

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 342 807**

21 Número de solicitud: 200802309

51 Int. Cl.:
A61K 35/74 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **01.08.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **14.07.2010**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
14.07.2010

71 Solicitante/s:
Universidade de Santiago de Compostela
Edificio CACTUS-CITT, Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES

72 Inventor/es: **Otero Casal, Ana María;**
Romero Bernárdez, Manuel y
Roca Rivada, Arturo

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Uso de bacterias del género *Tenacibaculum* para *Quorum Quenching*.**

57 Resumen:
Uso de bacterias del género *Tenacibaculum* para *Quorum Quenching*.
Uso de células bacterianas del género *Tenacibaculum*, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, capaces de degradar *N*-Acil homoserin lactonas, para *quorum quenching*, para el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas o para inhibir la formación de biofilms.

ES 2 342 807 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de bacterias del género *Tenacibaculum* para *Quorum Quenching*.

5 La presente invención se encuentra dentro de la biología y la biología molecular, y se refiere a especies del género *Tenacibaculum* capaces de degradar *N*-acil-homoserin lactonas (AHLs) para el control de enfermedades infecciosas bacterianas, y para evitar la formación de biofilms.

10 **Estado de la técnica anterior**

Numerosas especies bacterianas usan un mecanismo de regulación genética coordinada para responder a cambios en el entorno. Este mecanismo conocido como “*quorum sensing*” (QS) consiste en la producción y liberación de moléculas señal al medio donde se acumulan controlando la expresión de múltiples genes (Fuqua *et al.*, 1994. *J Bacteriol* 176: 269-275). Mediante la comunicación por QS las poblaciones bacterianas pueden coordinarse para ejecutar importantes funciones biológicas, muchas de ellas implicadas en la virulencia de importantes patógenos, como: movilidad, “*swarming*”, agregación, luminiscencia, biosíntesis de antibióticos, factores de virulencia, simbiosis, formación y diferenciación de biofilms, transferencia de plásmidos por conjugación,... (Williams *et al.*, 2007. *Phil Trans R Soc B* 362: 1119-1134).

Las señales de QS más estudiadas y conocidas son las *N*-acil-homoserin lactonas (AHLs) empleadas por numerosas bacterias Gram-negativas (Williams *et al.*, 2007. *Phil Trans R Soc B* 362: 1119-1134). Las AHLs, también conocidas como autoinducers (AIs), son una familia de moléculas señales usadas en el sistema de QS de muchas bacterias, principalmente Gram negativas, que se basan en un anillo lactona con una cadena lateral acilo de tamaño variable entre 4 y 14 carbonos, con o sin saturación y con o sin sustituciones Oxo- o Hidroxi- en el tercer carbono (Whitehead *et al.*, 2001. *FEMS Microbiol Rev* 25: 365-404). Como las poblaciones de especies bacterianas coordinadas por QS obtienen importantes ventajas competitivas en sus múltiples interacciones con otros procariotas y eucariotas, sus competidores han desarrollado mecanismos para interferir con su comunicación por sistemas QS, a estos mecanismos se les conoce como “*quorum quenching*” (QQ). Se basan en la producción de inhibidores que mimetizan las AHLs bloqueando el receptor, como las furanonas producidas por el alga marina *Delisea pulchra* (Givskov *et al.*, 1996. *J Bacteriol* 178: 6618-6622). Otra estrategia para bloquear los sistemas de QS mediados por AHLs es la degradación enzimática de las moléculas señal. Hasta el momento se han descrito dos tipos principales de enzimas que llevan a cabo esta degradación: las Lactonasas que hidrolizan el anillo lactona y las acilasas que rompen el enlace entre el anillo lactona y la cadena lateral (Dong *et al.*, 2007. *Phil Trans R Soc B* 362: 1201-1211).

Aunque la síntesis de quimioterápicos artificiales y el descubrimiento y mejora de los antibióticos han supuesto en el siglo pasado una auténtica revolución médica en el tratamiento de enfermedades infecciosas, el desarrollo de resistencia a antibióticos por parte de algunas bacterias patógenas es un grave problema mundial, que obliga a la industria farmacéutica a desarrollar nuevas generaciones de antibióticos más potentes, y que puede originar cepas multirresistentes en las que el tratamiento es más largo y con frecuencia ineficaz, llegando incluso a la muerte del paciente. La presión selectiva que se ejerce en el ambiente microbiano, el estado inmunitario del hospedero, los microambientes bacterianos y factores propios de las bacterias involucradas, tienen un papel importante en el desarrollo de la resistencia.

Debido a que gran cantidad de patógenos humanos (p. e.: *Pseudomonas putida*, *Serratia* spp,...), de plantas (p. e.: *Agrobacterium* spp., *Erwinia carotovora*,...) y patógenos marinos (p. e.: *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*,...) (Williams *et al.*, 2007. *Phil Trans R Soc B* 362: 1119-1134; Bruhn *et al.*, 2005. *Dis Aquat Org* 65: 43-52.) usan AHLs para el control de producción de factores de virulencia, la interferencia con estos sistemas de comunicación constituye una interesante y prometedora vía para el control de enfermedades infecciosas bacterianas (Dong & Zhang, 2005. *J Microbiol* 43: 101-109; Dong *et al.*, 2007. *Phil Trans R Soc B* 362: 1201-1211). Además este tipo de mecanismos en combinación con antibióticos puede ser una estrategia interesante en el tratamiento de enfermedades infecciosas por patógenos multirresistentes como *Pseudomonas aeruginosa*, en la que está descrito el control de QS sobre mecanismos de virulencia (Venturi, 2006. *FEMS Microbiol Rev* 30: 274-291) y otros patógenos de humanos, animales y plantas. El interés de las estrategias de QQ para el tratamiento de enfermedades infecciosas es que al no afectar directamente a la supervivencia del patógeno sino a la expresión de los factores de virulencia no ejercen presión selectiva evitando la aparición de resistencias.

60 **Descripción de la invención**

La presión selectiva que representa la aplicación a gran escala de los quimioterápicos ha permitido la diseminación de cepas microbianas con mecanismos de resistencia que, en muchas ocasiones dificultan el adecuado tratamiento clínico, llegando incluso a la muerte del paciente. Puesto que muchas bacterias usan el sistema de señales de QS para sincronizar la expresión genética y coordinar su actividad biológica dentro de una población, controlando la virulencia y la formación de biofilms entre otras funciones biológicas, una vía para evitar el aumento de mecanismos de resistencia de las bacterias patógenas sería controlar estos sistemas de señales QS. La inhibición de este sistema de señales es lo que se ha denominado *Quorum Quenching* (QQ). La presente invención proporciona los medios para controlar las infecciones bacterianas, sin ejercer presión selectiva sobre las poblaciones de estas bacterias y evitando

así la aparición de resistencias así como para la inhibición de otros procesos de colonización bacteriana en las que están implicadas las señales de QS tipo AHL, como la formación de biofilms. En la presente invención se describe por primera vez el uso de células bacterianas del género *Tenacibaculum* capaces de degradar las N-Acil-homoserin lactonas (AHLs), para el control de enfermedades infecciosas bacterianas y para la inhibición de la formación de biofilms.

Así, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de las células bacterianas del género *Tenacibaculum*, del extracto celular crudo o el sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para *quorum quenching*.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, las células bacterianas del género *Tenacibaculum*, el extracto celular crudo o el sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, se usan para degradar N-Acil-homoserin lactonas (AHLs).

Cualquier bacteria regula su expresión génica en respuesta a diferentes señales medioambientales, una propiedad esencial para competir con otros organismos. En el caso particular de bacterias patógenas, la regulación génica es crucial para permitir la supervivencia de la bacteria al particular ambiente que le ofrece su hospedador. Los genes de virulencia bacterianos están sujetos a complejos mecanismos de regulación para asegurar la expresión del gen apropiado en el momento apropiado. Las AHLs son las señales de QS más estudiadas y conocidas, y son empleadas por multitud de bacterias patógenas humanas, de plantas y marinas para el control de la producción de factores de virulencia.

Por tanto, una realización preferida de este aspecto de la invención es el uso de las células bacterianas del género *Tenacibaculum*, del extracto celular crudo o del sobrenadante de cultivos de dichas bacterias del género *Tenacibaculum*, o cualquiera de sus combinaciones, que son capaces de degradar N-Acil homoserin lactonas, y por tanto interferir con el sistema de señales de QS de bacterias, para elaborar un medicamento. En una realización aún más preferida, el medicamento se usa para el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas.

