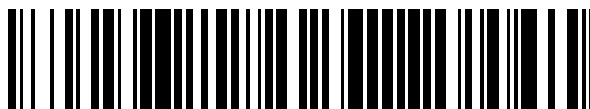


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 307**

51 Int. Cl.:

C12N 15/55 (2006.01)
C12N 9/18 (2006.01)
A23L 3/3571 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2014** **PCT/ES2014/070569**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015** **WO15004305**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2014** **E 14822500 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019** **EP 3020814**

54 Título: **Péptido con actividad inhibidora de quorum sensing, polinucleótido que codifica dicho péptido y los usos de los mismos**

30 Prioridad:

11.07.2013 ES 201331060

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

13.02.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (50.0%)
Área de Valorización, Transferencia y
Emprendimiento, Edificio Emprendía, Campus
Vida, s/n
15782 Santiago de Compostela (A Coruña), ES y
FUNDACIÓN PEDRO BARRIÉ DE LA MAZA,
CONDE DE FENOSA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**OTERO CASAL, ANA MARÍA;
ROMERO BERNÁRDEZ, MANUEL y
MAYER MAYER, CELIA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 742 307 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptido con actividad inhibidora de quorum sensing, polinucleótido que codifica dicho péptido y los usos de los mismos

5

Campo de la invención

La invención se refiere, en general, a un péptido aislado con actividad inhibidora de señales de *quorum sensing* (QS, percepción de cuórum) y a usos del mismo. La invención también se refiere al polinucleótido aislado que codifica dicho péptido, a vectores y organismos no humanos transgénicos que comprenden dicho polinucleótido, y a células hospedadoras transformadas con los vectores de la invención.

10

Antecedentes de la invención

15 *Uso de metodologías de Quorum Quenching (QQ, interceptación del cuórum) para el tratamiento de infecciones bacterianas*

Numerosas bacterias patógenas coordinan su actividad infecciosa mediante procesos de comunicación intercelular denominados *Quorum Sensing* (QS) (Otero Casal et al., 2004). Estos procesos consisten en la liberación al medio de pequeñas moléculas señal que permiten a las bacterias cuantificar la presencia de otras bacterias mediante sensores específicos, actuando de forma coordinada una vez alcanzada la concentración umbral de la señal indicadora de la existencia de cuórum. El QS controla la producción de factores de virulencia, tales como exoenzimas o pigmentos, de numerosos patógenos, tanto humanos como animales y vegetales (Whitehead et al., 2001; Fuqua y Greenberg, 2002; Bassler y Losick, 2006; Williams et al., 2007), incluyendo importantes patógenos nosocomiales tales como *Pseudomonas aeruginosa*.

20

25

Debido a que la virulencia de numerosos patógenos bacterianos depende de los procesos de QS, la inactivación o interceptación de la comunicación mediada por señales de cuórum, una estrategia denominada de forma genérica inhibición de *quorum sensing* o *Quorum Quenching* (QQ), es una alternativa al uso de antibióticos para el tratamiento y prevención de infecciones bacterianas. Los procesos de QQ presentan un enorme potencial en los campos farmacéutico y biotecnológico puesto que es un mecanismo de biocontrol de virulencia que evita que las bacterias lancen su ataque, haciéndolas más sensibles a las defensas del hospedador y facilitando que puedan ser eliminadas con mayor eficacia. Un punto clave de las estrategias de QQ es que no afectan a la viabilidad de las bacterias, sino que solo interfieren en la expresión de los factores de virulencia, evitando una presión selectiva sobre ellas y, por lo tanto, no generando resistencias.

30

35

Se considera que los mecanismos de QQ son los nuevos agentes antipatogénicos, haciendo de ellos un objeto importante de estudio, puesto que uno de los posibles usos de los mismos es el control de patógenos tanto de plantas como de animales, incluyendo patógenos humanos, que actúan a través de procesos de QS. El proceso de QQ tiene una menor probabilidad de selección de resistencias y una mayor especificidad, afectando solo a las bacterias receptoras. Además, el uso de estrategias de QQ acompañado de antibióticos podría dar lugar al control de patógenos multirresistentes tales como *P. aeruginosa*. En acuicultura, el uso de los mismos como sustitutos a antibióticos es una alternativa con un amplio potencial, debido a las restricciones legislativas del uso de antibióticos en este campo, así como en otros campos de sanidad animal. Por otra parte, los procesos de QS y QQ cobran real importancia en el medio marino debido a sus implicaciones ecológicas en el mismo, y en particular, en el campo de la acuicultura ya que los procesos de QS mediados por N-acil-homoserina lactonas (AHL) o autoinductores de tipo 2 (AI-2) están ampliamente extendidos en patógenos marinos como el caso de *Vibrio harveyi*, *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, *V. vulnificus*, *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Yersinia ruckeri*, *Edwardsiella tarda* y *Tenacibaculum maritimum* (Freeman y Bassler, 1999; Swift et al., 1999; Croxatto et al., 2002; Buch et al., 2003; Morohoshi et al., 2004; Bruhn et al., 2005; Romero et al., 2010).

