

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 247**

21 Número de solicitud: 201030892

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **09.06.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **17.01.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
17.01.2012

71 Solicitante/s:
**Universidade de Santiago de Compostela
Centro de Innovación e Transferencia de
Tecnoloxía
Edificio Emprendia, Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

72 Inventor/es: **Otero Casal, Ana María y
Romero Bernárdez, Manuel**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Uso de una nueva α -Proteobacteria para *Quorum Quenching*.**

57 Resumen:

Uso de una nueva α -Proteobacteria para *Quorum Quenching*.

La presente invención se refiere a una cepa de una nueva especie de α -Proteobacteria afín al género *Phaeobacter*, que es capaz de degradar las N-Acil-homoserin lactonas (AHLs), las cuales no pueden ser recuperadas significativamente por acidificación, indicando una actividad enzimática diferente a la lactonasa. Por tanto, el empleo de esta bacteria es útil para controlar las infecciones bacterianas, sin ejercer presión selectiva sobre las poblaciones de las bacterias patógenas y evitando así la aparición de resistencias. También permite la inhibición de otros procesos de colonización bacteriana en los que están implicadas las señales de "*quorum sensing*" o QS tipo AHL, como la formación de biofilms.

ES 2 372 247 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de una nueva α -Proteobacteria para *Quorum Quenching*.

5 La presente invención se encuentra dentro de la biología, la biología molecular, y la acuicultura, y específicamente se refiere a una nueva α -Proteobacteria capaz de degradar *N*-acil-homoserín 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). Existen dos tipos principales de mecanismos de QQ: un primer tipo se basa en la producción de moléculas inhibitoras/antagonistas que mimetizan las AHLs bloqueando o desestabilizando 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). La actividad acilasa ha sido descrita en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Ralstonia* sp., *Streptomyces* sp., *Rhodococcus erythropolis*, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Shewanella* sp. y *Variovorax paradoxus* (Leadbetter and Greenberg, 2000, *J Bacteriol* 182: 6921-6926; Lin *et al.*, 2003, *Mol Microbiol* 47: 849-860; Park *et al.*, 2005, *Appl Environ Microbiol* 71: 2632-2641; Uroz *et al.*, 2005, *Microbiol* 151: 3313-3322; Huang *et al.*, 2006, *Appl Environ Microbiol* 72: 1190-1197; Sio *et al.*, 2006, *Infect Immun* 74: 1673-1682; Romero *et al.*, 2008, *FEMS Microbiol Lett* 280: 73-80), mientras que la actividad lactonasa ha sido identificada en distintas cepas de los géneros *Bacillus*, *Arthrobacter* sp. y *Rhodococcus*, pero también está presente en algunos Gram negativos como *Klebsiella* y *Agrobacterium* (Dong and Zhang, 2005. *J Microbiol* 43: 101-109; 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. Es por lo tanto un objetivo prioritario para la industria farmacéutica el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de las infecciones bacterianas.

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 (que en muchas ocasiones dificultan el adecuado tratamiento clínico, llegando incluso a la muerte del paciente) sería controlar estos sistemas de señales QS mediante QQ. La posibilidad de utilización de la inhibición del quorum sensing para el tratamiento de enfermedades bacterianas ha sido revisada con anterioridad (Stephenson *et al.*, 2004. *Curr Med Chem* 11:765-773; Hentzer *et al.*, 2003. *BioDrugs* 17:241-250; Hentzer *et al.*, 2003. *J Clin Invest* 112:1300-1307; Lyon *et al.*, 2003. *Chem Biol* 10:1007-1021). 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) emplean AHLs para el control de la 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).

Una de las actividades bacterianas de mayor importancia clínica y ecológica en la que intervienen los procesos de “quorum sensing” es la formación de biofilms, que requiere la producción, por parte de los microorganismos, de estas moléculas señal difusibles (Nadell *et al.*, 2008. PLoS Biol 6(1): e14.doi:10.1371/journal.pbio.0060014).

5 Los biofilms son películas biológicas que se desarrollan y persisten en las superficies, y que suelen ser estables y difíciles de eliminar debido a la naturaleza protectora de la matriz de polisacárido en la que están embebidos los microorganismos. Pueden definirse como una población bacteriana encerrada dentro de una matriz de polisacárido que se adhiere a las superficies. Se encuentran generalmente en las superficies de los equipamientos industriales que procesan o transportan líquidos, o en las superficies adyacentes a tales equipamientos. A menudo se encuentran en la
10 superficie de los implantes médicos o en los dispositivos insertados en el organismo. También se pueden formar en áreas del cuerpo que están expuestas al aire; en particular en heridas y en la pleura. Uno de los biofilms biológicos que presenta mayor complejidad y de mayor relevancia clínica es la placa dental.

Los medicamentos convencionales, como por ejemplo, los antibióticos, son poco eficaces en infecciones que cursan
15 a través de la formación de biofilms, debido a las barreras de difusión o al estado metabólico de los microorganismos en el biofilm.

Por tanto, mecanismos de interferencia del QS, es decir el QQ, solos o en combinación con antibióticos, constituyen una estrategia interesante en la inhibición de la formación de biofilms así como en el tratamiento de enfermedades
20 infecciosas por patógenos multiresistentes, 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. *Pseudomonas aeruginosa* es una de las bacterias más infectivas y problemáticas, al formar biofilms difícilmente tratables con antibióticos convencionales. En pacientes con fibrosis quística coloniza los pulmones causando infecciones que son difíciles de tratar y a menudo, finalmente fatales. También es especialmente interesante
25 para pacientes con heridas crónicas o con quemaduras.

Por tanto, este mecanismo puede ser interesante para el tratamiento de muchas enfermedades bacterianas, y existe bastante literatura sobre este tema (March & Bentley, 2004. *Current Opinión in Biotechnology* 15:495-502; Stephenson *et al.*, 2004. *Curr Med Chem* 11:765-773; Hentzer *et al.*, 2003. *BioDrugs* 17:241-250; Hentzer *et al.*, 2003. *J Clin Invest* 112:1300-1307; Lyon *et al.*, 2003. *Chem Biol* 10:1007-1021). Por ejemplo, se ha visto que puede ser útil en
30 el tratamiento de enfermedades, tanto en los animales como en las plantas, provocadas por los géneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Borrelia*, *Salmonella*, *Burkholderia*, *Ceratocystis*, *Serratia*, *Chromobacterium*, *Pectobacterium*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, o por otras enterobacterias (además de *Pseudomonas*).

Además, el interés de las estrategias de QQ para el tratamiento de enfermedades infecciosas es que, al no afectar
35 directamente a la supervivencia del patógeno sino a la expresión de los factores de virulencia, no ejercen presión selectiva evitando la aparición de resistencias. Por esta razón, este tipo de estrategia ha sido denominada “antiinfectivos” o “antipatogénicos” en contraste con los “antibióticos” o “antibacterianos” cuyo objetivo es la muerte celular.

A pesar de que los procesos de QS y de QQ se descubrieron en organismos marinos (Nealson *et al.*, 1970. *J Bacteriol* 104: 313-322; Givskov *et al.*, 1996. *J Bacteriol* 178: 6618-6622) se ha prestado poca atención a su significado ecológico en el ambiente marino. La producción de AHLs es común entre las bacterias patógenas de peces marinos, incluyendo *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*, o *Vibrio anguillarum* (Freeman & Bassler, 1999. *Mol Microbiol* 31: 665-677; Croxatto *et al.*, 2002. *J Bacteriol* 184: 1617-1629; Buch *et al.*, 2003. *Syst Appl Microbiol* 26: 338-349; Kim *et al.*, 2003. *Mol Microbiol* 48: 1647-1664; Bruhn *et al.*, 2005. *Dis Aquat Org* 65: 43-52). Por ello, la posibilidad de emplear los inhibidores de QS para controlar la infección se ha propuesto como una alternativa al uso de antibióticos en acuicultura (Defoirdt *et al.*, 2004. *Aquaculture* 240: 69-88), y la viabilidad de la utilización de esta estrategia ha sido ya demostrada (Rasch *et al.*, 2004. *System Appl Microbiol* 27: 350-359; Tinh *et al.*, 2008. *FEMS Microbiol Ecol* 62: 45-53).
50

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a una cepa de una nueva especie de α -Proteobacteria afín al género *Phaeobacter*,
55 que es capaz de degradar las N-Acil-homoserin lactonas (AHLs), las cuales no pueden ser recuperadas significativamente por acidificación, indicando una actividad enzimática diferente a la lactonasa. Por tanto, el empleo de esta bacteria es útil para controlar las infecciones bacterianas, sin ejercer presión selectiva sobre las poblaciones de las bacterias patógenas y evitando así la aparición de resistencias. También permite la inhibición de otros procesos de colonización bacteriana en los que están implicadas las señales de “quorum sensing” o QS tipo AHL, como la formación
60 de biofilms.