Los “biofilms” o “biopelículas”, tal y como se definen en esta memoria, son comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. Es una comunidad de bacterias (de una única especie o varias), que se adhiere a una superficie sólida. La inhibición de las AHLs permitiría inhibir la formación de biopelículas formadas por procesos controlados por QS.

Los biofilms producen una gran cantidad de polisacáridos extracelulares, responsables de la apariencia viscosa, y se caracterizan por una gran resistencia a agentes antibióticos. Esta resistencia puede deberse a que la matriz extracelular en la que se encuentran embebidas las bacterias proporciona una barrera frente a la penetración de biocidas. Otra posibilidad es que la mayoría de las células del biofilm crecen muy lentamente, en un estado de privación de comida, por lo que no son susceptibles al efecto de los agentes antimicrobianos. Un tercer aspecto podría ser que las células en el biofilm adoptasen un fenotipo distinto, por ejemplo, mediante la expresión de bombas efluentes de fármacos.

La contaminación biológica de superficies es común, pudiendo desarrollarse el biofilm sobre superficies hidrófobas, hidrófilas, bióticas o abióticas, y conduce a la degradación del material, productos de contaminación, bloqueo mecánico e impedancia de la transferencia de calor en procesos acuáticos. Los biofilms son también la primera causa de la contaminación biológica de sistemas de distribución de agua potable, y otras conducciones, siendo especialmente importante el control de biofilms en los sistemas antiincendios. El establecimiento de bacterias adheridas a los alimentos o a las superficies en contacto con los alimentos, conlleva serios problemas higiénicos e incluso casos de toxiinfecciones alimentarias, así como numerosas pérdidas económicas por los productos que se llegan a desechar (Carpentier & Cerf, 1993. *J App Bacter.* 75:499-511).

En acuicultura tiene especial relevancia la formación de biofilm en estructuras sumergidas tales como jaulas, redes y contenedores; o equipamiento tales como cañerías, bombas, filtros y tanques colectores, y para especies de cultivo, como mejillones, vieiras, ostras, etc. Se conoce como *biofouling* y afecta a todos los sectores de la acuicultura europea, siendo un problema creciente debido a la aplicación de la Directiva de Productos Biocidas EC 98/8/EC, resultando en sustanciales pérdidas económicas. Tiene además, repercusiones ecológicas importantes porque los organismos acuáticos que se afianzan a los cascos de los barcos como consecuencia del *biofouling* acompañan a estos navíos a donde quiera que vayan. Esto ha significado un problema ecológico mundial, ya que los barcos están trasladando especies invasoras hacia los lagos, los ríos y los océanos que no son su hábitat original.

Así, la fabricación de pinturas anti-incrustaciones con células bacterianas del género *Tenacibaculum*, el extracto celular crudo o el sobrenadante de los cultivos de dichas bacterias reduciría el biofouling en los cascos pintados con ella, sin tener elementos químicos tóxicos para la vida marina.

Por tanto, en otra realización preferida, las células bacterianas del género *Tenacibaculum*, el extracto celular crudo o el sobrenadante de los cultivos de dichas bacterias del género *Tenacibaculum*, se usan para inhibir la formación de biofilms.

ES 2 342 807 A1

Existen numerosas evidencias epidemiológicas que relacionan los biofilms con distintos procesos infecciosos en humanos (Tabla 1) (Wilson, 2001. *Sci Prog* 84: 235-254; Costerton *et al.*, 1999. *Science* 1999; 284: 1318-1322). Los mecanismos por los que el biofilm produce los síntomas de la enfermedad todavía no están completamente establecidos, pero se ha sugerido que las bacterias del biofilm pueden producir endotoxinas, se pueden liberar grupos de bacterias al torrente sanguíneo, se vuelven resistentes a la acción fagocitaria de las células del sistema inmune y por otro lado, constituyen un nicho para la aparición de bacterias resistentes a los tratamientos antibióticos. Este último aspecto puede ser especialmente relevante dado que las bacterias resistentes originadas en un biofilm podrían extenderse de paciente a paciente a través de las manos del personal sanitario.

Además este tipo de mecanismos en combinación con antibióticos puede ser una estrategia interesante en el tratamiento de enfermedades infecciosas por patógenos multirresistentes como *Pseudomonas aeruginosa*, en la que está descrito el control de QS sobre mecanismos de virulencia (Venturi, 2006. *FEMS Microbiol Rev* 30: 274-291) y otros patógenos de humanos, animales y plantas. Por tanto, una realización aún más preferida de este aspecto de la invención es el uso de las células.

TABLA 1

Procesos infecciosos humanos en los que interviene la formación de biofilm

Infección o enfermedad	Especie bacteriana formadora de biofilm
Caries dental	Cocos Gram positivos acidogénicos (ej. <i>Streptococcus</i>)
Periodontitis	Bacterias anaeróbicas orales Gram negativas
Otitis media	Cepas no tipables de <i>Haemophilus influenzae</i>
Infecciones del músculo-esquelético	Cocos Gram positivos (ej. <i>Staphylococcos</i>)
Fascitis necrotizante	<i>Streptococcos</i> Grupo A
Osteomielitis	Varias especies bacterianas y fúngicas
Prostatitis bacteriana	<i>E. coli</i> y otras bacterias Gram negativas
Endocarditis de la válvula nativa	<i>Streptococcos</i> del grupo viridans
Neumonía por fibrosis quística	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>
Meloidosis	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Enfermedades nosocomiales	
- Neumonía (cuidados intensivos)	Bacilos gram-negativos
- Suturas	<i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
- Orificios de salida	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
- Vías arteriovenosas	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
- Bucles esclerales	Cocos Gram positivos
- Lentes de contacto	<i>P. aeruginosa</i> y otros cocos Gram positivos

5	- Cistitis por catéteres urinarios	<i>E. coli</i> y otros bacilos gram-negativos
	- Periodontitis por diálisis peritoneal	Una variedad de bacterias y hongos
	- DIU	<i>Actinomyces israeli</i> y muchos otros
	- Tubos endotraqueales	Una variedad de bacterias y hongos
10	- Catéteres Hackman	<i>S. epidermidis</i> y <i>Candida albicans</i>
	- Catéteres centrales venosos	<i>S. epidermidis</i> y otros
	- Válvulas mecánicas del corazón	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
15	- Injertos vasculares	Cocos Gram positivos
	- Bloqueo del conducto biliar	Una variedad de bacterias entéricas y hongos
	- Dispositivos ortopédicos	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
20	- Prótesis del pene	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>

bacterianas del género *Tenacibaculum*, del extracto celular crudo o del sobrenadante de cultivos de dichas bacterias del género *Tenacibaculum*, que son capaces de degradar N-Acil homoserin lactonas, en combinación con antibióticos, para el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas o inhibir la formación de biofilms.

Las bacterias del género *Tenacibaculum* de la invención se caracterizan por ser capaces de degradar AHLs. Para llevar a cabo la presente invención se ensayaron distintas cepas de distintas especies del género *Tenacibaculum*. Así por ejemplo, esta actividad degradadora de AHLs fue detectada en diferentes ensayos con los biosensores: *Chromobacterium violaceum* CV026 con las AHLs: N-Hexanoil-L-homoserin lactona (C6-HSL) (Fig. 1A) y C10-HSL (Fig. 1B), *Escherichia coli* JM109 pSB536 ó pSB1075 con las AHLs: C4 y C12-HSL, y confirmada por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) con las AHLs C4, C6, C8, C10, C12 y C14-HSL (Para C4 y C12-HSL, Fig. 2).

La información que se proporciona en esta memoria es suficiente para permitir a un experto en la materia identificar a otras cepas y otras especies que estén dentro de este género.

El género *Tenacibaculum* fue descrito por Suzuki *et al.* en 2001 (Suzuki *et al.*, 2001. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51: 1639-1652) en base a sus características filogenéticas, quimiotaxonómicas y fenéticas, combinando dos especies del género *Flexibacter* (*F. maritimus* y *F. ovolyticus*), describiendo *Tenacibaculum maritimum* como la especie tipo, y otras dos especies nuevas para el género, *Tenacibaculum mesophilum* y *Tenacibaculum amylolyticum*. Posteriormente se han añadido otras especies al género, existiendo en la fecha de redacción de esta memoria, un total de 14 especies aceptadas:

Tenacibaculum adriaticum Heindl *et al.* 2008.

Tenacibaculum aestuarii Jung *et al.* 2006.

Tenacibaculum aiptasiae Wang *et al.* 2008.