40

45

50

Un proceso controlado por fenómenos de QS a destacar es la formación de biopelículas ("biofilms"), que tiene un gran impacto económico y clínico. Se sabe que muchas de estas biopelículas están íntimamente relacionadas con procesos infecciosos humanos. Los mecanismos por los que el biofilm produce los síntomas de la enfermedad todavía no están completamente establecidos, aunque 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 inmunitario, y, por otro lado, constituyen un nicho para la aparición de bacterias resistentes a los tratamientos antibióticos. Este último aspecto puede ser particularmente relevante dado que las bacterias resistentes originadas en un biofilm podrían extenderse de paciente a paciente a través de las manos del personal sanitario. Los patógenos formadores de biopelículas son muy resistentes a antibióticos y pueden adherirse a alimentos o a sustancias en contacto con dichos alimentos, provocando problemas tanto de higiene como posibles toxoinfecciones alimentarias y en último término, grandes pérdidas económicas. Además, a menudo se encuentran en la 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. En este sentido, *Pseudomonas aeruginosa* es una de las bacterias más infectivas y problemáticas puesto que forma biofilms difícilmente tratables con antibióticos convencionales. En pacientes con fibrosis quística coloniza los pulmones

55

60

65

causando infecciones que son difíciles de tratar, y, a menudo, finalmente fatales. También es especialmente interesante en pacientes con heridas crónicas o con quemaduras. Por otra parte, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* están actualmente clasificados como los principales causantes de las infecciones nosocomiales. Esta situación se ve favorecida por el hecho de que estas especies habitan tanto en las membranas mucosas como en la piel de los seres humanos, lo que permite que, a través de las heridas quirúrgicas, puedan penetrar en el torrente sanguíneo del paciente por medio del contacto directo o indirecto con el personal sanitario, con un objeto contaminado o incluso con otro paciente. Estas especies forman biopelículas que colonizan catéteres, drenajes e implantes, favoreciendo la contaminación y la resistencia a antibióticos. Además, uno de los biofilms biológicos que presenta mayor complejidad y de mayor relevancia clínica es la placa dental, cuya formación está causada por, entre otros patógenos de la cavidad oral, *Streptococcus mutans*, que también forma biopelículas. Adicionalmente, los biofilms contribuyen a la contaminación biológica de superficies, al bloqueo mecánico en conductos, sistemas de distribución de agua potable, sistemas de aire acondicionado, sistemas antiincendios, etc. Por último, hay que añadir que favorecen la formación de biocorrosión al constituir la base del crecimiento de otros organismos superiores en superficies sumergidas, constituyendo un grave problema económico en el sector de la acuicultura y transporte marítimo.

Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar nuevos agentes antibacterianos que incrementen el arsenal de remedios para combatir infecciones bacterianas.

La bacteria marina *Tenacibaculum* sp. cepa 20J (CECT 7426) presenta una alta capacidad de QQ.

Tenacibaculum sp. 20J (CECT 7426): una cepa con elevada capacidad QQ

La bacteria marina *Tenacibaculum* sp. cepa 20J (CECT 7426) se caracteriza por una alta capacidad de degradación de señales de AHL, mucho mayor que otras bacterias con actividad QQ que se han aislado de suelo (Romero et al., 2012a; Romero et al., 2012b). Este es el aislado obtenido a partir de una muestra de sedimento de un tanque de cultivo de peces marinos, en medio TSA-I (Romero, 2010). La secuencia parcial del gen del RNA ribosómico 16S de la cepa presenta porcentaje de identidad del 99 % con la cepa tipo de la bacteria marina patógena *Tenacibaculum discolor* DSM 18842/NCIMB 14278^T, perteneciente al filo *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB), que causa la infección bacteriana conocida como tenacibaculosis/flexibacteriosis o “*gliding bacterial disease*” (Piñeiro-Vidal et al., 2008). Una característica distintiva de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J (CECT 7426) es que es capaz de crecer en medios carentes de sales marinas (TSA-1), por lo que si se aplican de forma estricta los caracteres taxonómicos fijados para el género *Tenacibaculum* excluiría a la cepa 20J de la especie *T. discolor* (Piñeiro Vidal et al., 2008). Por ello, a lo largo de este texto se utilizará para describir esta especie la terminología *Tenacibaculum* sp. cepa 20J o simplemente “cepa 20J”. Las células vivas y extractos celulares de la cepa 20J degradan todo el intervalo de tamaños de AHL conocidos, con o sin oxo-sustituciones, por lo que su actividad es altamente inespecífica (Romero, 2010). Es una cepa de rápido crecimiento, cultivable tanto en medios marinos como en medios terrestres.