Por tanto, un aspecto de la invención se refiere a una cepa de células bacterianas de α -Proteobacteria depositada el 21 de mayo de 2010 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de depósito CECT 7733, de ahora en adelante “cepa de la invención” o “cepa 177”. Dicha cepa pertenece al filo de las α -Proteobacteria afín al
65 género *Phaeobacter*. Esta cepa de la invención crece, preferiblemente, en caldo o agar marino, más preferiblemente a una temperatura de 22°C y aun más preferiblemente durante 24 horas. La secuencia de polinucleótidos de la región ribosómica 16S de dicha cepa de la invención se recoge parcialmente en la SEQ ID NO: 1.

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 en el 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 como se ha dicho son empleadas por multitud de bacterias patógenas humanas, de plantas y marinas para el control de la producción de factores de virulencia.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de una célula bacteriana cuya región 16S del ARNr presenta una identidad de al menos un 96% con la secuencia polinucleotídica recogida en la SEQ ID NO: 1, respecto a la longitud completa de la SEQ ID NO: 1, de ahora en adelante “célula bacteriana de la invención”, 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*. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la región 16S del ARNr de la célula bacteriana de la invención presenta una identidad de al menos un 97%, más preferiblemente de un 98%, y aún más preferiblemente, de un 99% con la secuencia polinucleotídica recogida en la SEQ ID NO: 1, respecto a la longitud completa de la SEQ ID NO: 1. En una realización particular de este aspecto de la invención, la región 16S del ARNr de la célula bacteriana de la invención presenta la secuencia polinucleotídica recogida en la SEQ ID NO: 1, más preferiblemente, la célula bacteriana de la invención es la cepa de la invención.

Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la cepa de la invención, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para provocar *quorum quenching*.

En la presente invención se entiende por “*quorum quenching*” o “QQ” el mecanismo mediante el cual se interfiere la comunicación microbiana, preferiblemente de bacterias patógenas, mediada por señales basadas en un sistema *quorum sensing* o QS. Este mecanismo QQ afecta negativamente a, por ejemplo, aunque sin limitarnos, la expresión de factores de virulencia de la población microbiana sin provocar la muerte celular.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la célula bacteriana de la invención, preferiblemente, de la cepa de la invención, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, los cuales son capaces de degradar N-Acil homoserin lactonas y, por tanto, de interferir con el sistema de señales de QS de bacterias, para la elaboración de un medicamento. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la célula bacteriana de la invención, preferiblemente, de la cepa de la invención, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas bacterianas.

La producción de AHLs es común entre las bacterias patógenas de peces marinos, incluyendo, pero sin limitarse, a *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*, o *Vibrio anguillarum*, (Freeman & Bassler, 1999. *Mol Microbiol* 31: 665-677; Croxatto *et al.*, 2002. *J Bacteriol* 184: 1617-1629; Buch *et al.*, 2003. *Syst Appl Microbiol* 26: 338-349; Kim *et al.*, 2003. *Mol Microbiol* 48: 1647-1664; Bruhn *et al.*, 2005. *Dis Aquat Org* 65: 43-52). Por ello, la posibilidad de emplear los inhibidores de QS para controlar la infección se ha propuesto como una alternativa al uso de antibióticos en acuicultura (Defoirdt *et al.*, 2004. *Aquaculture* 240: 69-88), y su viabilidad ya ha sido demostrada (Rasch *et al.*, 2004. *System Appl Microbiol* 27: 350-359; Tinh *et al.*, 2008. *FEMS Microbiol Ecol* 62:45-53).

Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, la enfermedad infecciosa bacteriana la padece un animal acuático. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, las enfermedades infecciosas bacterianas son provocadas por bacterias productoras de AHLs.

En esta memoria se entiende por “animal acuático” cualquier animal que viva en el agua, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, peces, moluscos o crustáceos.

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 permite 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).

5 En acuicultura tiene especial relevancia la formación de biofilm en estructuras sumergidas tales como jaulas, redes o contenedores; o equipamientos 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
10 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 de la invención, preferiblemente, con la
15 cepa de la invención, el extracto celular crudo o el sobrenadante de sus cultivos, reduciría el *biofouling* en los cascos pintados con ella, sin tener elementos químicos tóxicos para la vida marina.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la célula bacteriana de la invención, preferiblemente, de la
20 cepa de la invención, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para inhibir la formación de biofilms.

Existen numerosas evidencias epidemiológicas que relacionan los biofilms con distintos procesos infecciosos en
humanos, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, los recogidos en la tabla 1 (Wilson, 2001. *Sci Prog* 84: 235-
254; Costerton *et al.*, 1999. *Science*, 284: 1318-1322). Los mecanismos por los que el biofilm produce los síntomas
25 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
30 personal sanitario. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la formación de biofilms es provocada por bacterias productoras de AHLs.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 372 247 A1

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	Streptococos Grupo A
Osteomielitis	Varias especies bacterianas y fúngicas
Prostatitis bacteriana	<i>E. coli</i> y otras bacterias Gram negativas
Endocarditis de la válvula nativa	Streptococos 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
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
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>
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>
Prótesis del pene	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>

55

Además el uso de la célula bacteriana de la invención, preferiblemente de la cepa de la invención, en combinación con antibióticos u otros agentes antibacterianos puede ser una estrategia interesante en el tratamiento de enfermedades infecciosas provocadas por patógenos multirresistentes como por ejemplo, aunque sin limitarnos, *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.

60

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de las células bacterianas de la invención, preferiblemente, de la cepa de la invención, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, los cuales son capaces de degradar N-Acil homoserin lactonas, o cualquiera de sus combinaciones, solos o en combinación con antibióticos u otros agentes antibacterianos, más preferiblemente para el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas bacterianas o para inhibir la formación de biofilms.

65

La información que se proporciona en esta memoria es suficiente para permitir a un experto en la materia identificar a otras cepas que estén dentro de esta nueva especie de α -Proteobacteria. 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.

5

Así, en la identificación de un microorganismo como perteneciente a la nueva especie son aplicables los parámetros siguientes, sea aisladamente o en combinación con los anteriores. Dado que las cepas de la nueva especie son afines en cuanto a su evolución, puede esperarse que la homología global de los genomas a 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 la CECT con número 7733 el 21 de mayo de 2010 y que en este documento se denomina como cepa de la invención o cepa 177, 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) putativa(s) de la nueva especie y la secuencia de otro microorganismo se puede determinar por métodos conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, aquéllas se pueden determinar por una comparación directa de la información de secuencia del polinucleótido procedente de la cepa putativa, 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 homólogas, seguido por digestión con nucleasa(s) específica(s) monocatenaria(s), seguido por determinación del tamaño de los fragmentos digeridos.

25

El porcentaje de identidad se ha determinado midiendo la identidad entre el polinucleótido que se muestra en la SEQ ID NO: 1 (perteneciente a la cepa de la invención) y todos los polinucleótidos homólogos 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 a la nueva especie tendrá un polinucleótido homólogo al de la SEQ ID NO: 1, perteneciente a la región 16S de su ARN ribosómico nuclear, que presente, al menos, una identidad del 96% con éste.

30

En relación con otras cepas de bacterias con actividad QQ, la cepa de la invención presenta una elevada actividad degradadora y una alta inespecificidad, siendo capaz de degradar todas las AHLs probadas (por ejemplo, aunque sin limitarnos, C4-HSL, C6HSL, C10-HSL, C12-HSL y OC12-HSL) en un periodo de 24 horas según datos obtenidos mediante cuantificación por LC-MS y presenta un buen crecimiento, así como capacidad de crecer en medios marinos.

35

40

La cepa de la invención se caracteriza por una alta capacidad degradadora, un amplio rango de especificidad mostrada por sus enzimas degradadoras de AHLs y por el tipo de actividad enzimática que se deriva de los análisis por HPLC de la degradación de C4-HSL y C12-HSL, cuya concentración no se recupera tras acidificación, (Figura 3), lo que excluye una posible actividad lactonasa e indica la posible presencia de actividad acilasa. En caso de confirmarse la presencia de actividad acilasa en esta cepa se trataría de un enzima de características distintivas con otras acilasas de origen bacteriano, cuya actividad es prevalentemente sobre AHLs de cadena larga. Todas estas características convierten a la cepa de la invención 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.