Tenacibaculum amylolyticum Suzuki *et al.* 2001.

Tenacibaculum discolor Piñeiro-Vidal *et al.* 2008.

Tenacibaculum gallaicum Piñeiro-Vidal *et al.* 2008.

Tenacibaculum litopenaei Sheu *et al.* 2007.

Tenacibaculum litoreum Choi *et al.* 2006.

Tenacibaculum lutimaris Yoon *et al.* 2005.

Tenacibaculum maritimum (Wakabayashi *et al.* 1986) Suzuki *et al.* 2001,

Tenacibaculum mesophilum Suzuki *et al.* 2001.

Tenacibaculum ovolyticum (Hansen *et al.* 1992) Suzuki *et al.* 2001.

Tenacibaculum skagerrakense Frette *et al.* 2004.

Tenacibaculum soleae Piñeiro-Vidal *et al.* 2008.

5 Por las especiales características de estos organismos, que aún no se han estudiado en profundidad, y por las dificultades que supone su descripción, ésta será más fácil y fiable si su delimitación taxonómica se basa en métodos de biología molecular.

10 Así, en la identificación de un microorganismo como perteneciente al género *Tenacibaculum* son aplicables los parámetros siguientes, sea aisladamente o en combinación con los anteriores. Dado que las cepas de *Tenacibaculum* son afines en cuanto a su evolución, puede esperarse que la homología global de los genomas al nivel de los nucleótidos, y más concretamente a nivel de la región 16 S del ARN ribosómico nuclear, y más concretamente al polinucleótido de la región 16S del ARN ribosómico nuclear que se recoge en la SEQ ID NO: 1, y que pertenece al microorganismo depositado en el CECT con número 7426 el 18 de junio de 2008 y que en este documento se denomina como *T. discolor* cepa 20J, sea de un 80% o mayor, y más preferiblemente de un 85%, de un 90%, de un 95% o mayor. La correspondencia entre la secuencia genómica de la(s) cepa(s) de *Tenacibaculum* putativa(s) y la secuencia de otro microorganismo se puede determinar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, aquéllas se pueden determinar por una comparación directa de la información de secuencia del polinucleótido procedente del *Tenacibaculum* putativo, y la secuencia del polinucleótido de la SEQ ID NO: 1 de esta memoria. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, 1999. *J Mol Biol* 215: 403-410). Por ejemplo, también, aquéllas se pueden determinar por hibridación de los polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homologas, seguido por digestión con nucleasa(s) específica(s) monocatenaria(s), seguido por determinación del tamaño de los fragmentos digeridos.

25 El porcentaje de homología se ha determinado midiendo la identidad entre el polinucleótido que se muestra en la SEQ ID NO: 1 (perteneciente a la cepa del género *Tenacibaculum* depositada en el CECT) y todos los polinucleótidos homólogos del género *Tenacibaculum* que se encontraban recogidos en el momento de escritura de esta memoria, en el GenBank. Tras este análisis cabe pensar que un organismo que pertenezca al género *Tenacibaculum* tendrá un polinucleótido homólogo al de la SEQ ID NO: 1, perteneciente a la región 16S de su RNA ribosómico nuclear, que presente, al menos, una identidad del 80% con éste.

30 Otro aspecto de la invención se refiere a una cepa de células bacterianas del género *Tenacibaculum*, que han sido depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con el número CECT 7426. Dicha cepa bacteriana se ha identificado como perteneciente a la especie *Tenacibaculum discolor*, y la secuencia de polinucleótidos de la región ribosómica 16S se recoge parcialmente en la SEQ ID NO: 1.

35 En relación con otras cepas de bacterias con actividad QQ, la cepa con número de depósito CECT 7426 presenta una elevada actividad degradadora, alta inespecificidad, siendo capaz de degradar todas las AHLs probadas con cadenas de entre 4 y 14 carbonos en un periodo de 24 horas según datos obtenidos mediante cuantificación por LC-MS, buen crecimiento, capacidad de crecer en medios marinos y no marinos, y carácter constitutivo de la actividad QQ que deriva de la degradación inmediata de AHLs (no es necesaria la exposición de la bacteria a AHLs para que se active).

40 Se trató de determinar el tipo de actividad enzimática de *Tenacibaculum discolor* de la cepa depositada con número de acceso CECT 7426, para ello se acidificó a pH 2.0 tras la degradación. Se observó una recuperación de C4 (Fig. 2) y C6-HSL (Fig. 1A) tras la acidificación, indicando una actividad del tipo lactonasa, porque el pH ácido cierra el anillo lactona. Sin embargo no se recupera C10-HSL (Fig. 1B) y C12-HSL (Fig. 2), lo que indica la presencia de una doble actividad enzimática: lactonasa para AHLs de cadena lateral corta y acilasa para AHLs de cadena lateral larga. Esto está apoyado por la distinta cinética de degradación observada para 30 μ M C4-HSL y C12-HSL, que fue determinada por LC-MS (Fig. 4). La cepa 20J degrada toda la C12 en 30 min y la C4 en 8 horas (Fig. 4). La actividad degradadora se encuentra tanto en el sobrenadante como en el extracto celular crudo (CCE) de cultivos (Fig. 5), lo que posibilita la utilización de la cepa viva o de extractos celulares crudos o purificados para sus aplicaciones biotecnológicas.

45 La alta capacidad degradadora y amplio rango de especificidad mostrada por los enzimas de las bacterias del género *Tenacibaculum*, miembros del grupo *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroidetes* (CFB), contra el rango de tamaños de cadena lateral de AHL: C4-C14 lo convierte en un candidato prometedor para el control de patógenos con QS basado en AHL en salud humana, cultivos marinos, animales y plantas, así como para la inhibición de la formación de biopelículas formadas por procesos controlados por QS.

50 Así, en una realización preferida de este aspecto de la invención la célula bacteriana del género *Tenacibaculum* con el número de depósito CECT 7426, el extracto celular crudo o el sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, se usa para *quorum quenching*. En una realización más preferida, se usa para degradar N-Acil homoserin lactonas. En otra realización aún más preferida se usa para elaborar un medicamento. En otra realización aún mucho más preferida, el medicamento se usa para el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas. En otra realización preferida, se usa para inhibir la formación de biofilms. En otra realización aún más preferida se usa en combinación con antibióticos u otros agentes antibacterianos. En una realización aún más preferida las bacterias causantes de la enfermedad infecciosa o de la formación del biofilm son bacterias Gram negativas.

ES 2 342 807 A1

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende:

- a. una célula bacteriana perteneciente al género *Tenacibaculum*,
- b. el extracto celular crudo de un cultivo bacteriano de la célula bacteriana de a),
- c. el sobrenadante del cultivo bacteriano de a),

o cualquiera de sus combinaciones, para su uso como agente antibacteriano.

Un agente antibacteriano es una sustancia química natural (sintetizadas por hongos o bacterias) que inhibe el crecimiento (bacteriostático) o mata a las bacterias (bactericida).

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención, que comprende:

- a. una célula bacteriana perteneciente al género *Tenacibaculum*,
- b. el extracto celular crudo de un cultivo bacteriano de la célula bacteriana de a),
- c. el sobrenadante del cultivo bacteriano de a),

o cualquiera de sus combinaciones, para la elaboración de un medicamento.

En una realización preferida, la composición de la invención se usa para el tratamiento de infecciones bacterianas. En otra realización preferida, la composición de la invención se usa para elaborar un medicamento para el tratamiento de infecciones bacterianas. Los biofilms bacterianos son una causa común de infecciones bacterianas, tanto en humanos (Costerton *et al.*, 1999. *Science* 284: 1318-1322), como en animales y plantas. En otra realización preferida, la composición de la invención se usa para inhibir la formación de biofilms. En otra realización preferida, la composición de la invención se usa en combinación con otros agentes antibacterianos. En una realización aún más preferida, las bacterias que provocan la formación de biofilm y/o la infección son bacterias Gram negativas.

El término “medicamento”, tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre, animales y plantas. En el contexto de la presente invención las enfermedades son provocadas por la infección de bacterias patógenas.

El término “infección” es el término clínico para describir la colonización de un organismo huésped por organismos de otras especies. En la utilización clínica del término infección, el organismo colonizador es perjudicial para el funcionamiento normal y supervivencia del huésped, por lo que se califica al microorganismo como patógeno.

El término “género”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la categoría de la clasificación biológica (categoría taxonómica) que comprende una o más especies relacionadas filogenéticamente y morfológicamente similares. También se espera que compartan características químicas y metabólicas similares.