Estudios preliminares llevados a cabo con la cepa 20J indican que la localización principal de su actividad QQ está ligada a las células, aunque también se observa en sobrenadantes filtrados (documento EP 2 356 991 A1 y documento ES 2342807 B2). Además, su actividad es constitutiva, pues no requiere la exposición previa a señales para su expresión. Al presentar actividad interceptora de QS tanto en la célula viva como en extractos celulares purificados (designados como ECC en el documento EP 2 356 991 A1 y el documento ES 2342807 B2), permite el uso de ambos tipos de presentaciones para su uso biotecnológico. Además de haberse demostrado su alto espectro de actividad QQ, la comparación de su actividad con los datos disponibles en la bibliografía confirma su potencial ya que esta cepa degrada las AHL con una velocidad hasta 24 veces mayor que los consorcios bacterianos marinos seleccionados por su actividad QQ (Cam et al., 2009). La comparación de la actividad de extractos celulares purificados de la cepa 20J con los mismos extractos de la cepa de *Bacillus thuringiensis* CECT 197, puso de manifiesto la mayor actividad de los extractos celulares purificados de la cepa 20J, especialmente en el caso de la degradación de la N-hexanoil-L-homoserina lactona (C6-HSL): mientras que la concentración mínima activa (CMA) para la degradación total de una solución 10 µM de C6-HSL en 24 horas es de 10 µg de extracto de proteína por ml para la cepa 20J, es necesaria una concentración 3 órdenes de magnitud mayor de extracto celular de *Bacillus thuringiensis* ATCC10792, 10.820 µg de proteína/ml, para llevar a cabo la misma degradación (datos no publicados). Como resultado de todas sus características, la cepa 20J es un candidato prometedor para el control de patógenos relacionados con la salud humana, acuicultura, animales y plantas o en la inhibición de la formación de biopelículas (Romero, 2010) y por tanto estos usos se han protegido mediante patente (documento EP 2 356 991 A1 y documento ES 2342807 B2).

No obstante, no se ha podido identificar hasta la fecha el gen responsable de su actividad QQ o de su actividad degradadora de señales de QS, en particular, señales AHL. La identificación y caracterización de dicho gen permitiría disponer fácilmente de cantidades importantes del producto responsable de dicha actividad, lo que facilitaría y generalizaría el empleo del mismo en todo tipo de usos en los que resulta necesario el control de poblaciones bacterianas que producen señales de QS.

Los esfuerzos realizados hasta la fecha no fueron satisfactorios en el intento de clonar el gen o genes responsables de la actividad QQ sobre señales de QS, en particular AHL, mediante técnicas basadas en la reacción en cadena de

la polimerasa (PCR) con cebadores degenerados, diseñados para las secuencias conservadas de las lactonasas y acilasas descritas en la bibliografía o mediante la construcción de una biblioteca genómica en plásmido con la que se transformó la cepa productora de AHL *P. aeruginosa* PAOI, portadora del plásmido QSIIS pMH655 (Rasmussen et al., 2005), que se diseñó para la detección de QQ, ya que la cepa no puede sobrevivir en presencia de sacarosa y AHL. En concreto, ninguna de dichas metodologías dio como resultado la detección de los genes responsables de actividad QQ de la cepa 20J (datos no publicados), lo que es indicativo de la existencia de diferencias importantes entre la enzima con actividad QQ de la cepa 20J y las enzimas con actividad QQ descritas hasta la fecha.

Sumario de la invención

La presente invención describe la clonación, secuenciación y caracterización del gen responsable de la actividad QQ de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J (CECT 7426) que codifica un péptido con actividad inhibidora de señales de QS, en particular, con actividad lactonasa, en ocasiones denominado "Aii20J" en la presente descripción, que presenta un porcentaje de identidad inferior al 38 % con respecto a las secuencias de otras lactonasas descritas hasta la fecha para otras especies, así como frente a las secuencias de los genes homólogos presentes en otras especies del género *Tenacibaculum* cuya actividad QQ ya se ha descrito anteriormente (documento EP 2 356 991 A1 y documento ES 2342807 B2).

Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante del mismo que tiene un grado de identidad de al menos un 76 % con respecto a dicha SEQ ID NO: 1 y que codifica un péptido con actividad inhibidora de *Quorum Sensing* (QS), en el que dicho péptido es un péptido que inhibe las señales mediadas por una N-acil-homoserina lactona (AHL) hidrolizando el anillo de lactona presente en dicha AHL.

En otro aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende dicho polinucleótido.

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula hospedadora transformada con dicho vector, con la condición de que dicha célula no sea una bacteria del género *Tenacibaculum*.

En otro aspecto, la invención se refiere a un organismo no humano transgénico que comprende, insertado en el genoma del mismo, dicho polinucleótido o dicho vector, con la condición de que dicho organismo no sea una bacteria del género *Tenacibaculum*.

En otro aspecto, la invención se refiere a un péptido aislado codificado por la secuencia nucleotídica de dicho polinucleótido.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende dicho vector o dicha célula hospedadora. En una realización particular, dicha composición comprende, además, un vehículo seleccionado entre un vehículo adecuado para alimentación, un vehículo farmacéuticamente aceptable y un vehículo agrícolamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se refiere a un producto alimenticio que comprende dicha composición y un vehículo adecuado para alimentación.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de dicho polinucleótido aislado, vector, célula hospedadora, organismo no humano transgénico en el que dicho organismo no humano transgénico es una planta, o péptido aislado, en la preparación de un producto alimenticio.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende dicha composición y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se refiere a un producto para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una infección bacteriana, en el que dicho producto se selecciona entre el grupo que consiste en:

- a) El polinucleótido aislado de la invención;
- b) El vector de la invención;
- c) El péptido aislado de la invención;
- d) La célula hospedadora de la invención; y
- e) El organismo no humano transgénico de la invención, en el que dicho organismo no humano transgénico es una planta.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición agrícola que comprende dicha composición y un vehículo agrícolamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de dicho polinucleótido aislado, vector, péptido aislado, célula hospedadora, organismo no humano transgénico en el que dicho organismo no humano transgénico es una planta, en la preparación de una composición agrícola.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para controlar una enfermedad bacteriana en una planta, que comprende poner en contacto dicha planta con dicho péptido aislado, en el que dicha enfermedad bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de QS, en condiciones que permiten controlar dicha enfermedad bacteriana.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para controlar una enfermedad bacteriana en una planta, que comprende transformar dicha planta con dicho polinucleótido aislado o vector, en el que dicha enfermedad bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de QS.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para controlar una enfermedad bacteriana en una planta, que comprende el uso de una bacteria transformada con dicho polinucleótido aislado o vector, en el que dicha enfermedad bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de QS, en condiciones que permiten controlar dicha enfermedad bacteriana.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para provocar un proceso de QQ en respuesta a un proceso de QS o para inhibir un proceso de QS, en el que dicho proceso de QS es causado por una bacteria productora de señales de QS, que comprende poner en contacto dicha bacteria con dicho polinucleótido, vector, péptido aislado, célula hospedadora, organismo no humano transgénico en el que dicho organismo humano transgénico es una planta, en condiciones que permiten provocar dicho proceso de QQ o inhibir dicho proceso de QS, y en el que dicho método no consiste en un método de tratamiento quirúrgico o terapéutico del cuerpo humano o animal.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* o *ex vivo* para inhibir la formación de un biofilm bacteriano, en el que dicho biofilm bacteriano es producido por una bacteria productora de una señal de QS, que comprende poner en contacto dicho polinucleótido aislado, vector, péptido aislado, célula hospedadora, organismo no humano transgénico en el que dicho organismo es una planta, con dicha bacteria productora de señales de QS, en condiciones que permiten inhibir la formación de dicho biofilm bacteriano.

En realizaciones particulares de la invención, dichas señales de QS producidas por la bacteria comprenden una AHL, en las que dicha AHL es (i) una AHL no sustituida, en la que dicha AHL no sustituida se selecciona entre el grupo que consiste en C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL, C14-HSL y combinaciones de las mismas; (ii) una AHL oxo- o hidroxi-sustituida, en la que dicha AHL oxo- o hidroxi-sustituida se selecciona entre el grupo que consiste en OC6-HSL, OC12-HSL y combinaciones de las mismas; o (iii) combinaciones de (i) y (ii).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una fotografía del clon positivo 13-E2 obtenido en el cribado de la biblioteca genómica de la cepa 20J. Se observa que el pocillo aparece sin pigmento violaceína, a diferencia del resto de pocillos de la placa microtiter, debido a la degradación de la AHL añadida exógenamente.

