. 50 esporas, se añadieron compuestos de ensayo a diferentes concentraciones (por ejemplo, 2, 5, y 10 ppm), junto con el control positivo (penicilina G a 5 ppm) y un control blanco.

15 Para verificar la inoculación con c. 100 esporas/ml, los tubos que contenían el BHI y las esporas se colocaron en placas inmediatamente en placas de agar para evaluar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) después de 6 días de incubación 34,5 °C.

20 Para el control de la viabilidad de las esporas, se evaluó la turbidez (debido a la germinación de esporas y la formación de formas vegetativas) de tubos que contenían BHI + esporas el día 4.

25 Para las sondas de ensayo, se evaluó el crecimiento bacteriano el día 4 y 6. Para los tubos que eran negativos para el crecimiento bacteriano, se colocó el medio completo (c. 1 ml) en placas de agar y se evaluó en cuanto a UFC después de 2 y 6 días de incubación. Las UFC visibles después de dos días resultaban de formas vegetativas, mientras que las UFC aparecieron después de 4 días brotaban de las esporas.

30 Los resultados de estos ensayos permiten identificar si los compuestos ensayados tienen un efecto sobre la germinación de esporas en medio líquido y la viabilidad de las esporas según se evalúa por su germinación en placas de agar.

35 Con el fin de comparar las UFC por condiciones de tratamiento (control, LPC a 5 y 10 ppm, miltefosina a 5 y 10 ppm añadidos al vial que contenía $114,6 \pm 28,4$ esporas durante 4 y 6 días), se llevó a cabo el ensayo de Kruskal-Wallis no paramétrico. Además, se llevaron a cabo comparaciones por parejas mediante el ensayo U de Mann-Whitney.

40 En total, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($\text{Chi}^2 = 36,73$, $p < 0,000$). Las comparaciones por parejas daban lugar a diferencias significativas entre los controles y todos los grupos de ensayo (ensayos U de Mann-Whitney: $p < 0,001$). Se encontraron diferencias significativas entre la LPC a 5 ppm después de 4 días de incubación (antes de colocar el contenido del vial en placas de agar) y LPC a 5 ppm después de 6 días de incubación ($p = 0,008$). No se encontraron diferencias significativas cuando se llevó a cabo la comparación para todos los toros grupos.

45 Estos resultados indican que, al germinar las esporas, se eliminaban todas las formas vegetativas con LPC y miltefosina incluso a la dosis más baja investigada.

Ejemplo 4: Ensayo de toxicidad y tolerancia

50 Las larvas se alimentaron de acuerdo con un método de cría de Aupinel et al., (2005) ligeramente modificado. Las larvas se alimentaron durante 6 días con diferentes cantidades de dietas que siempre contenía un 50 % de una solución acuosa (A, B, C) y un 50 % de jalea real (p/p). Las soluciones consistían en extracto de levadura (A = 2 %, B = 3 %, C = 4 %), glucosa y fructosa (A = 12 %, B = 15 %, C = 18 % cada una). Las porciones de jalea real de 50 g (adquiridas en la escuela Styrian de apicultores) se congelaron almacenándose a -20 °C. Una vez al día todos los componentes necesarios para la dieta se mezclaron en el momento, se calentaron y se administraron a las larvas con una micropipeta. El día 1 y 2 cada larva se alimentó con 10 µl de la dieta A, el día tres con 20 µl de la dieta B, el día cuatro (30 µl), cinco (40 µl) y seis (50 µl) con la dieta C. De esta manera, cada larva se sustentó con una cantidad total de 160 µl de alimento. Se añadieron los compuestos de ensayo (véase la Tabla 4) cada uno a la

concentración respectiva el día 1, es decir (10 µg/larva), lisofosfatidilinositol (5 µg/larva), ácido linoleico (12 µg/larva) y oleoil-LPC (10 µg/larva). Se comprobó el estado de salud de cada larva con un binocular antes de la alimentación. Una larva se definía como sana cuando se podían observar los movimientos de los espiráculos y estaba brillante y rolliza. Las celdas con larvas muertas se retiraban de la placa para evitar infecciones. Para evitar la contaminación microbiana, la alimentación tenía lugar bajo flujo laminar. Las larvas se incubaron a 34,5 °C y un 90 % de HR. Las tasas de mortalidad de las larvas se dan a continuación en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Tasa de mortalidad de las larvas alimentadas con diferentes lípidos respecto al control