Por “categoría taxonómica” se entiende el nivel de jerarquía utilizado para la clasificación de los organismos.

El término “polinucleótido”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una forma polímera de nucleótidos de cualquier longitud, sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable y se refieren exclusivamente a la estructura primaria de la molécula.

El término “homología”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más concretamente, a la semejanza entre los nucleótidos de dos o más polinucleótidos.

El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos idénticos entre dos polinucleótidos homólogos que se comparan.

El término “genotipo”, tal como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la constitución hereditaria o genética de un individuo; todo el material genético contenido en una célula, al que, por lo general, se denomina material nuclear.

El término “fenotipo”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la suma total de las propiedades estructurales y funcionales observables de un organismo; producto de la interacción entre el genotipo y el medio ambiente.

El término “especie tipo” hace referencia a la especie designada como el tipo de un género o un subgénero, siendo el “tipo” bajo el punto de vista taxonómico, el elemento simple de un taxón al cual se le asigna permanentemente el nombre y sobre el que están basadas las características descriptivas que satisfacen las condiciones de disponibilidad o de publicación válidas.

El medio de cultivo empleado para el crecimiento de las células bacterianas puede ser cualquier medio conocido en el estado del arte. Preferiblemente el medio contiene los componentes que comprenden el medio ambiente de donde se coge la muestra. Por ejemplo, el medio de cultivo de bacterias marinas contiene preferiblemente sales marinas. El soporte sólido para crecer colonias aisladas individuales puede ser agar, agar noble, Gel-Rite o cualquier otro medio sólido conocido en el estado del arte.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig. 1. Ensayo con *Chromobacterium violaceum* CV026 para detectar degradación por *Tenacibaculum discolor* 20J de 2 μ M C6-HSL (A) y C10-HSL (B) en relación con controles antes (C) y después de acidificar a pH 2.0 (C Ac).

Fig. 2. Ensayo con las cepas indicadoras *Chromobacterium violaceum* CV026 y *C. violaceum* VIR07 para detectar degradación por *Tenacibaculum discolor* 20J y de *T. maritimum* de 2 μ M C6-HSL (A) y C10-HSL (B), donde se observa que *T. maritimum* no degrada C6-HSL.

Fig. 3. Porcentaje de degradación de C4-HSL (barras negras) y C12-HSL (barras blancas) por *Tenacibaculum discolor* 20J sin y con acidificación (Ac) en relación a controles (C) (50 μ M) cuantificada mediante Lc-MS.

Fig. 4. Cinética de degradación de C4-HSL (4A) y C12-HSL (4B) por cultivos vivos de la cepa *T. discolor* 20J medida por LC-MS. Concentración inicial de las AHLs: 30 μ M.

Fig. 5. Actividad degradadora de C4-HSL (5A) y C12-HSL (5B) en cultivos celulares completos de la cepa *T. discolor* 20J, extractos crudos celulares (CCE) y sobrenadante (SUP) después de 24 horas. La cuantificación de las AHLs se llevó a cabo por LC-MS. Los extractos se midieron con y sin acidificación para estimar el grado de posible actividad lactonasa presente. Concentración inicial de las AHLs: 50 μ M.

Exposición detallada de modos de realización

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de distintas cepas de distintas especies del género *Tenacibaculum* para degradar N-Acil homoserin lactonas.

Metodología de aislamiento de las cepas bacterianas marinas

Para la detección de bacterias marinas con actividad *quorum quenching* (QQ) de señales tipo AHL se procedió al aislamiento de colonias procedentes de muestras de diferentes medios marinos.

Se tomaron tres tipos de muestras con material estéril:

- Muestra de sedimento de un tanque-reservorio de agua de mar de un circuito cerrado para el cultivo de peces de la Universidad de Santiago de Compostela.
- Muestra de biopelícula de un tanque de cemento para el cultivo marino de peces en circuito abierto del instituto IGafa (isla de Arosa).
- Muestra de alga *Fucus* sp. obtenida de un sustrato rocoso intermareal en la IIIa de Arousa. 1 g del alga fue troceado y diluido en 10 ml de agua de mar esterilizada.

Los medios sólidos empleados para el aislamiento fueron: Triptona soja agar (TSA) 1% NaCl, Agar marino (AM, Difco), Agar marino en dilución 1/100, medio FAS suplementado con 1 g/L de casaminoácidos (FAS CAS) (Schut *et al.*, 1993. *Appl Environ Microbiol* 59: 2150-2160) y medio FAS suplementado con 0.5 g/L de los polímeros agarosa, quitina y almidón (FAS POL) (Bruns *et al.*, 2002. *Appl Environ Microbiol* 8: 3978-3987). Se prepararon 3 diluciones (1/10, 1/100 y 1/1000) en agua de mar esterilizada para cada una de las muestras y se sembraron en placas con los medios de cultivo nombrados. Las placas fueron incubadas a 15 y 22°C durante 15 días. Se aislaron un total de 165 colonias en función de su diferente morfología y tonalidad para el análisis de actividad QQ. Puesto que las 165 cepas obtenidas presentaban crecimiento en AM a 22°C, se seleccionaron estas condiciones de cultivo como método de cultivo estándar y para su mantenimiento en el laboratorio.

65 Detección de actividad QQ

Las 165 cepas aisladas fueron ensayadas para su actividad QQ utilizando dos tipos de ensayos: en medio líquido y sólido.

Las AHLs utilizadas en el ensayo líquido para detectar la capacidad degradadora/inhibidora de las cepas fueron N-Butiril-L-homoserín lactona (C4-HSL) como representante de las AHLs de cadena corta y N-Dodecanoil-L-homoserín lactona (C12-HSL) como representante de AHLs de cadena larga. Para cuantificar las AHLs se utilizaron dos biosensores de *E. coli* JM109 transformados cada uno con un plásmido portador del operón lux, para la detección de C4-HSL (pSB536) y para la detección de C12-HSL (pSB1075). Los biosensores se cultivaron a 37°C en medio LB suplementado con el antibiótico adecuado (Winson *et al.*, 1998. *FEMS Microbiol Lett* 163:185-192).

Cada aislado marino se inoculó en tubos eppendorf con 1 mL de Caldo Marino (CM) y se incubó a 22°C y 200 rpm. Tras 24 horas de incubación el cultivo fue dividido en dos microtubos y centrifugado a 2000 x g durante 5 min. Los correspondientes pellets fueron resuspendidos en CM fresco con 50 µM C4-HSL ó C12-HSL e incubados durante otras 24 horas a 22°C y 200 rpm para permitir la posible degradación de las AHLs. Una vez incubados, los cultivos se centrifugaron a 2000 x g, 5 min y se pipetearon 10 µL de sobrenadante en una placa microtiter para cuantificar la actividad AHL. Ésta se midió mediante la adición de 90 µL de una dilución 1/100 de cultivos de 12 horas a 37°C 200 rpm de las cepas biosensoras basadas en lux, *E. coli* JM109 pSB536 ó pSB1075 antes mencionadas, usando un luminómetro (Ultra Evolution Xfluor4beta E 4.51e) tras 4 horas de incubación a 37°C de las placas microtiter. Se dispusieron diferentes placas para cada AHL y biosensor. Como controles se usaron pocillos con 10 µL de CM con y sin C4-HSL ó C12-HSL 50 µM.

Para el ensayo sólido se utilizaron dos biosensores derivados de la especie *Chromobacterium violaceum* en los que la producción del exopigmento violaceína es dependiente de la presencia de AHLs en el medio de cultivo. La cepa *C. violaceum* CV026 se utilizó inicialmente para la comprobación de los resultados obtenidos en los bioensayos realizados en medio líquido con las cepas de *E. coli*, permitiendo la detección de la degradación de N-hexanoil-L-homoserín lactona (C6-HSL, McClean *et al.*, 1997. *Microbiol* 143: 3703-3711). Con posterioridad se confirmó la capacidad de degradación de C10-HSL utilizando la cepa *C. violaceum* VIR07 (Morohoshi *et al.*, 2008. *FEMS Microbiol Lett* 279: 124-130). Las cepas marinas aisladas se inocularon en tubos con 1 mL de CM a 22°C y 200 rpm. Tras 24 horas se centrifugaron 500 µL de los cultivos a 2000 x g, durante 5 min y se resuspendieron en 500 µL de CM al que se añadió C6-HSL ó C10-HSL 2 µM, incubándose durante otras 24 horas. Para la evaluación de la degradación de las AHLs, se colocaron 50 µL de los sobrenadantes de estos cultivos en pocillos realizados con un sacabocados en placas de LB cubiertas con LB blando inoculado con 500 µL de un cultivo de 12 horas de *C. violaceum* CV026 ó *C. violaceum* VIR07, añadiéndose 50 µL de agua destilada estéril para completar el volumen del pocillo. Tras 24 horas de incubación a 25°C se observó la producción de violaceína.