45

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante “composición de la invención”, que comprende un elemento seleccionado de la lista que comprende:

50

a. una célula bacteriana cuya región 16S del ARNr presenta una identidad de al menos un 96% con la secuencia polinucleotídica homóloga recogida en la SEQ ID NO: 1, respecto a la longitud completa de SEQ ID NO: 1, o célula bacteriana de la invención, preferiblemente, dicha célula bacteriana de la invención es la cepa de la invención,

55

b. el extracto celular crudo de un cultivo bacteriano de la célula bacteriana de (a), preferiblemente de la cepa de la invención,

c. el sobrenadante del cultivo bacteriano de (b),

o cualquiera de sus combinaciones.

60

Otro aspecto se refiere al uso de la composición de la invención como agente antipatogénico.

65

Un “agente antipatogénico” es una molécula o enzima que inhibe la expresión de los genes controlados por los procesos de comunicación entre bacterias dependientes de densidad celular, preferiblemente de los genes relacionados con la virulencia de una bacteria patógena, evitando así el desarrollo de la actividad bacteriana en una superficie inerte o en un tejido vivo y los síntomas asociados a la infección, y facilitando la eliminación del patógeno del medio por parte, por ejemplo, del sistema inmune del hospedero o de agentes antibacterianos.

ES 2 372 247 A1

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento, o alternativamente, a la composición de la invención para su uso como medicamento.

5 Otro aspecto se refiere al uso de la composición de la invención para el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas bacterianas, o alternativamente, se refiere al uso de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas bacterianas. Preferiblemente, la enfermedad infecciosa bacteriana la padece un animal acuático.

10 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. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para inhibir la formación de biofilms.

15 En una realización preferida, la composición de la invención se usa en combinación con antibióticos u otros agentes antibacterianos. En una realización más preferida, la formación de biofilms y las enfermedades infecciosas bacterianas son provocadas por bacterias productoras de AHLs.

20 El término “medicamento”, tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre, animales y plantas. En el contexto de la presente invención este término se refiere a una preparación que comprenda al menos una célula bacteriana de la invención, preferiblemente, la cepa de la invención, o la composición de la invención. Las enfermedades son provocadas por la infección de bacterias patógenas productoras de AHLs.

25 Los medicamentos de la invención comprenden células bacterianas de la invención, preferiblemente la cepa de la invención, o la composición de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva, que es capaz de prevenir o tratar enfermedades infecciosas bacterianas o de inhibir la formación de biofilms.

30 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de células bacterianas de la invención, preferiblemente de cepa de la invención, o de composición de la invención que produzca el efecto deseado. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en la composición de la invención y/o en los medicamentos de la invención son los conocidos por los técnicos en la materia.

35 El término “prevención”, tal como se entiende en la presente invención, se refiere a evitar la aparición de daños cuya causa sean enfermedades infecciosas bacterianas o la formación de biofilms provocados por bacterias productoras de AHLs. El término “tratamiento”, tal como se entiende en la presente invención, supone combatir los efectos causados por enfermedades infecciosas bacterianas o por la formación de biofilms provocados por bacterias productoras de AHLs, para estabilizar el estado del hombre, animal o planta, o prevenir daños posteriores.

40 El término “infección” es el término clínico para describir la colonización de un organismo huésped por microorganismos 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.

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

45 El término “polinucleótido”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una forma polimérica 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.

50 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.

55 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.

60 El medio de cultivo empleado para el crecimiento de las células bacterianas de la invención, y preferiblemente de la cepa de la invención, puede ser cualquier medio conocido en el estado del arte. Preferiblemente el medio contiene los componentes que comprenden el medioambiente de donde se coge la muestra. Por ejemplo, el medio de cultivo de bacterias marinas comprende 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.

65 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. Foto del ensayo en medio sólido para detectar cepas marinas QQ con los biosensores para AHL *C. violaceum* CV026 (A) y *C. violaceum* VIR07 (B). Las cepas de QQ positivas (177, 168 y 20J) degradaron ambas AHLs (10 μ M) tras 24 horas, eliminando la producción de violaceína comparada con el control (pocillo central). Se empleó una cepa de *Vibrio anguillarum* como control negativo.

Fig. 2. Foto de un ensayo en medio sólido para la detección de actividad QQ sobre OC12-HSL con el bisensor *E. coli* JM109 pSB1075. Las cepas capaces de degradar la AHL tras 24 horas impiden la producción de luz por el biosensor. El pocillo central se corresponde con el control de AHL (10 μ M), los pocillos a la izquierda se corresponden con aislados negativos para degradación de OC12-HSL.

Fig. 3. Análisis por HPLC-MS de degradación de C4-HSL y C12-HSL en el medio de cultivo de los 15 aislados QQ positivos tras 24 horas. La concentración inicial de AHL era de 50 μ M. Los sobrenadantes fueron acidificados hasta pH 2 para permitir la recuperación del anillo de lactona. CM: caldo marino.

Fig. 4. Árbol Neighbour-joining mostrando las relaciones entre los aislados bacterianos de los ejemplos de la invención (rombos oscuros) y las especies con lactonasas (círculos blancos) y acilasas (círculos oscuros) conocidas y cepas con actividad QQ conocida de las que no se ha caracterizado la actividad enzimática (rombos blancos) basada en el gen de 16S ADNr. El número tras cada nombre taxonómico es el número de acceso para la secuencia génica correspondiente. Se muestran los valores de Bootstrap por encima del 50% del análisis neighbour-joining. Barra: 0,02 sustituciones por posición de nucleótido.

Exposición detallada de modos de realización

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad de la cepa de la invención para degradar N-Acil homoserin lactonas. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

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 vesiculosus* obtenida de un sustrato rocoso intermareal en la Illa 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: Agar Triptona soja (TSA) 1% NaCl, Agar marino (MA, 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* 7: 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* 68: 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 se incubaron a 15 y 22°C durante 15 días. Se aislaron un total de 166 colonias en función de su diferente morfología y coloración para el análisis de actividad QQ. Puesto que las 166 cepas obtenidas presentaban crecimiento en MA a 22°C, se seleccionaron estas condiciones de cultivo como método de cultivo estándar y para su mantenimiento en el laboratorio.

Detección de actividad QQ

Las cepas aisladas fueron ensayadas para su actividad QQ utilizando un ensayo en medio sólido basado en 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 detección de la degradación de N-hexanoil-L-homoserin 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.*, 2008b, *FEMS Microbiol Lett* 279: 124-130). Las cepas marinas aisladas se inocularon en tubos con 1 ml de caldo marino (CM) a 22°C y 200 rpm. Tras 24 horas se centrifugaron 500 μ l de los cultivos a 2000 x g, durante 5 min y se resuspendieron en 500 μ l de CM al que se añadió C6-HSL ó C10-HSL 2 μ M, incubándose durante otras 24 horas. Para la evaluación de la degradación de las AHLs, se colocaron 50 μ l de los sobrenadantes de estos cultivos en pocillos realizados con un sacabocados en placas de LB cubiertas con LB blando inoculado con 500 μ l de un cultivo de 12 horas de *C. violaceum* CV026 ó *C. violaceum* VIR07, añadiéndose 50 μ l de agua destilada estéril para completar el volumen del pocillo. Tras 24 horas de incubación a 25°C se observó la producción de violaceína (Figura 1).

Además se analizó la capacidad de interferir con la actividad de la OC12-HSL de las cepas seleccionadas utilizando la cepa sensora de *E. coli* JM109 pSB1075 (Winson MK, Swift S, Fisha L, Throup JP, Jørgensen F, Chhabra SR, *et al.* 1998. *FEMS Microbiol Lett* 163:185-192). Se añadió OC12-HSL a 1 ml de cultivo de 12 horas de las cepas en Caldo Marino a una concentración final de 2 μ g/ml y se incubaron durante 24 horas a 22°C. La actividad AHL en el medio de cultivo se evaluó en placas de LB cubiertas con 5 ml de LB semi-sólido inoculado con 50 μ l de un cultivo de 12 horas de la cepa sensora *E. coli* JM109 pSB1075 mantenida a 37°C y 200 rpm. Se pipetearon 50 μ l de cultivo en pocillos realizados en el agar de estas placas, utilizándose CM estéril y CM más OC12-HSL como controles. Las placas se inocularon durante 3 horas a 37°C, observándose la producción de luz derivada de la actividad AHL (Figura 2).