Tratamiento	Control (no tratadas)	Ácido esteárico 10 µg/larva	LPI 5 µg /larva	Ácido linoleico 12 µg/larva	LPC 10 µg/larva
<i>N</i> larvas	525	96	96	48	192
<i>N</i> larvas muertas el día 1	0	0	0	0	0
<i>N</i> larvas muertas el día 2	2	0	0	18	7
<i>N</i> larvas muertas el día 3	2	1	0	2	1
<i>N</i> larvas muertas el día 4	3	0	0	3	1
<i>N</i> larvas muertas el día 5	1	1	1	1	0
<i>N</i> larvas muertas el día 6	2	3	1	1	0
<i>N</i> larvas muertas el día 7	5	1	2	1	4
<i>N</i> larvas muertas total	15	6	4	26	13

Efecto *in vivo* de la LPC sobre las larvas infectadas con *Pt*: La cría larvaria artificial se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente. Las larvas se infectaron individualmente con una dosis de c. 50 esporas/larva (ERIC II, cepa 233/00) que se administraron el primer día. Se administró LPC el día 1, 2 y 3 con una dosis de 10 µg/d. Se comprobó la mortalidad diariamente hasta el día 12. Los resultados se dan en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Tasa de mortalidad de larvas infectadas con esporas de *PI* y tratadas con LPC frente al control en tres repeticiones (las esporas se administraron el día 1, las dosis de LPC de 10 µg/larva cada una se aplicaron los días 1, 2 y 3)

Tratamiento	Control (no tratadas)	Tratadas con LPC 10 µg/larva	LPC+ 50 esporas/larva	50 esporas/larva
<i>N</i> larvas	48/48/48	70/48/47/48/40	71/48/48	71/48/48
<i>N</i> larvas muertas el día 1	0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0	0/0/0
<i>N</i> larvas muertas el día 2	0/0/0	0/2/0/0/0	1/0/0	1/1/1
<i>N</i> larvas muertas el día 3	1/0/0	0/0/3/0/0	3/2/4	14/15/11
<i>N</i> larvas muertas el día 4	0/0/0	1/0/1/0/1	11/5/8	16/7/10
<i>N</i> larvas muertas el día 5	1/1/0	0/0/0/0/0	7/2/0	7/3/0
<i>N</i> larvas muertas el día 6	2/0/0	1/1/0/0/1	1/1/1	2/1/1
<i>N</i> larvas muertas el día 7	1/0/1	0/0/1/0/0	1/1/0	2/1/1
<i>N</i> larvas muertas el día 8	0/0/0	2/0/0/0/0	0/0/1	0/0/0
<i>N</i> larvas muertas el día 9	0/1/0	1/2/0/3/0	0/0/0	0/1/1

ES 2 676 244 T3

$N_{\text{larvas muertas}}$ el día 10	1/0/0	2/0/0/0/0	2/0/0	2/0/0
$N_{\text{larvas muertas}}$ el día 11	0/1/0	0/1/0/0/1	0/1/0	0/0/0
$N_{\text{larvas muertas}}$ el día 12	0/0/0	2/0/0/0/0	0/0/0	0/0/0
$N_{\text{larvas muertas}}$ total	6/3/1	9/6/5/3/3	26/12/14	44/29/25
% Mortalidad	12,5/6,3/2,1	12,9/12,5/10,6/6,3/7,5	36,6/25,0/29,2	62,0/60,4/52,1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en un lisofosfolípido y un alquil-lisofosfolípido (ALP) para su uso en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades de la cría de abeja causadas por bacterias grampositivas.
2. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el tratamiento o la profilaxis de la loque americana.
- 10 3. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el tratamiento o la profilaxis de la loque europea.
4. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto es una lisofosfatidilcolina.
- 15 5. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la lisofosfatidilcolina comprende una cadena de ácido graso C₄-C₂₄ saturada o insaturada.
6. El compuesto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, en el que la lisofosfatidilcolina se selecciona de entre el grupo que consiste en 1-O-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina y 1-O-estearoil-sn-glicero-3-fosfocolina.
- 20 7. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la lisofosfatidilcolina es la 1-O-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina.
8. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el alquil-lisofosfolípido (ALP) es la hexadecilfosfocolina (miltefosina) o la 1,1-dimetilpiperidinio-4-il octadecil fosfato (perifosina).
- 25 9. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde se administra a una colonia de abejas melíferas una cantidad eficaz para eliminar las formas vegetativas de *Paenibacillus larvae* y/o para eliminar las formas vegetativas de *Paenibacillus larvae* que resultan de la germinación de esporas.
- 30 10. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que se administra a una colonia de abejas melíferas una cantidad eficaz para eliminar el *Melissococcus plutonius*.
- 35 11. Una composición para su uso en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades de la cría de abeja causadas por bacterias grampositivas, en donde la composición comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y en donde la composición se administra a una colonia de abejas melíferas.
- 40 12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la composición es una composición alimentaria o un aditivo alimentario añadido a una composición alimentaria para abejas melíferas.
13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende el compuesto en una concentración del 0,01-0,1 %, preferentemente del 0,01-0,05 %.
- 45 14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde es una composición pulverizable que se administra a una colonia de abejas mediante aplicación con pulverizador.
15. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la composición es una composición a base de liposomas, microesferas o nanoesferas.
- 50 16. Una solución de inmersión para los panales de cría para su uso en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades de la cría de abeja causadas por bacterias grampositivas, en donde la solución de inmersión comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el compuesto se administra a una colonia de abejas sumergiendo los panales de cría en la solución de inmersión, dando como resultado una concentración del compuesto en las celdas de cría del panal de cría eficaz para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades de la cría de abeja causadas por bacterias grampositivas.
- 55 17. Una composición de cera de abeja para su uso en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades de la cría de abeja causadas por bacterias grampositivas, en donde se añade un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 como principio activo a la composición de cera de abeja, dando como resultado una concentración del compuesto en las celdas de cría del panal de cría eficaz para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades de la cría de abeja causadas por bacterias grampositivas.
- 60