En algunos casos, para la detección de la degradación de AHLs de cadena larga se utilizó el ensayo de inhibición de producción de violaceína con la cepa *C. violaceum* CV026 (Fig. 1B). En este caso, para evaluar la degradación de C10-HSL se prepararon placas de LB cubierto con LB blando inoculado con la cepa sensora a la que se le añadió su AHL afín, C6-HSL. En este caso la presencia de C10-HSL produce un halo de inhibición en la producción de violaceína inducida por la C6-HSL. La degradación de C10-HSL se detecta en este ensayo por la desaparición o disminución del halo de inhibición (McClean *et al.*, 1997. *Microbiol* 143: 3703-3711).

La identificación de la cepa bacteriana que degradó AHLs se realizó por amplificación directa por PCR del gen del 16S rRNA, secuenciación parcial del mismo (con lecturas en las dos direcciones) y análisis de las secuencias.

A continuación se realizó un análisis BLAST de las secuencias frente a las bases de datos del NCBI, recogiendo la extensión del fragmento solapado, el porcentaje de semejanza y el nombre del microorganismo con un mayor grado de identidad de secuencia. Así, la cepa 20J se identificó como *Tenacibaculum discolor* con una semejanza de 1018/1019 pb (99,9%) sobre la secuencia AM411030 (cepa tipo DSM 18842).

Adicionalmente se probaron otras cepas de distintas especies del mismo género (Tabla 2) para ver si presentaban actividad degradatoria de AHLs. Todas las cepas y especies ensayadas degradaron tanto C6-HSL como C10-HSL, a excepción de *T. maritimum*, que no degradó C6-HSL (Fig. 2).

TABLA 2

Cepas de distintas especies del género Tenacibaculum ensayadas

CEPA	C6-HSL	C10-HSL
<i>T. maritimum</i> NCIMB2154	-	+
<i>T. discolor</i> 20J (aislado propio)	+	+
<i>T. discolor</i> DSM 18842	+	+
<i>T. soleae</i> NCIMB 14368	+	+
<i>T. gallaicum</i> DSM 18841	+	+

Especificidad de la actividad QQ

Se seleccionó *Tenacibaculum discolor* 20J por ser el único aislado con actividad QQ contra las tres AHLs testadas inicialmente (C4-HSL, C6-HSL y C12-HSL), para determinar el tipo de actividad QQ que presentaba y su especificidad contra un rango más amplio de longitud de cadena lateral de AHL mediante LC-MS, técnica analítica que permite comprobar de forma inequívoca la degradación de las AHLs.

La cepa fue inoculada en 20 mL de CM e incubada a 22°C y 200 rpm; tras 24h se tomaron muestras de 500 µL para su centrifugación. Los pellets se resuspendieron en 500 µL de CM, con AHL 50 µM (C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL ó C14-HSL) y fueron incubados otras 24 horas a 22°C y 200 rpm. Los sobrenadantes (2000 x g 5 min) de estos cultivos se extrajeron tres veces con el mismo volumen de Etil-Acetato y se evaporaron bajo flujo de nitrógeno. El extracto seco obtenido se resuspendió en 200 µL de acetonitrilo y se procedió a la cuantificación de las AHLs por LC-MS. De la misma forma se extrajeron muestras control con 500 µL de CM más AHL 50 µM.

El sistema LC utilizado fue un Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Con columna: Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 x 4.6 mm (tamaño de partícula de 5 µm). La fase móvil: ácido fórmico al 0.1% en agua (A) y metanol (B), y la velocidad de flujo de 0.4 mL/min. El gradiente establecido fue el siguiente: 50%B de 0 a 10 min, seguido de un gradiente lineal del 50 al 90%B durante 15 min, seguido de 90%B durante 25 min (Morin *et al.*, 2003. *J Chromatogr A*, 1002:79-92). La columna se reequilibró durante 4 min. En la columna se inyectó un volumen de 20 µL de muestra diluida en ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo. El MS utilizado fue un API4000 triple-quadrupolo con trampa de iones lineal (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), en modo electrospray de iones positivos. Como estándares para la identificación y cuantificación de las AHLs presentes en las muestras se utilizaron AHLs sintéticas de longitudes de cadena de 4 a 14 carbonos. La cuantificación de AHLs en las muestras se realizó mediante extrapolación en curvas de calibración obtenidas a partir de la abundancia de los iones moleculares obtenidos para cada AHL patrón con concentración conocida (Milton *et al.*, 2001. *J Bacteriol* 183: 3537-3547).

Para determinar el tipo de actividad enzimática degradadora de AHLs (acilasa o lactonasa) presente en *Tenacibaculum discolor* 20J se llevaron a cabo dos tipos de ensayos: Duplicados de los cultivos anteriormente descritos a los que se habían añadido C4-HSL y C12-HSL se acidificaron hasta pH 2,0 con HCl 1M y se incubaron 24 horas más en las mismas condiciones para la posterior extracción de AHLs y cuantificación por LC-MS. La acidificación del medio de cultivo permite la recuperación de la actividad AHL solamente en el caso de que la molécula haya sido degradada por una lactonasa (Yates *et al.*, 2002. *Infect Immun* 70: 5635-5646). Paralelamente se realizó un ensayo en sólido con *C. violaceum* CV026 para las AHLs: C6-HSL, C10-HSL y C12-HSL, con y sin acidificación hasta pH 2,0 (Yates *et al.*, 2002. *Infect Immun* 70: 5635-5646).

Cinética de degradación de AHLs

Se incubaron a 22°C y 200 rpm 60 mL de CM inoculados con *Tenacibaculum discolor* 20J. Tras 24 horas, el cultivo fue dividido y centrifugado (2000 x g 5 min), y el pellet se lavó dos veces con 10 mL de PBS pH 6,5. En las dos suspensiones celulares así obtenidas se añadió C4-HSL ó C12-HSL a una concentración final de 30 µM. Las mezclas de reacción fueron incubadas a 22°C y 200 rpm durante 24 horas y se fueron tomando muestras de 500 µL a diferentes tiempos desde el tiempo 0. Estas muestras se extrajeron mediante el procedimiento anteriormente descrito y las concentraciones de C4-HSL ó C12-HSL restantes en cada muestra se determinaron por LC-MS (Milton *et al.*, 2001. *J Bacteriol* 183: 3537-3547).

Localización de la actividad de degradación de AHLs

Para determinar la localización celular de la actividad degradadora de AHLs, se obtuvo el sobrenadante y extracto celular crudo (CCE) de un cultivo de 24 horas de *Tenacibaculum discolor* 20J en 15 mL de CM. Se centrifugó el cultivo durante 5 minutos a 2000 x g para separar la biomasa del medio de cultivo. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y fue almacenado a 4°C hasta su utilización. El pellet se lavó con 15 mL de PBS pH 6,5, se resuspendió en otros 5 mL del mismo tampón, se sonicó durante 5 minutos en hielo y se centrifugó a 16000 x g durante 90 min a 4°C. El CCE así obtenido se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenó a 4°C (Uroz *et al.*, 2005. *Microbiol* 151: 3313-3322).

Con el sobrenadante y el CCE de *Tenacibaculum discolor* 20J se realizaron dos ensayos:

- Un ensayo en sólido con *C. violaceum* CV026 como se describió anteriormente. Se incubaron 500 µL de sobrenadante y de CCE durante 24 horas con C6 ó C10-HSL 20 µM a 22°C y 200 rpm. Los controles se incubaron de la misma forma, con 500 µL de CM ó PBS C6 ó C10-HSL 20 µM.
- Otro ensayo con 500 µL de sobrenadante y de CCE incubados 24 horas con C4 ó C12-HSL 50 µM a 22°C y 200 rpm con o sin acidificación hasta pH 2,0 con HCl 1M (24 horas más a 22°C y 200 rpm). Las concentraciones de las AHLs tras este ensayo fueron cuantificadas por LC-MS como se describió anteriormente. Los resultados se compararon con la degradación del cultivo completo (bacteria viva) incubado en las mismas condiciones y con controles de CM fresco con C4 ó C12-HSL 50 µM.