La Figura 2 muestra un análisis HPLC-EM de degradación de C6-HSL tras 24 horas por extractos celulares del clon positivo 13-E2 (ECC 13E2). Controles: PBS y *E. coli* DH10 β sin el fósido (ECC DH10 β). Se acidificó a pH 2 para recuperar el anillo lactona (barras sombreadas).

La Figura 3 muestra un análisis HPLC-EM de degradación de C10-HSL tras 24 horas por extractos celulares del clon positivo 13-E2 (ECC 13E2). Controles: PBS y *E. coli* DH10 β sin el fósido (ECC DH10 β). Se acidificó a pH 2 para recuperar el anillo lactona (barras sombreadas).

La Figura 4 muestra una fotografía del bioensayo en medio sólido de 3 de los clones positivos de la segunda genoteca construida a partir del inserto del clon 13-E2 seleccionado al azar (1-E6, 1-G7 y 4-A9) y 1 clon negativo (1-E9) con los biosensores de AHL *C. violaceum* CV026 (A) y *C. violaceum* VIR07 (B). Todos los clones ensayados fueron capaces de degradar C6-HSL y C10-HSL tras 24 horas impidiendo la formación del halo de violaceína en los biosensores. El pocillo con violaceína se corresponde con un clon negativo confirmado (1-E9) usado como control.

La Figura 5 muestra un alineamiento de las secuencias nucleotídicas de *aii20J* con la lactonasa *aiiA* de *Bacillus* sp. 240B1 (Dong et al., 2000, número de acceso AF196486).

La Figura 6 muestra un alineamiento de la secuencia aminoácidica de lactonasa de 20J (Aii20J) y las lactonasas de distintas especies del género *Bacillus*. El motivo conservado característico de las metalo- β -lactamasas (HXHXDH), aparece entre los aminoácidos 138 y 143 de la figura.

La Figura 7 muestra los resultados del bioensayo para degradación de C6-HSL (arriba) y C10-HSL (abajo) por células vivas de distintas especies del género *Tenacibaculum*. Las bacterias se cultivaron en Caldo Marino durante 24 horas y a continuación se resuspendieron en PBS pH 6,5 al que se añadió la AHL a una concentración de 10 μ M. La degradación se visualizó mediante el ensayo de activación de la producción de violaceína en los biosensores *C. violaceum* CV026 y VIR07 que producen este pigmento solo en presencia de AHL (Romero et al., 2011).

La Figura 8 muestra un alineamiento de las lactonasas de *Tenacibaculum* sp. 20J (Aii20J), *T. discolor* (AiiTD), *T. gallaicum* (AiiTG), *T. lutimaris* (AiiTL), *T. aestuarii* (AiiTA) y *T. soleae* (AiiTS) obtenidas mediante amplificación con cebadores diseñados para los extremos de Aii20J. Para alinear las secuencias de las distintas lactonasas y de sus respectivas secuencias nucleotídicas se usaron las herramientas informáticas de BLAST del NCBI.

La Figura 9 muestra el árbol filogenético mediante el método neighbor-joining de las secuencias aminoacídicas de Aii20J de *Tenacibaculum* sp. 20J, AiiTD de *T. discolor*, AiiTG de *T. gallaicum*, AiiTS de *T. soleae*, AiiTL de *T. lutimaris*, AiiTA de *T. aestuarii*, AiiA de *B. subtilis* (número de acceso AAY51611.1), AiiA de *B. cereus* (AAY22194.1), AiiA de *B. thurigiensis* (AAO43435.1), AiiA de *uncultured Bacillus* sp. (CAD44268.1), AiiA AI96 de *Bacillus* sp. AI96 (ADK91097.1), AttM/AiiB de *A. tumefaciens* (AAL13075.1), AhlK de *K. pneumoniae* (AAO47340.1) y AhlD de *Arthrobacter* sp. (AAP57766.1). Barra de escala: 0,2 sustituciones de aminoácidos por sitio.

La Figura 10 muestra una electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa al 1 %. Calle M: marcador de peso molecular (pb). 1: miniprep de un cultivo de XL1blue transformado con pET28c(+) con el inserto de Aii20J. 2: doble digestión de esta miniprep con EcoRI y NcoI, el inserto del gen Aii20J (861 pb) aparece en el tamaño correspondiente.