Confirmación de la degradación de AHL por HPLC-MS

Con las 15 cepas que mostraron inhibición de QS contra las AHLs C6 y C10, se llevaron a cabo análisis mediante HPLC-MS para determinar inequívocamente su capacidad para degradar AHLs (Figura 3). A cultivos de 24 h de 1 ml de las cepas correspondientes, se añadieron las AHLs C4-HSL y C12-HSL con una concentración final de 50 μ M, y se incubaron estos cultivos durante 24 h más a 22°C y a 200 rpm. Tras la centrifugación de los cultivos (2000 g, 5 min), se dividió el sobrenadante en dos partes iguales. Un volumen de 500 μ l se acidificó con HCl hasta un pH de 2 y se incubó durante 24 h a 25°C para facilitar la recuperación de la actividad AHL derivada de la hidrólisis del anillo de lactona por la acción de las lactonasas. Los sobrenadantes de los cultivos se extrajeron 3 veces con un volumen igual de etilacetato, se evaporaron bajo flujo de nitrógeno y se resuspendieron en 200 μ l de acetonitrilo para análisis por HPLC-MS y cuantificación. Las muestras de caldo marino suplementadas con la misma cantidad de C4 o C12-HSL fueron procesadas y extraídas de la misma forma y usadas como controles. Los análisis se llevaron a cabo con un equipo de HPLC 1100 series (Agilent USA) con precolumna CB (2,1x12,5 mm, 5 μ m de tamaño de partícula) y columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 2,1 x 150 mm (tamaño de partícula 5 μ m) a 45°C. La fase móvil estaba compuesta por 0,1% de ácido fórmico en agua (A) y 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo (B). La velocidad de flujo fue de 0,22 ml/min. Las condiciones de elución fueron las siguientes: 0 min 35%B, gradiente lineal a 60%B en 10 min, gradiente lineal desde 60% a 95% B durante 5 min, 5 min 95% B y finalmente vuelta a las condiciones iniciales en 9 min.

La columna fue reequilibrada durante 5 min. El volumen de inyección fue de 2 μ l. Los experimentos de MS mostrados fueron llevados a cabo en un espectrómetro de masas API 4000 triple-quadrupole (Applied Biosystem, CA, USA) equipado con una fuente de Turbolon empleando un electrospray iónico positivo, con modo de monitorización de reacción múltiple (MRM). La señales MRM se emplearon para generar información cuantitativa relativa mediante comparación con una curva de calibrado construida para abundancia iónica molecular, empleando el estándar sintético de AHL apropiado (Milton *et al.*, 2001, *J Bacteriol* 183: 3537-3547).

Identificación bacteriana basada en la subunidad 16S y análisis filogenéticos

La identificación de las cepas se llevó a cabo mediante amplificación y secuenciación parcial del gen correspondiente a la subunidad 16S del ARNr. El ADN genómico de los distintos aislados fue extraído (Puregene Tissue Core Kit B) y el gen de la subunidad 16S del ARNr fue amplificado empleando los cebadores ANT1 (forward) (5'AGAGTTTGATCATGGCTCAG) y S (reverse) (5'GGTTACCTTGTTACGACTT) (Martinez-Murcia and Rodriguez-Valera, 1994, *FEMS Microbiol Lett* 124: 265-269). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones estándar: 35 ciclos (desnaturalización a 94°C durante 15 s, hibridación a 50°C durante 30 s, extensión a 72°C durante 2 min) precedidos por 2 min de desnaturalización a 94°C y seguidos por 7 min de extensión a 72°C. Los productos de PCR fueron parcialmente secuenciados, revisados y corregidos mediante el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (v. 7.0.9.0 <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Un total de quince secuencias de la subunidad 16S del ARNr fueron identificadas y comparadas con secuencias de la subunidad 16S del ARNr disponibles en el GenBank usando NCBI BLAST (Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402) y el Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>). Las secuencias de ARNr 16S fueron alineadas usando MUSCLE (Edgar, 2004, *Nucleic Acids Res* 32:1792-321797) con las secuencias más cercanas filogenéticamente encontradas en las bases de datos tras identificación por BLAST, y con aquellos aislados con actividad acilasa o lactonasa previamente identificados o con actividad QQ ya conocida. Para eliminar espacios y posiciones alineadas de modo inequívoco, se empleó Gblocks (Castresana, 2000, *Mol Biol Evol* 17: 540-552), dando lugar a 649 posiciones disponibles para construir el árbol filogenético. Los análisis filogenéticos se llevaron a cabo después usando el paquete informático de filogénesis MEGA4 (Zmasek and Eddy, 2001, *Bioinformatics* 17: 821-828; Kumar *et al.*, 2004, *Brief Bioinform* 5: 150-163) empleando los parámetros por defecto (Figura 4).

Resultados

Crecimiento y aislamiento bacteriano

5 Se obtuvieron resultados muy distintos en el número de unidades formadoras de colonias (CFU) dependiendo del medio de cultivo y de la temperatura de crecimiento empleada para cada muestra. La muestra con una población de bacterias mayor fue la obtenida del sedimento del tanque de cultivo, llegando a 3×10^6 CFUs ml^{-1} . El mayor valor de CFU obtenido para la muestra de biopelícula era un orden de magnitud más bajo que en el sedimento, mientras que el número de bacterias viables aisladas de *F. vesiculosus* era el más bajo, llegando tan sólo a 30.000 CFUs ml^{-1} en el mejor de los casos. La temperatura de crecimiento y, lo que es más importante, el medio de cultivo empleado para su aislamiento, también tuvieron una gran influencia sobre el número de bacterias viables aisladas. Temperaturas más altas (22°C) permitieron el crecimiento de un mayor número de colonias en casi todos los casos. El medio de Agar Marino Diluido (MA 1/100) y el medio de FAS-CAS resultaron ser los más efectivos para la recuperación de CFUs en las muestras de sedimento y de biopelícula, mientras que en la muestra de *F. vesiculosus* el medio de Agar Marino y el de FAS-POL fueron igual de efectivos a altas temperaturas, resultando en números de CFUs 3 veces mayores que los otros medios de cultivo.

20 Un total de 166 aislados fueron obtenidos de las muestras de ambientes marinos seleccionados para la búsqueda de actividad QQ, 85 cepas de la muestra de sedimento del tanque de cultivo, 48 de la biopelícula y 33 de *F. vesiculosus* (Tabla 2).

25 A pesar del mayor número de CFU/ml obtenidas con el medio de cultivo oligotrófico en las primeras dos muestras, alrededor de la mitad de aislados empleados para la búsqueda de actividad QQ se obtuvieron de medios más ricos como TSA 1% NaCl y MA, debido a la mayor variabilidad que se observó de las colonias. En el caso de la muestra de sedimento, más del 70% de los aislados provenían de estos medios ricos, mientras que en la muestra de biopelícula la mayoría de cepas habían sido aisladas en medio FAS (Tabla 2). El número de cepas aisladas a las dos temperaturas distintas que se emplearon en el estudio fue muy similar: 91 cepas se aislaron de placas mantenidas a 22°C y 75 de placas mantenidas a 15°C.

30 *Detección de la inhibición de la actividad quorum sensing mediante bioensayos*

35 El ensayo en medio sólido en placa empleando la cepa biosensora *C. violaceum* CV026 permitió la detección de la inhibición de la actividad C6-HSL de forma robusta (Figura 1). Este ensayo permitió diferenciar las cepas con actividad de inhibición del crecimiento de aquéllas con una actividad QQ real. El ensayo en medio sólido con *C. violaceum* CV026 permitió la identificación de 24 cepas con actividad QQ, lo cual representa un 14,5% de las cepas aisladas (Tabla 2).

40
45
50
55
60
65
(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 372 247 A1

TABLA 2

Resumen de las cepas bacterianas aisladas de distintos ambientes y medios de cultivo, mostrando el número y porcentaje de cepas con actividad de inhibición QS contra C6-HSL obtenido empleando el ensayo en placa de C. violaceum CV026. MA: agar marino; MA 1/100: agar marino diluido 1/100 con agua de mar; FAS-CAS: agua de mar filtrada y autoclavada suplementada con casaminoácidos; FAS-POL: agua de mar filtrada y autoclavada suplementada con polímeros

	Nº de cepas aisladas	Cepas QQ
Sedimento del tanque de peces		
TSA-1% NaCl	30	2
MA	31	4
MA 1/100	9	1
FAS-CAS	7	0
FAS-POL	8	1
Total	85	8
Biofilm del tanque de agua		
TSA-1% NaCl	9	0
MA	5	0
MA 1/100	7	0
FAS-CAS	17	2
FAS-POL	10	1
Total	48	3
<i>Fucus vesiculosus</i>		
TSA-1% NaCl	9	3
MA	9	2
MA 1/100	5	3
FAS-CAS	7	3
FAS-POL	3	2
Total	33	13
Todas las muestras		
TSA-1%NaCl	48	5
MA	45	6
MA 1/100	21	4
FAS-CAS	31	5
FAS-POL	21	4
Total	166	24