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de una célula bacteriana del género *Tenacibaculum* cuya región 16S del ARNr presenta una identidad de al menos un 80% con la secuencia polinucleotídica homóloga recogida en la SEQ ID NO: 1, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para degradar N-Acil homoserin lactonas y provocar *quorum quenching*.

10 2. Uso de una célula bacteriana del género *Tenacibaculum*, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, según la reivindicación anterior, para elaborar un medicamento.

15 3. Uso de una célula bacteriana del género *Tenacibaculum*, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para elaborar un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas.

15 4. Uso de una célula bacteriana del género *Tenacibaculum*, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para inhibir la formación de biofilms.

20 5. Uso de una célula bacteriana del género *Tenacibaculum*, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en combinación con antibióticos u otros agentes antibacterianos.

25 6. Uso de una célula bacteriana, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, según cualquiera de las reivindicaciones 3-5, donde las bacterias causantes de la enfermedad infecciosa o de la formación del biofilm son bacterias Gram negativas.

30 7. Cepa de células bacterianas de la especie *Tenacibaculum discolor* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con el número de depósito CECT 7426.

30 8. Uso de la célula bacteriana del género *Tenacibaculum* según la reivindicación anterior, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

35 9. Composición que comprende:
a. una célula bacteriana del género *Tenacibaculum* como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 7,
b. el extracto celular crudo de un cultivo bacteriano de la célula bacteriana de (a),
40 c. el sobrenadante del cultivo bacteriano de (b),

o cualquiera de sus combinaciones, para su uso como agente antibacteriano.

45 10. Uso de la composición según la reivindicación anterior, para la elaboración de un medicamento.

11. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 9-10, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de infecciones bacterianas.

50 12. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en combinación con antibióticos u otros agentes antibacterianos.

13. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 9-12 donde la formación de biofilm o las infecciones bacterianas son provocadas por bacterias Gram negativas.

55 14. Uso de la composición según la reivindicación 9 para inhibir la formación de biofilms.