La Figura 11 muestra una electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa al 1 %. M: Marcador de peso molecular (pb). 1: PCR de una de las colonias recombinantes obtenidas por electroporación en BL21(DE3) con los cebadores TEN1F y TEN1R, aparece el fragmento entre los dominios homólogos internos (237 pb) en el tamaño correspondiente.

La Figura 12 muestra una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con tinción de azul de coomasie del extracto celular de cultivos de 24 h de *E. coli* BL21(DE3) pET28c+, *E. coli* BL21(DE3) pET28c+ Aii20J y *E. coli* BL21(DE3) pET28c+ Aii20J inducido con IPTG. Se observa marcador molecular (en kDa) en la calle de la izquierda.

La Figura 13 muestra una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con tinción de azul de coomasie de la proteína Aii20J purificada a partir del extracto de un cultivo de 24 h de *E. coli* BL21DE3 pET28c+ Aii20J. Se utilizó una columna de afinidad por histidina para la purificación de proteínas (His GraviTrap™ affinity columns, GE Healthcare). La banda obtenida de proteína (~34,9 kDa) en la calle del gel pertenece a la fracción recogida de la purificación. Se observa marcador molecular (en kDa) en la calle de la izquierda.

La Figura 14 muestra el bioensayo para determinar la Concentración Mínima Activa (CMA) de Aii20J frente a C6-HSL (CV026) y C10-HSL (VIR07). Se incubaron distintas diluciones de una solución de AiiA de 0,2 mg/ml con las AHL a una concentración 10 µM durante 3 horas (panel superior) y 24 horas (panel inferior). Se consideró como CMA la concentración de la mayor dilución que logró eliminar completamente la señal (ausencia de halo de violaceína) en el tiempo estipulado.

La Figura 15 muestra la cinética de degradación de C6-HSL y C10-HSL 50 µM mediante *Tenacibaculum* sp. 20J Aii20J (20 µg/ml) o mediante *Bacillus* sp. AiiA (40 µg/ml) y la estabilidad térmica de Aii20J a 60 °C con C6-HSL (50 µM) determinadas por análisis HPLC-EM. Los controles se establecieron con señales en PBS. Los datos representan la media de 3 reacciones independientes, que muestran la media y la desviación típica.

La Figura 16 muestra la degradación de distintas AHL por una solución de 20 µg/ml de Aii20J en el periodo de 1 hora a una temperatura de 22 °C. Se representa el porcentaje de AHL no degradado, medido por HPLC-EM.

La Figura 17 muestra una fotografía del bioensayo en medio sólido de resistencia a pH de Aii20J purificada a una concentración final de 20 µg/ml a 22 °C con distintos tampones (valores de pH 3-9) para las dos señales de C6-HSL (placa izquierda) y C10-HSL (placa derecha). Las AHL se incubaron durante 3 horas con la enzima anteriormente tratada al pH que se indica.

La Figura 18 muestra el efecto de la quimiotripsina (panel inferior) y la proteinasa K (panel superior) sobre la actividad enzimática de Aii20J. Se incubó Aii20J (20 µg/ml) con soluciones de ambas enzimas (proteínasa K/Aii20J 1:10 y quimiotripsina/Aii20J 1:60) durante 30 o 60 minutos y a continuación se añadió C6-HSL o C10-HSL para evaluar la actividad de la enzima. Los pocillos centrales se corresponden con el control negativo de PBS más la AHL correspondiente y los controles negativos de la proteinasa K y quimiotripsina tratada en las mismas condiciones que las muestras, pero sin la enzima Aii20J, aparecen con halo de violaceína.

La Figura 19 muestra el análisis HPLC-EM de la capacidad de degradación de C6-HSL por Aii20J purificada previo tratamiento con distintas temperaturas (22, 60, 80 y 90 °C) durante 10 minutos. La concentración de la proteína fue de 20 µg/ml. El control (barra con puntos) se realizó en PBS.

La Figura 20 muestra una fotografía del bioensayo en medio sólido del CCE de *E. coli* BL21DE3 con el plásmido pET28c(+) y Aii20J para C6-HSL. La actividad de 20J en el extracto resistió al tratamiento con todas las

temperaturas degradando la señal de C6-HSL a las 3 horas impidiendo la formación del halo de violaceína en el biosensor. Los pocillos centrales se corresponden con los controles negativos de PBS con la misma concentración de AHL (10 μ M).