ES 2 372 247 A1

No se observó un efecto significativo del medio de cultivo empleado para el aislamiento sobre el porcentaje de cepas con actividad QQ (Tabla 2, test Chi cuadrado, $p > 0,05$). El 50% de las cepas activas fueron activadas a 22°C y por tanto el efecto de la temperatura de aislamiento no fue significativo (test de Fisher exacto, $p > 0,05$). Por el contrario, sí se observó un efecto importante del origen de la muestra sobre el porcentaje de cepas con actividad QQ encontradas (Tabla 2, test Chi cuadrado, $p < 0,05$). Mientras que las cepas aisladas de los tanques presentaron un porcentaje de actividad QQ de entre el 6 y el 9% (Tabla 2), casi el 40% de las cepas aisladas de la muestra de *F. vesiculosus* resultaron activas contra C6-HSL (Tabla 2). Las 24 cepas que eran aparentemente capaces de interceptar la actividad de C6-HSL se analizaron más a fondo, estudiando su capacidad de interceptar C10-HSL mediante el mismo ensayo en medio sólido pero empleando la cepa biosensora *C. violaceum* VIR07. Entre éstas, sólo 15 fueron capaces de eliminar completamente la actividad tanto de C6-HSL como de C10-HSL, como fue detectado con el biosensor tras 24 horas (Figuras 1 y 3) y por tanto estas cepas fueron seleccionadas para la posterior caracterización de su actividad QQ e identificación. Estas cepas fueron aisladas de *F. vesiculosus*, de la muestra de sedimento y de la muestra de biopelícula del tanque de agua (Tabla 3). Además, estas cepas fueron analizadas para determinar su capacidad de degradar OC12-HSL mediante un bioensayo en placa con la cepa biosensora *E. coli* JM109 pSB1075. 10 de las 15 cepas fueron capaces de suprimir completamente la actividad de OC12 detectable por el biosensor (Tabla 3), indicando que un amplio rango de sustratos AHL pueden ser inactivados por estas cepas.

TABLA 3

Identificación de las 15 cepas con actividad Quorum Quenching en base a las secuencia de la subunidad 16S del ADNr. También se muestran el carácter Gram (protocolo estándar de tinción), la capacidad para crecer en medio carente de sales marinas (TSA con NaCl 1 g/l) y la capacidad para degradar OC12-HSL, así como la presencia de secuencias homologas candidatas para acilasas y lactonasas en los genomas secuenciados disponibles

Origen	Cepa	Bacterias más cercanas cultivadas	% Id del locus 16S ADNr	Gram	TSA-1%	OC12-HSL	Secuencias putativas
<i>Fucus vesiculosus</i>	2	<i>Hyphomonas</i> sp. DG895	99	-	-	+++	acilasa/lactonasa
	5	<i>Stappia</i> sp.	98	-	-	+	lactonasa
	168	<i>Alteromonas</i> sp. BCw156	99	-	-	+++	acilasa
	172	<i>Oceanobacillus</i> sp. YIM DH3	99	+	+	-	acilasa
	173	<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4	100	+	+	+++	lactonasa
	176	<i>Stappia</i> sp.	98	-	-	+++	lactonasa
	177	<i>Phaeobacter</i> sp. NH52F	96	-	-	+++	
Sedimento del tanque de peces	20J	<i>Tenacibaculum</i> sp. JAM-BA07	99	-	+	+++	

ES 2 372 247 A1

5		24	<i>Bacillus</i> <i>circulans</i> strain X3	98	+	+	+++	lactonasa ⁽¹⁾
10		30	<i>Oceanobacillus</i> sp. YIM DH3	99	+	+	-	acilasa
15		33	<i>Halomonas</i> <i>taeanensis</i> strain BH539	99	-	-	-	
20		50	<i>Rhodococcus</i> <i>erythropolis</i> MM30	99	+	+	+++	lactonasa
25		97-1	<i>Stappia</i> sp.	98	-	-	+++	lactonasa
		97-2	<i>Oceanobacillus</i> sp. YIM DH3	99	+	+	-	acilasa
30	Biofilm del tanque de agua	61	<i>Roseovarius</i> <i>aestuarii</i> SMK- 122	99	-	-	+++	

(1) Basado en la presencia común de lactonasas putativas en los genomas de especies del género *Bacillus*.

Caracterización de la actividad QQ mediante análisis por HPLC-MS

Las 15 cepas capaces de eliminar la actividad de C6 y C10-HSL en el bioensayo en placa fueron capaces de reducir significativamente la concentración de C4 y de C12-HSL, como demostraron los análisis por HPLC-MS (Figura 3) lo que indica la presencia de actividad enzimática contra estas AHLs. El pH final de los cultivos tras el ensayo de degradación de 24 horas fue menor de 7 en todos los casos y por tanto se puede descartar que los elevados valores de pH se deban a la lactonización espontánea de las AHLs. Este resultado confirma la presencia de actividad de degradación enzimática en todas las cepas, lo cual ya había sido indicado por el aspecto del halo de violaceína en el ensayo de *C. violaceum*, ya que con la concentración de AHLs empleada, la presencia de degradación enzimática de AHLs es demostrada por la ausencia o reducción del halo de violaceína alrededor del pocillo, mientras que la presencia de inhibidores/antagonistas de AHLs es generalmente demostrada por la presencia de un halo claro de inhibición de la producción de violaceína rodeado por un segundo halo de producción de violaceína.

La mayoría de cepas degradaron completamente tanto C4-HSL como C12-HSL a pesar de que los primeros bioensayos fueron llevados a cabo con C6-HSL y C10-HSL. La recuperación de la concentración de HSL derivada de la acidificación del sobrenadante (spent culture media) a pH 2, lo cual permite la recuperación del anillo de lactona causada por la actividad lactonasa, fue mayor para C4-HSL. Sólo la cepa 177, correspondiente a una especie nueva del grupo α -Proteobacteria relacionada con *Phaeobacter*, la cepa 2, identificada como *Hyphomonas* sp., la cepa 168, identificada como *Alteromonas* sp. y la cepa 24, identificada como *Bacillus circulans*, produjeron una degradación casi completa de las dos AHLs que no pudieron ser significativamente recuperadas mediante la acidificación, indicando una actividad enzimática distinta de lactonasa. Distintas cepas, como la 20J (*Tenacibaculum discolor* ID 99%), mostraron un perfil de degradación diferente para AHLs de cadena corta que para AHLs de cadena larga, indicando que existe más de un tipo de actividad enzimática, mientras que otros dentro del género *Stappia* (cepas 5, 176 y 97-1), *Oceanobacillus* (cepas 172, 30 y 97-2) y *Halomonas* (cepa 33) parecen presentar una actividad lactonasa de amplio espectro, ya que la cantidad de AHL es parcialmente recuperada tras la acidificación del sobrenadante (spent culture media) (Figura 3).

Identificación de las bacterias y búsquedas en bases de datos

Las secuencias del gen de la subunidad 16S del ARNr de los 15 aislados seleccionados fueron obtenidas y empleadas para hacer una búsqueda BLAST en la base de datos del GenBank para determinar su afiliación taxonómica. La identidad del aislado más próximo filogenéticamente se muestra en la Tabla 3. De los 15 aislados, dos pertenecen al grupo de γ -proteobacteria (33 y 168), seis al grupo de α -Proteobacteria (5, 97-1, 176, 2, 61 y 177), seis al grupo *Firmicutes* (24, 30, 97-2 y 172), dos a *Actinobacteria* (50 y 173) y uno a Bacteroidetes (20J). De los 15 aislados caracterizados, sólo tres de ellos: la cepa 24 (*Bacillus circulans* 98% de identidad) y las cepas 50 y 173 (*R. erythropolis*, 99% y 100% de identidad respectivamente) pertenecen a géneros en donde ya se han descrito aislados con actividad QQ (Dong *et al.*, 2002, *Microbiol* 68: 1754-1759; Uroz *et al.*, 2003, *Microbiol* 149: 1981-1989). Aunque la presencia de especies de *Bacillus* es común en muestras marinas (Ivanova *et al.*, 1999, *Int Microbiol* 2: 267-271) y *B. circulans* ha sido aislado con anterioridad del medio marino (Das *et al.*, 2008, *J Appl Microbiol* 104:1675-1684), la cepa 24 fue aislada de sedimento de un tanque de cultivo acuícola tierra adentro y por tanto puede considerarse como de origen terrestre. Dos aislados obtenidos de fuentes distintas, la cepa 24 del sedimento del tanque de cultivo acuícola y la cepa 173 de *F. vesiculosus*, fueron identificadas como *R. erythropolis* (Tabla 3), indicando que esta especie es también un representante común en las comunidades bacterianas marinas con actividad QQ. El género *Rhodococcus* es de amplia distribución tanto en ambientes acuáticos como en ambientes terrestres y es bien conocido por su habilidad excepcional para degradar distintos compuestos orgánicos complejos (Goodfellow and Maldonado, 2006, *New York: Springer*, pp. 843-888). Distintas especies dentro de este género son capaces de degradar AHLs, y todas ellas son de origen marino (Uroz *et al.*, 2008, *Appl Environ Microbiol* 74: 1357-1366). Todos los aislados nuevos que presentan actividad QQ pertenecen a géneros típicos de ambientes marinos a pesar de que muchos de ellos fueron capaces de crecer en ausencia de sales marinas (Tabla 3).