60

65

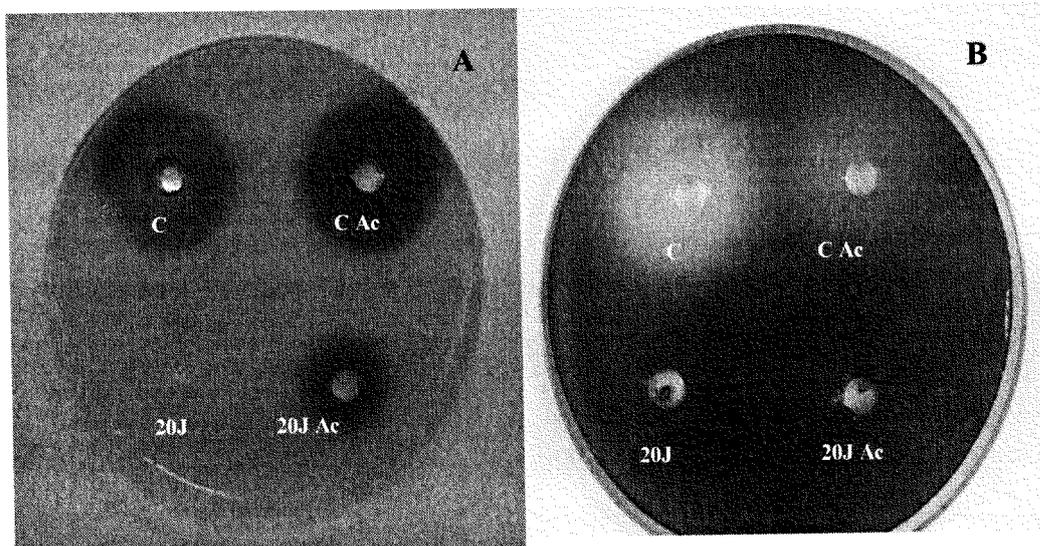


FIG. 1

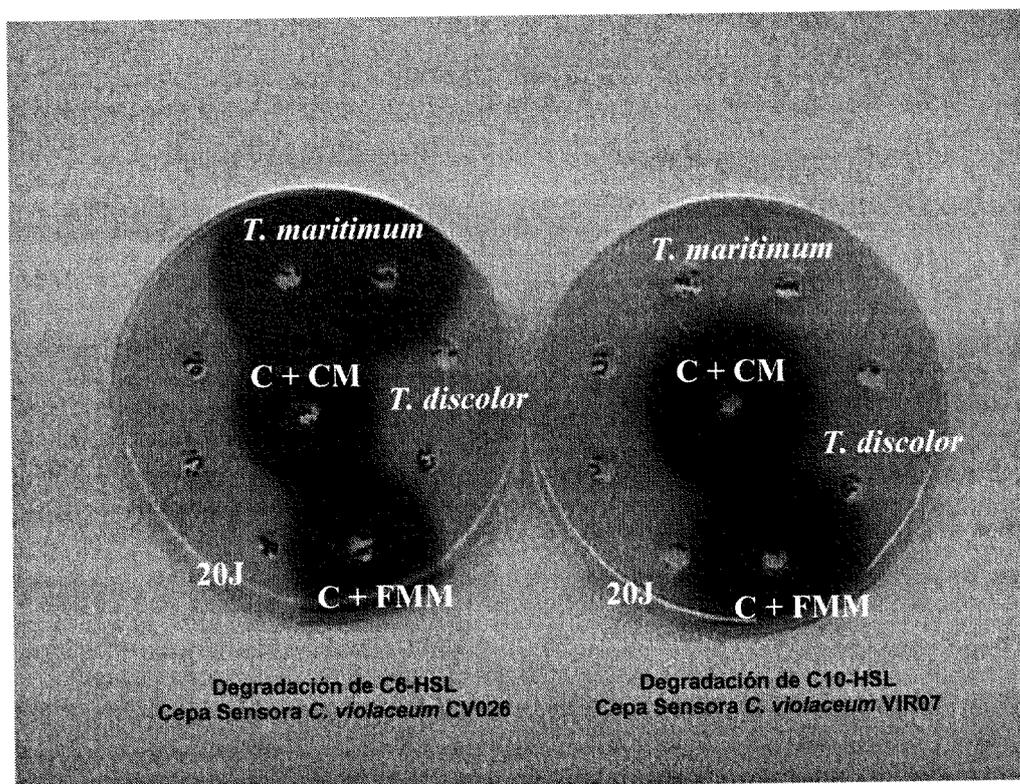


FIG. 2

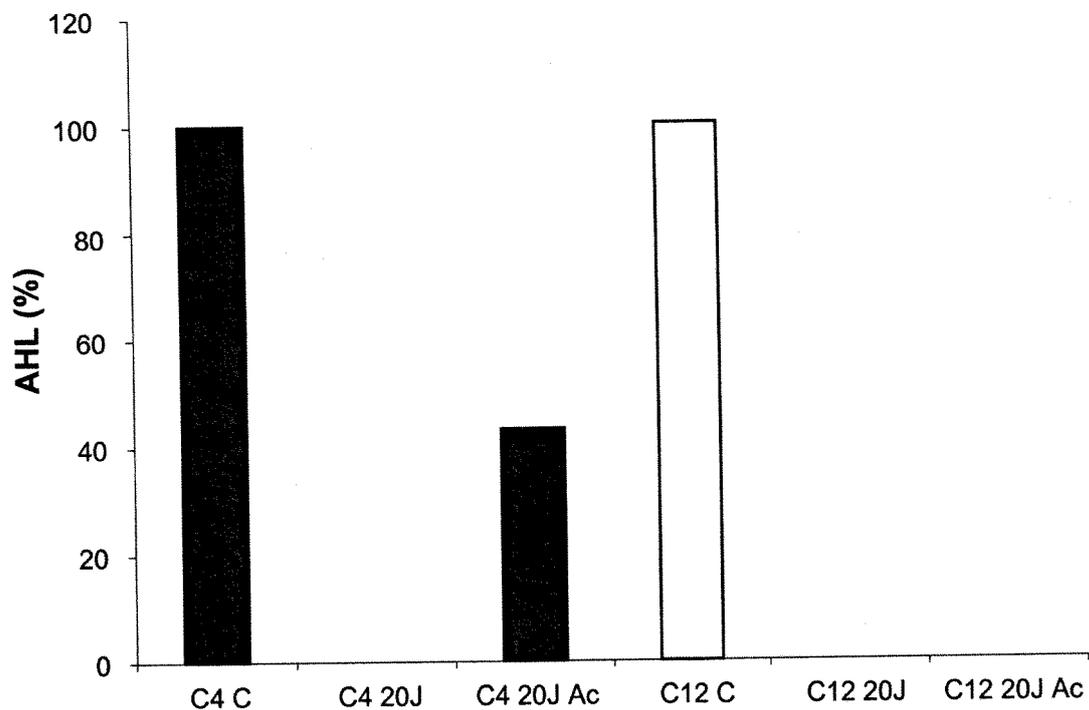


FIG. 3

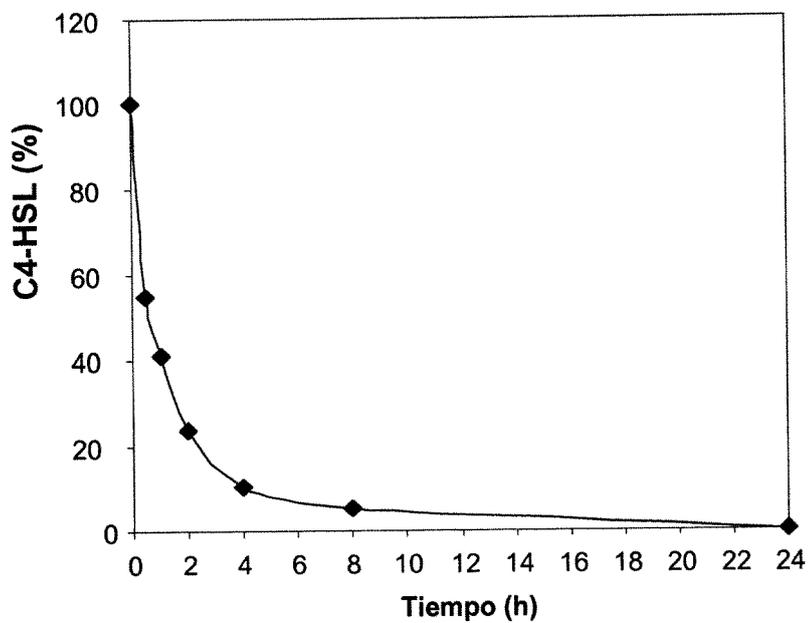


FIG. 4A

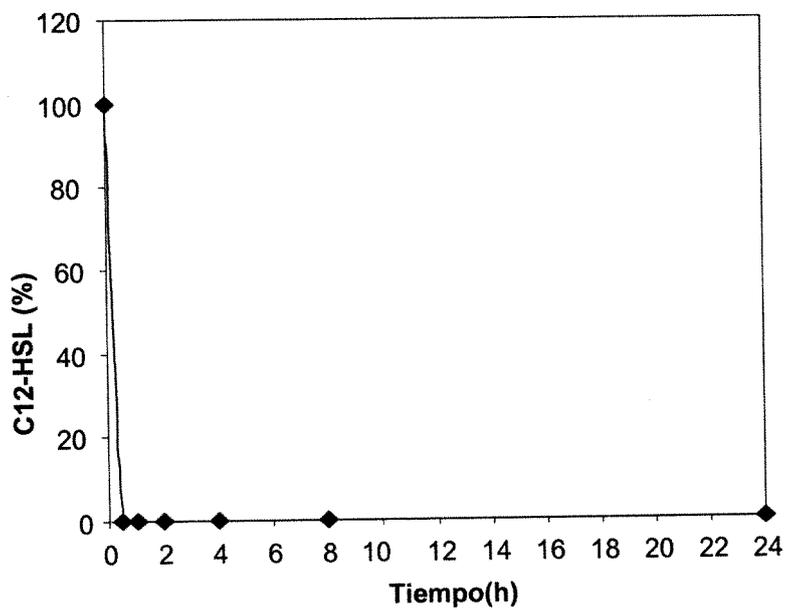


FIG. 4B

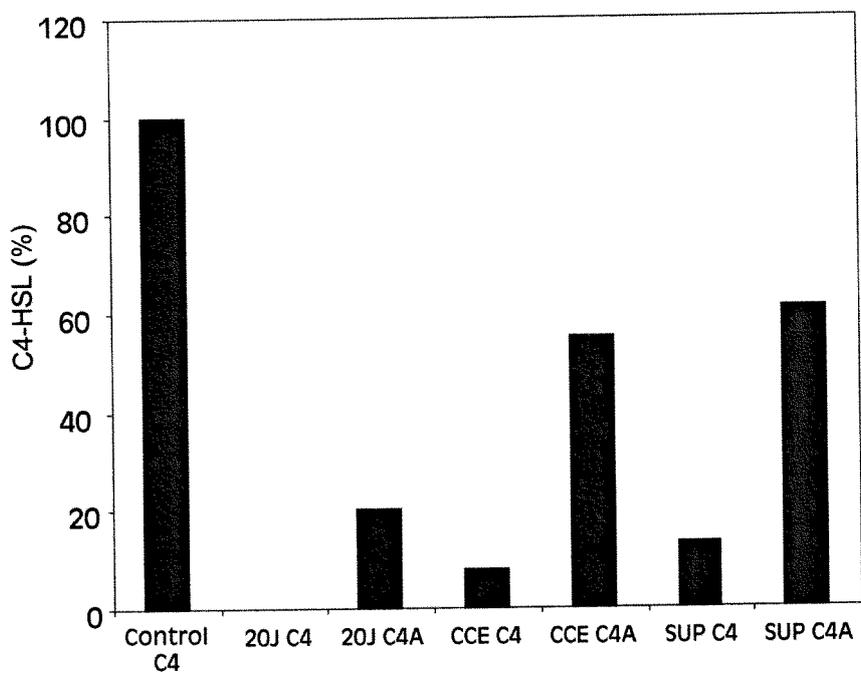


FIG. 5A

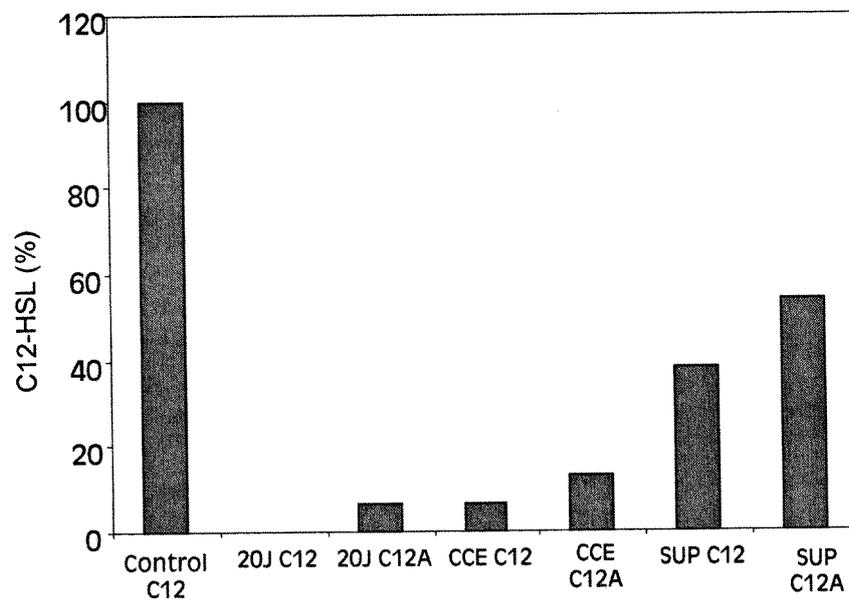


FIG. 5B

ES 2 342 807 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidade de Santiago de Compostela