La Figura 21 muestra la ausencia de interferencia de Aii20J con la acción de algunos antibióticos β -lactámicos. Se muestra un antibiograma de pocillos que tienen diferentes antibióticos del grupo de las cefalosporinas frente a *Staphylococcus aureus*. En la placa de la izquierda se muestran los antibióticos no tratados. En la placa de la derecha se muestran los antibióticos tratados con Aii20J (20 μ g/ml durante 24 horas). El diámetro de los halos de inhibición no se vio afectado por el tratamiento con la enzima para ninguno de los antibióticos e inhibidores de la β -lactamasa ensayados.

La Figura 22 muestra la resistencia al ácido de *E. coli* K12 MG1655. Las células se cultivaron en glucosa LB (0,4 %) con diferentes condiciones: *E. coli* K-12 (Control), *E. coli* con OC6-HSL 5 μ M (control de AHL), *E. coli* con Aii20J a 20 μ g/ml (Aii20J) y *E. coli* con OC6-HSL y Aii20J (AHL Aii20J) a 30 °C, y después se subcultivaron en MEM a pH 2,0 con glucosa (0,4 %) y glutamato (1,6 mM) a la misma temperatura. La supervivencia de *E. coli* se determinó mediante la cuantificación de UFC/ml a las 0, 1,5 y 3 horas y se expresó como el porcentaje (%) de células viables con respecto a las 0 horas. Cada condición se ensayó por triplicado y las barras de error representan la desviación típica.

Descripción detallada de la invención

1. Polinucleótido de la invención

En un aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido, en adelante “polinucleótido de la invención”, que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante del mismo que tiene un grado de identidad de al menos un 76 % con respecto a dicha SEQ ID NO: 1 y que codifica un péptido con actividad inhibidora de *Quorum Sensing* (QS), en el que dicho péptido es un péptido que inhibe las señales mediadas por una N-acil-homoserina lactona (AHL) hidrolizando el anillo de lactona presente en dicha AHL.

En el sentido utilizado en la presente descripción, el término “*Quorum Sensing*” o “QS”, también conocido como “detección de cuórum”, se refiere a la capacidad de un microorganismo para percibir y responder a la densidad poblacional mediante la regulación de la expresión genética, siendo así capaz de desarrollar un comportamiento social coordinado. Así, las bacterias comunican su presencia a las demás usando pequeñas moléculas de señalización química, conocidas como “señales de QS”, que liberan, detectan y responden a la acumulación en el medio de dichas señales. La detección de dichas señales de QS permite a la bacteria distinguir entre una alta densidad de población y una baja densidad de población, de modo que, a medida que crece la población bacteriana se incrementa el nivel extracelular de la molécula señal, hasta que se alcanza una concentración umbral que equivale a un censo mínimo o cuórum que desencadena una variación de la expresión génica bacteriana en respuesta a cambios en el número de células. Se conocen 4 tipos principales de señales de QS:

- a) N-acil-homoserina lactonas (AHL), basadas en un anillo lactona (HSL) al que se une, mediante enlace amida, un ácido graso que constituye la cadena lateral; dicha cadena lateral tiene, normalmente, una longitud de entre 4 y 18 átomos de carbono, puede estar saturada o insaturada y puede presentar o no sustituciones oxo- o hidroxi- en el tercer átomo de carbono; ejemplos ilustrativos, no limitantes de dichas AHL incluyen AHL no sustituidas, tales como, por ejemplo, N-hexanoil-L-homoserina lactona (C4-HSL), N-hexanoil-L-homoserina lactona (C6-HSL), N-octanoil-L-homoserina lactona (C8-HSL), N-decanoil-L-homoserina lactona (C10-HSL), N-dodecanoil-L-homoserina lactona (C12-HSL), N-tetradecanoil-L-homoserina lactona (C14-HSL), etc., así como AHL oxo- o hidroxi-sustituidas, tales como, por ejemplo, N-oxohexanoil-L-homoserina lactona (OC6-HSL), N-oxododecanoil-L-homoserina lactona (OC12-HSL), etc. Este tipo de señales AHL son bastante habituales en bacterias gramnegativas aunque también se han descubierto en otros filos (por ejemplo, en algunas cianobacterias, en miembros de Citofaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB), también conocidos como Bacteroidetes);
- b) Péptidos autoinductores (AIP), corresponden a péptidos de bajo peso molecular (presentan habitualmente entre 5 y 34 restos de aminoácidos), que sufren modificaciones post-traduccionales; se conocen diferentes familias de AIP. Ejemplos ilustrativos, no limitantes, de dichos AIP incluyen la nisina, el AIP-1 de estafilococos, así como unos péptidos de triptófano isoprenilado. Las señales AIP de este tipo son bastante habituales en bacterias grampositivas; y
- c) Autoinductores de tipo μ (AI-2), cuya estructura es un diéster de borato de furanosilo, que se encuentran tanto en bacterias grampositivas como gramnegativas. Ejemplos ilustrativos, no limitantes, de este AI-2 incluyen (2S,4S)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahydrofurano-borato, (2R,4S)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahydrofurano-borato, etc.
- d) AI-3, cuya estructura no se conoce y se cree relacionada con la comunicación entre procariotas y eucariotas, que establece mecanismos de señalización cruzada con las hormonas eucariotas epinefrina y norepinefrina, y que se ha descrito en cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli* y otras enterobacterias.