El género de α -proteobacteria *Stappia* (cepas 5, 176 y 97-1), que comprende distintas especies marinas anteriormente clasificadas como dentro del género *Agrobacterium*, y el género *Oceanobacillus* sp. (cepas 172, 30 y 97-2), que comprende varios alcalifílicos facultativos y especies marinas, parecen ser abundantes y ubicuos, ya que representantes de ambos géneros fueron aislados en repetidas ocasiones de muestras de diverso origen (*F. Vesiculosus* y muestra de sedimento). De entre las cepas aisladas de *F. vesiculosus*, *Hyphomonas* sp. (cepa 2) pertenece al grupo de bacterias marinas prostecadas que son típicos epibiontes de algas (Poindexter, 2006, *New York: Springer*, pp. 72-90), mientras que *Alteromonas* sp. (cepa 168) es un género de γ -proteobacterias marinas aislado con frecuencia de diversos ambientes marinos, incluyendo algas (Gauthier and Breittmayer, 1992, *New York: Springer-Verlag*, pp. 3046-3070). Finalmente, la cepa 177 o cepa de la invención representa un especie nueva dentro del grupo de las α -Proteobacteria que está relacionado (ID 96%) con *Phaeobacter* sp., un género de bacterias marinas próximo al ciado de *Roseobacter* (Martens *et al.*, 2006, *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1293-1304), aunque otras bacterias relacionadas filogenéticamente con ésta han sido descritas como especies no cultivadas (Jones *et al.*, 2007, *Microb Ecol* 53:153-162).

La única cepa activa aislada de la muestra de biopelícula, la cepa 61, fue identificada como *Roseovarius aesturari* (ID 99%), un género de α -Proteobacteria estrictamente marino (Labrenz *et al.*, 1999, *Int J Syst Bacteriol* 49: 137-147). Esta especie pertenece al linaje de *Roseobacter*, que se ha estimado que puede comprender entre el 20 y el 30% de las secuencias de ARNr 16S presentes en la zona fótica de ambientes marinos (Wagner-Dobler and Biebl, 2006, *Annu Rev Microbiol* 60: 255-280).

Las relaciones entre las 15 cepas secuenciadas así como su relación con otras secuencias génicas de ARNr 16S de otros aislados con actividad QQ (Carlier *et al.*, 2003, *Appl Environ Microbiol* 69: 4989-4993; Kang *et al.*, 2004, *Can J Microbiol* 50: 935-941; Uroz *et al.*, 2007, *Arch Microbiol* 187: 249-256) o con lactonasas o acilasas clonadas se muestran en el dendrograma de la Figura 4. Aunque *Deltia* sp. A317 y *Ochrobactrum* sp. A44 tienen actividad QQ, éstas no fueron incluidas en el análisis debido a la corta longitud de sus secuencias de ARNr 16S.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cepa de células bacterianas de α -Proteobacteria depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con número de depósito CECT 7733.
2. Uso de la cepa según la reivindicación 1, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para provocar *quorum quenching*.
- 10 3. Uso de la cepa según la reivindicación 1, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para la elaboración de un medicamento.
- 15 4. Uso de la cepa según la reivindicación 1, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas bacterianas.
- 20 5. Uso de la cepa según la reivindicación 4 donde la enfermedad infecciosa bacteriana la padece un animal acuático.
6. Uso de la cepa según la reivindicación 1, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para inhibir la formación de biofilms.
7. Uso de la cepa, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en combinación con antibióticos u otros agentes antibacterianos.
- 25 8. Uso de la cepa, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, donde la formación de biofilms y las enfermedades infecciosas bacterianas son provocadas por bacterias productoras de AHLs.
- 30 9. Composición que comprende un elemento seleccionado de la lista que comprende:
- a. la cepa según la reivindicación 1,
 - b. el extracto celular crudo de un cultivo bacteriano de la cepa según la reivindicación 1,
 - 35 c. el sobrenadante del cultivo bacteriano de (b),
- o cualquiera de sus combinaciones.
- 40 10. Uso de la composición según la reivindicación 9 como agente antipatogénico.
11. Uso de la composición según la reivindicación 9 para la elaboración de un medicamento.
- 45 12. Uso de la composición según la reivindicación 9 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas bacterianas.
13. Uso de la composición según la reivindicación 12 donde la enfermedad infecciosa bacteriana la padece un animal acuático.
- 50 14. Uso de la composición según la reivindicación 9 para inhibir la formación de biofilms.
15. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14 en combinación con antibióticos u otros agentes antibacterianos.
- 55 16. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 donde la formación de biofilms y las enfermedades infecciosas bacterianas son provocadas por bacterias productoras de AHLs.