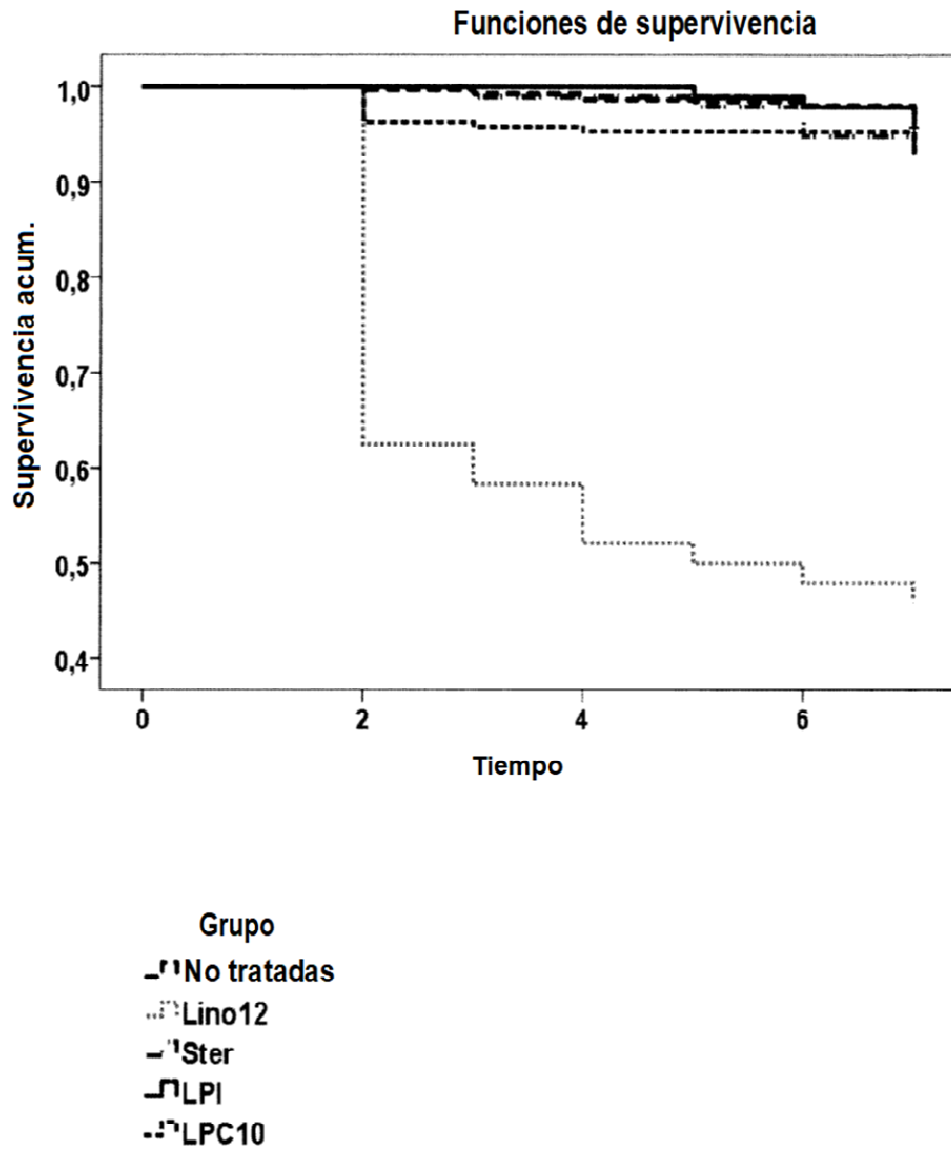


Fig. 1