5 <120> uso de bacterias del género *Tenacibaculum* para *Quorum Quenching*

<130> ES1596.13

10 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.4

15 <210> 1

<211> 1019

<212> DNA

20 <213> *Tenacibaculum discolor*

<400> 1

catgcaagtc gaggggtaac agggaaaagc ttgctttttt gctgacgacc ggcgaacggg
60
25 tgcgtaacgc gtatagaatc tgccttgtag aggaggatag cctttagaaa tgaagattaa
120
tactccataa tgttgagaga tggcatcatc ttttaattaa agatttatcg gtacaagatg
180
30 actatgcgtc ctattagcta gatggtaagg taacggctta ccatggcaac gataggtagg
240
gggtctgaga ggattatccc ccacactggt actgagacac ggaccagact cctacgggag
300
35 gcagcagtga ggaatattgg tcaatggagg caactctgaa ccagccatgc cgcgtgcagg
360
aagactgccc tatgggttgt aaactgcttt tatacaggaa gaaacttagt tacgtgtaac
420
40 taactgacgg tactgtaaga ataagcaccg gctaactccg tgccagcagc cgcggtaata
480
cggaggggtgc aagcgttatc cggaatcatt gggtttaaag ggtccgcagg cggtaatta
540
45 agtcagaggt gaaatcccat agcttaacta tggaaactgcc tttgatactg gttgacttga
600
gttatacggg agtagataga ataagtagtg tagcggtgaa atgcatagat attacttaga
660
50 ataccgattg cgaaggcagt ctactacgta tatactgacg ctcatggacg aaagcgtggg
720
gagcgaacag gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatggaca ctagttggtg
780
55 ggattattct cagtgactaa gcgaaagtga taagtgtccc acctggggag tacgatcgca
840
agattgaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat
900
60 tcgatgatac gcgaggaacc ttaccagggc ttaaattgtag agtgacagac tgagagatcg
960
gtttttcttc ggacacttta caaggtgctg catggttgct gtcagctcgt gccgtgagg
1019

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 342 807

② N° de solicitud: 200802309

③ Fecha de presentación de la solicitud: **01.08.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 35/74** (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	Piñeiro-Vidal M. et al. Tenacibaculum discolor sp. nov. and Tenacibaculum gallaicum sp. nov., isolated from sole (Solea senegalensis) and turbot (Psetta maxima) culture systems. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 01.2008, Vol. 58, páginas 21-25. DOI 10.1099/ij.s.0.65397-0 (todo el documento).	1-14
A	Lin Y. et al. Acyl-homoserine lactone acylase from Ralstonia strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. Molecular Microbiology. 2003, Vol. 47, N° 3, páginas 849-860 (todo el documento).	1-14
A	Dong Y. et al. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. The Journal of Microbiology. 02.2005, Vol. 43, N° S, páginas 101-109 (todo el documento).	1-14
A	Hentzer M. et al. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. The Journal of Clinical Investigation. 11.2003, Vol. 112, N° 9, páginas 1300-1307. DOI: 10.1172/JCI200320074 (todo el documento).	1-14
A	WO 03/075654 A2 (THE UNIVERSITY OF NOTTINGHAM) 18.09.2003, (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:

Fecha de realización del informe

28.06.2010

Examinador

M. Cumbreño Galindo

Página

1/6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 342 807

② Nº de solicitud: 200802309

③ Fecha de presentación de la solicitud: 01.08.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 35/74** (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2008/069374 A1 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION) 12.06.2008, página 1, páginas 6-8; páginas 14-22	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:

Fecha de realización del informe

28.06.2010

Examinador

M. Cumbreño Galindo

Página

2/6

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

A61K, 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, WPI, TXTE, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.06.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SÍ
	Reivindicaciones	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 ha sido publicada.

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	Piñeiro-Vidal M. et al. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 58, páginas 21-25. DOI 10.1099/ijs.0.65397-0	01-2008
D02	Lin Y. et al. Molecular Microbiology. Vol. 47, N° 3, páginas 849-860	2003
D03	Dong Y. et al. The Journal of Microbiology. Vol. 43, N° S, páginas 101-109	02-2005
D04	Hentzer M. et al. The Journal of Clinical Investigation. Vol. 112, N° 9, páginas 1300-1307. DOI: 10.1172/JCI200320074	11-2003
D05	WO 03/075654 A2	18-09-2003
D06	WO 2008/069374 A1	12-06-2008

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

La presente invención tiene por objeto el uso de una célula bacteriana del género *Tenacibaculum* cuya región 16S del ARNr presenta una identidad de al menos un 80% con la secuencia polinucleotídica homóloga recogida en la SEQ ID NO: 1, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para quorum quenching (reivindicación 1), para elaborar un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas (reivindicaciones 2 y 3) o para inhibir la formación de biofilms (reivindicación 4), pudiendo utilizarse, en el caso de las reivindicaciones 1 a 4, en combinación con antibióticos u otros agentes antibacterianos (reivindicación 5) y siendo las bacteria causantes de la infección o de la formación del biofilm bacterias Gram negativas (reivindicación 6). También tiene por objeto una cepa de células bacterianas de la especie *Tenacibaculum discolor* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de depósito CECT 7426 (reivindicación 7), el uso de la misma según los usos mencionados en las reivindicaciones 1 a 6 (reivindicación 8), una composición que contiene dicha célula bacteriana, el extracto celular crudo de un cultivo bacteriano suyo, el sobrenadante del cultivo bacteriano o cualquiera de sus combinaciones (reivindicación 9) y el uso de esta composición para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de infecciones bacterianas o para inhibir la formación de biofilms, donde la infección bacteriana o la formación de biofilms son provocados por bacterias Gram negativas (reivindicaciones 10-14).

D01 identifica dos nuevas especies, *Tenacibaculum discolor* sp. nov. y *Tenacibaculum gallaicum* sp. nov., designándose la primera de ellas como LL04 11.1.1T (= NCIMB 14278 T = DSM 18842 T) y siendo identificada en GenBank con el número de acceso AM411030.

D02 demuestra que la bacteria *Ralstonia* cepa XJ12B produce una acil-homoserin lactona acilasa que hidroliza N-acilhomoserin lactonas liberando homoserin lactona y el correspondiente ácido graso, lo cual puede constituir una nueva herramienta para ser utilizada en quorum-quenching.

D03 expone que las N-acilhomoserin lactonas (AHLs) son una familia bien caracterizada de señales de quorum sensing en bacterias Gram negativas que regulan diversas funciones biológicas, entre ellas la virulencia y la formación de biofilms, habiéndose caracterizado recientemente diversas enzimas producidas por bacterias y eucariotas capaces de degradarlas. La expresión de estas enzimas en patógenos dependientes de las AHLs inhibe las señales de quorum sensing y bloquea la infección, lo que permitiría su utilización como medio de control de infecciones bacterianas.

D04 revisa cuales son los mecanismos y las potenciales drogas antipatogénicas que actúan sobre los sistemas de quorum sensing, como el mediado por AHLs.

D05 divulga un método para el tratamiento de superficies pobladas con bacterias capaces de producir biofilm mediante el uso de una sustancia con capacidad de degradar N-acilhomoserin lactonas, obtenida a partir de las secreciones o excreciones de *Lucilia sericata*, la cual ejerce un efecto sinérgico cuando se administra junto con antibióticos, en concreto tetraciclinas

Hoja adicional

D06 anticipa derivados de homoserin lactona como inhibidores de quorum sensing para reducir la contaminación producida por bacterias Gram negativas y evitar la formación de biofilm.

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

En la literatura constituida por documentos de patentes y por publicaciones científicas, como los documentos D01 a D06 mencionados, se ha encontrado el uso de distintos compuestos para degradar N-acilhomoserin lactonas (AHLs) como medio de actuación sobre los sistemas de quorum sensing y, de esta forma, evitar la formación de biofilm y el crecimiento de las bacterias que lo producen. En concreto, D02 habla de una acil-homoserin lactona acilasa producida por la bacteria *Ralstonia* cepa XJ12B que puede ser utilizada en quorum-quenching. D03, D04 y D06 exponen que las N-acilhomoserin lactonas (AHLs) son una familia bien caracterizada de señales de quorum sensing en bacterias Gram negativas que regulan diversas funciones biológicas, entre ellas la virulencia y la formación de biofilms y D05 anticipa una sustancia con capacidad de degradar N-acilhomoserin lactonas, obtenida a partir de las secreciones o excreciones de *Lucilia sericata*, la cual ejerce un efecto sinérgico cuando se administra junto con antibióticos, en concreto tetraciclinas. Además, en el documento D01 se identifican dos nuevas especies del género *Tenacibaculum*, *Tenacibaculum discolor* sp. nov. y *Tenacibaculum gallaicum* sp. nov., presentando la secuencia de la primera de ellas una identidad del 99.9% con la SEQ ID NO: 1 de la reivindicación 1.

Sin embargo, en la documentación consultada no se ha encontrado ningún documento en el que se haga referencia al uso de una célula bacteriana del género *Tenacibaculum* cuya región 16S del ARNr presente una identidad de al menos un 80% con la secuencia polinucleotídica homóloga recogida en la SEQ ID NO: 1 en quorum quenching ni tampoco a la cepa de células bacterianas de la especie *Tenacibaculum discolor* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de depósito CECT 7426.

Por consiguiente, las reivindicaciones 1-14 cumplen con los requisitos de novedad y actividad inventiva.