60

65

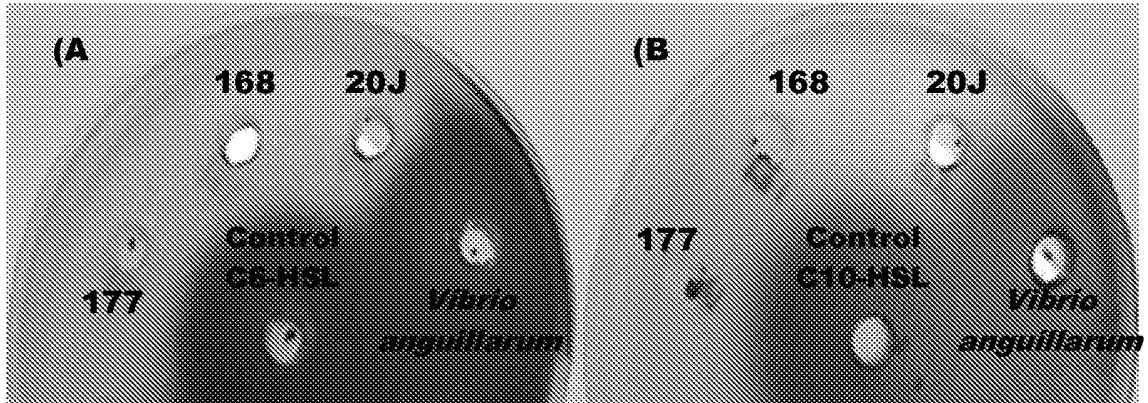


FIG. 1

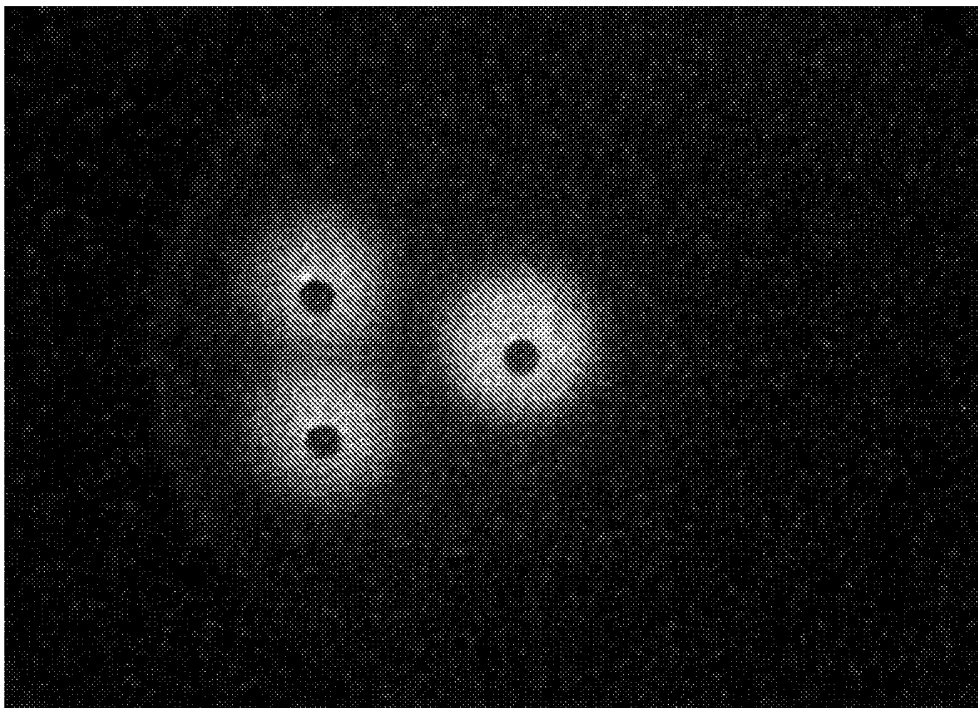


FIG. 2

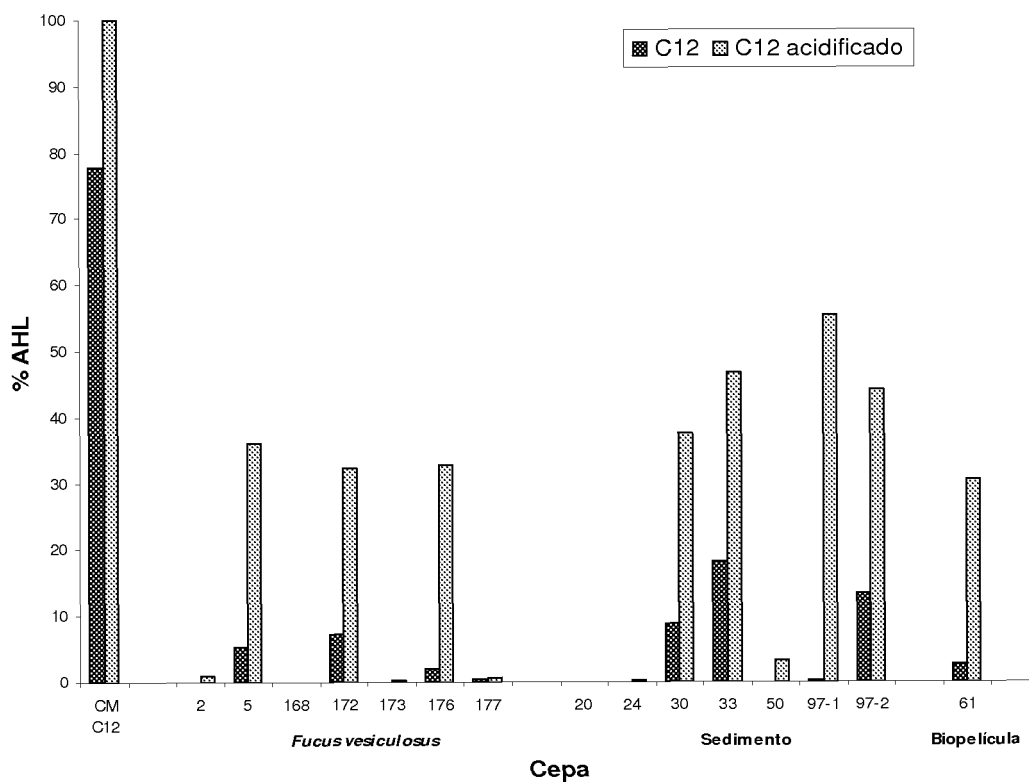
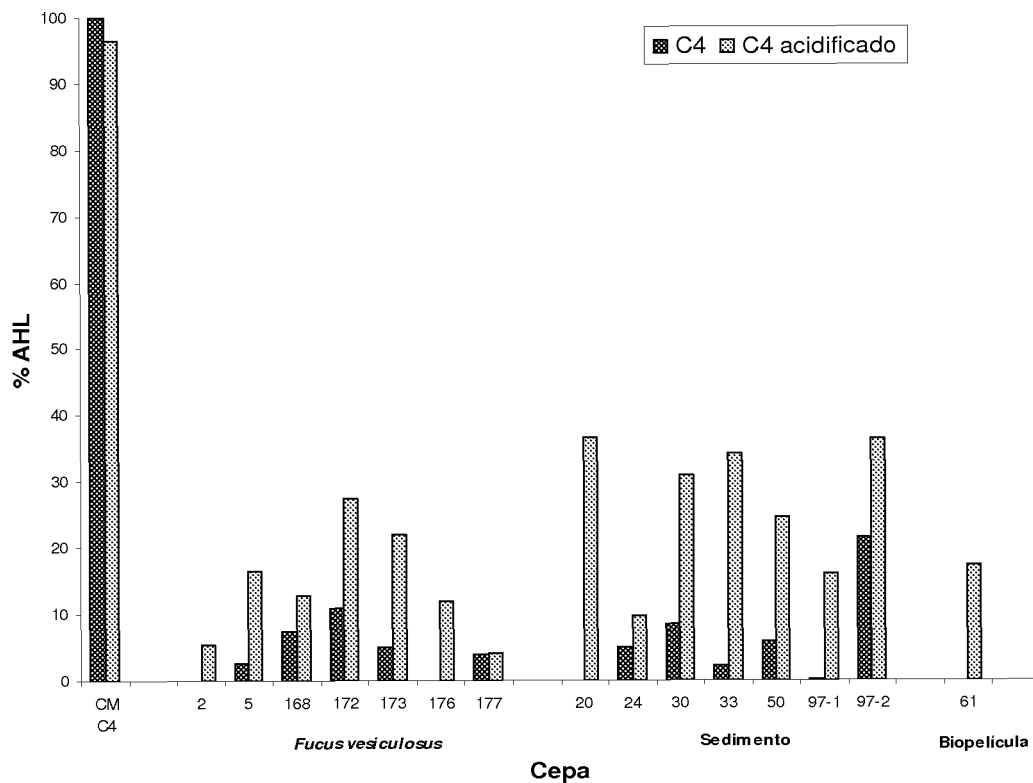


FIG. 3

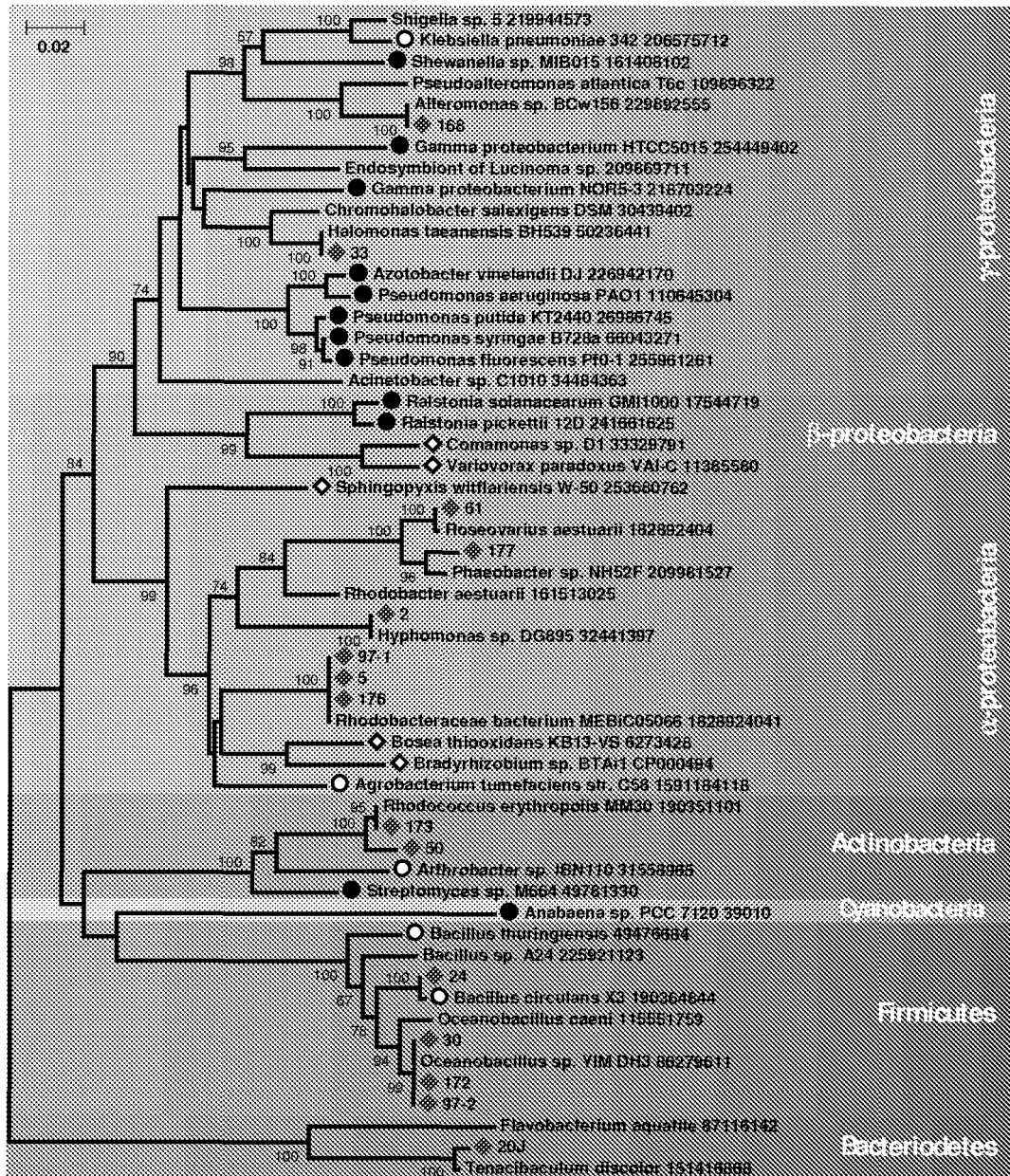


FIG. 4

ES 2 372 247 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Santiago de Compostela