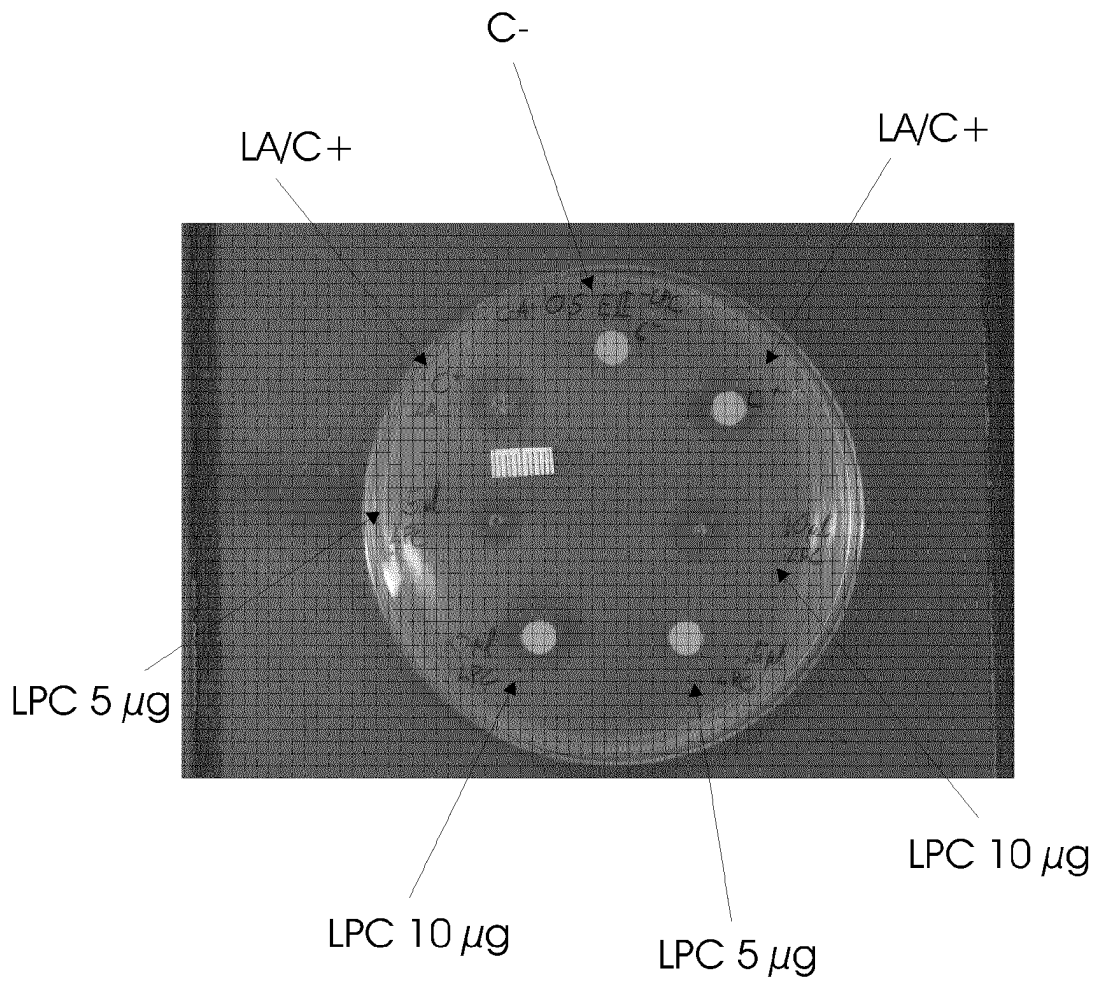


Fig. 2