5 <120> “Uso de una nueva α -Proteobacteria para *Quorum Quenching*”

<130> 1596.32

10 <160> 1

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 970

<212> DNA

<213> Cepa bacteriana con número de depósito CECT 7733

20 <400> 1

25 cacatgcaag tcgagcgctt cacttcggtg aggagcggcg gacgggtag taacgcgtgg 60

gaacataccc ttttctaagg aatagccact ggaaacggtg agtaatacct tatacgcctt 120

tcgggggaaa gatttatcgg agaaggattg gcccgcgta gattagatag ttggtggggt 180

30 aatggcctac caagtctacg atctatagct ggttttagag gatgatcagc aacctggga 240

ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtggg gaatcttaga caatgggagc 300

aagcctgatc tagcgatgcc gcgtgagtga tgaaggcctt agggtcgtaa agctctttcg 360

35 ccaaggatga taatgacagt acttggtaaa gaagtcccgg ctaactccgt tccagcagcc 420

gcggtaaatac ggaggggact agcgttggtc ggaattactg ggcgtaaagc gcacgtaggc 480

40 ggatcagaaa gtatggggtg aaatcccagg gctcaaccct ggaactgcct cataaactcc 540

tggtcttgag ttcgagagag gtgagtggaa ttccgagtgt agaggtgaaa ttcgtagata 600

ttcggaggaa caccagtggc gaaggcggct cactggctcg atactgacgc tgaggtgcga 660

45 aagtgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acaccgtaa cgatgaatgc 720

cagtcgtcgg atagcatgct attcgggtgac acacctaacg gattaagcat tccgcctggg 780

50 gagtacggtc gcaagattaa aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcgggtggag 840

catgtggttt aattcgaagc aacgcgcaga accttaccac cccttgacat cctgtgctac 900

atccagagat ggatgggtcc cttcggggac gcagtgatca ggtgctgcat ggctgctgctc 960

55 agctcgtgctc 970

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030892

②② Fecha de presentación de la solicitud: 09.06.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CATHARINE E. WHITE y TURLOUGH M. FINAN "Quorum quenching in <i>Agrobacterium tumefaciens</i> : chance or necessity" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 191, no. 4, 2009, páginas 1123-1125. Páginas 1123-1124.	1-16
A	YI-HU DONG y LIAN-HUI ZHANG "Quorum sensing and quorum-quenching enzymes" THE JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 43, no. S, 2005, páginas 101-109. Página 101; página 102, columna derecha.	1-16
A	TOM DEFOIRD et al. "Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture" AQUACULTURE, vol 240, 2004, páginas 69-88. Páginas 77-78 y 80.	1-16
A	TORBEN MARTENS et al. "Reclassification of <i>Roseobacter gallaeciensis</i> Ruiz-Ponte et al. 1998 as <i>Phaeobacter gallaeciensis</i> gen. nov., comb. nov., description of <i>Phaeobacter inhibens</i> sp. nov., reclassification of <i>Ruegeria algicola</i> (Lafay et al. 1995) Uchino et al. 1999 as <i>Marinovum algicola</i> gen. nov. comb. nov., and emended descriptions of the genera <i>Roseobacter</i> , <i>Ruegeria</i> and <i>Leisingera</i> " INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, vol. 56, 2006, páginas 1293-1304. Resumen.	1-16

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
22.11.2011

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K35/74 (2006.01)

A61P31/04 (2006.01)

C12N1/20 (2006.01)

C12R1/01 (2006.01)

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

A61K, C12N, C12R

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, NPL, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.11.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	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 se publica.

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	CATHARINE E. WHITE y TURLOUGH M. FINAN "Quorum quenching in <i>Agrobacterium tumefaciens</i> : chance or necessity" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 191, no. 4, 2009, páginas 1123-1125. Páginas 1123-1124.	
D02	YI-HU DONG y LIAN-HUI ZHANG "Quorum sensing and quorum-quenching enzymes" THE JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 43, no. S, 2005, páginas 101-109. Página 101; página 102, columna derecha.	
D03	TOM DEFOIRDT et al. "Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture" AQUACULTURE, vol 240, 2004, páginas 69-88. Páginas 77-78 y 80.	
D04	TORBEN MARTENS et al "Reclassification of <i>Roseobacter gallaeciensis</i> Ruiz-Ponte et al. 1998 as <i>Phaeobacter gallaeciensis</i> gen. nov., comb. nov., description of <i>Phaeobacter inhibens</i> sp. nov., reclassification of <i>Ruegeria algicola</i> (Lafay et al. 1995) Uchino et al. 1999 as <i>Marinovum algicola</i> gen. nov. comb. nov., and emended descriptions of the genera <i>Roseobacter</i> , <i>Ruegeria</i> and <i>Leisingera</i> " INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, vol. 56, 2006, páginas 1293-1304. Resumen.	

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 solicitud de patente, tal y como ha sido redactada, hace referencia a una cepa de células bacterianas de alfa-proteobacteria depositada en la colección Española de Cultivos Tipo con número de depósito CECT 7733 (reivindicación 1), al uso de dicha cepa para provocar quorum quenching (reivindicación 2), para la elaboración de un medicamento (reivindicación 3), para el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas bacterianas (reivindicación 4), que padece un animal acuático (reivindicación 5), para inhibir la formación de biofilms (reivindicación 6), en combinación con otros agentes bacterianos (reivindicación 7), donde la formación de biofilms y las enfermedades infecciosas bacterianas con provocadas por bacterias productoras de AHLs (reivindicación 8). Se refiere también, a la composición que comprende la cepa o extracto celular crudo de un cultivo bacteriano de la cepa o el sobrenadante del cultivo bacteriano (reivindicación 9) y al uso de dicha composición (reivindicaciones 10-16).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA PCT ARTS. 6 Y 8 DE LA LP.

El documento D01 hace referencia al hecho de que proteobacterias, tales como alfa-proteobacterias sean capaces de provocar quorum quenching. El estudio se lleva a cabo, entre otras, sobre *Agrobacterium tumefaciens* que es una alfa proteobacteria del género *agrobacterium* (véase páginas 1123-1124).

El documento D02 indica como un gran número de células bacterias utilizan el mecanismo conocido como quorum sensing para comunicarse entre ellas y como en este tipo de comunicación las señales químicas utilizadas más comúnmente son los compuestos AHL (N-acil-homoserin lactonas) (véase página 101). Por otro lado, hace referencia también a la existencia de especies bacterianas que provocan quorum quenching mediante actividad enzimática. Entre dichas especies se puede destacar, entre otras, *Agrobacterium tumefaciens* que es una proteobacteria del tipo alfa-proteobacteria (véase página 102, columna derecha).

El documento D03 describe como moléculas que provocan quórum sensing pueden ser inactivadas enzimáticamente. Las enzimas que son capaces de inactivar las AHLs se han descubierto en especies tales como beta-proteobacterias, alfa-proteobacterias, gamma-proteobacterias, entre otras (véase páginas 77-78). Tales mecanismos de control se han encontrado en *A. Tumefaciens*, un tipo de alfa proteobacteria (véase página 80).

El documento D04 demuestra mediante análisis de secuencias de la región 16S de ARNr que la cepa T5 tiene una cercana afiliación son *Roseobacter gallaeciensis*, pero los resultados de caracterización fenotípica y genotípica demuestran que es una nueva especie. Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, se propone la existencia de un nuevo género, *Phaeobacter*, y se considera que la cepa T5 es una nueva especie de este género (véase resumen).

En los documentos del estado de la técnica citados anteriormente, se ha encontrado el uso de proteobacterias, concretamente alfa-proteobacterias para degradar N-acil homoserin lactonas (AHLs) como mecanismo de actuación sobre los sistemas de quorum sensing, y de esta forma evitar la formación de biofilms y el crecimiento de bacterias que lo producen. Sin embargo, no se han encontrado células bacterias cuya región 16S del ARNr presenten una identidad de al menos 96% con la secuencia polinucleótida recogida en la SEQ ID NO:1; y tampoco en dichos documentos citados existen sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-16, por lo que el objeto de las reivindicaciones 1-16 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con los artículos 6 y 8 de la LP.