En el sentido utilizado en la presente descripción, un péptido con “actividad inhibidora de *Quorum Sensing* (QS)”, se

refiere a un péptido que inhibe un proceso de QS mediado por señales de QS, en el que dichas señales de QS son AHL.

El péptido de la invención con actividad inhibidora de QS es un péptido que inhibe las señales mediadas por AHL hidrolizando el anillo lactona presente en dichas AHL, tal como un péptido con actividad lactonasa, es decir, un péptido que hidroliza la lactona (anillo HSL) generando el correspondiente ácido hidroxi-carboxílico. La actividad lactonasa del péptido de la invención (definido más adelante) puede determinarse mediante diversos ensayos enzimáticos conocidos por un experto en la materia. En general, todos los ensayos enzimáticos adecuados para tal fin miden el sustrato consumido o el producto generado en la reacción durante un periodo de tiempo determinado. En un caso particular, la actividad enzimática puede determinarse midiendo la velocidad inicial de reacción, método mediante el cual las mediciones se realizan en un periodo muy corto de tiempo y a concentraciones de saturación de sustrato, por lo que la concentración de sustrato libre se considera igual al sustrato inicial y la velocidad medida es la máxima alcanzada en las condiciones de reacción dadas. En otro caso particular, la actividad enzimática puede determinarse mediante la medición del progreso de la curva durante la reacción, en donde la concentración del sustrato consumido o del producto obtenido se determina como una función del tiempo. En otro caso particular, la actividad enzimática puede determinarse mediante la medición de la concentración de sustrato o de producto en la rápida fase inicial transitoria de la reacción enzimática en la que el complejo molecular intermedio llega a un periodo cinético constante. En otra realización particular, la actividad enzimática puede determinarse en la fase de equilibrio de la reacción, que consiste en la alteración del equilibrio de la reacción enzimática modificando las condiciones de reacción tales como temperatura, pH, presión, etc. y el estudio de cómo regresa de nuevo a las condiciones de equilibrio la mezcla de enzima, sustrato y producto.

La actividad lactonasa de un péptido puede determinarse por cualquier método convencional adecuado conocido por los expertos en la materia. Dicho método puede basarse en la determinación de la cantidad de sustrato consumido o de producto generado en la reacción durante un periodo de tiempo determinado. Para ello, se utilizará el sustrato adecuado para la actividad lactonasa que se ha de ensayar. En la parte experimental incluida en la presente descripción, se describen distintos ensayos adecuados para determinar la actividad lactonasa de un péptido (véase, por ejemplo, el Ejemplo 3, apartado 3.3).

En una realización particular, la actividad lactonasa de un péptido se determina mediante la hidrólisis de una lactona, preferentemente, una AHL, tal como una AHL no sustituida, por ejemplo, C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL o C14-HSL, o una AHL oxo- o hidroxi-sustituida, por ejemplo, OC6-HSL u OC12-HSL. A modo ilustrativo, no limitante, la actividad lactonasa de un péptido puede llevarse a cabo mediante un ensayo que comprende poner en contacto dicho péptido con el sustrato correspondiente, por ejemplo, C6-HSL, C10-HSL, OC6-HSL, etc., en condiciones apropiadas y, posteriormente, evaluar la presencia de sustrato no degradado mediante un bioensayo en placa con las cepas bioindicadoras *Chromobacterium violaceum* CV026 y *C. violaceum* VIR07, o bien mediante análisis de la cinética de degradación de sustrato (por ejemplo, una AHL tal como C6-HSL, C10-HSL u OC6-HSL) como resultado de la degradación por el péptido en estudio y valoración de la concentración de AHL mediante HPLC-EM de acuerdo con la metodología especificada en Romero et al. 2011.

En otra divulgación, el péptido con actividad inhibidora de QS es un péptido que degrada o inhibe las señales del tipo AIP, tal como un péptido con actividad hidrolasa, es decir, un péptido que hidroliza el péptido AIP o que inhibe la actividad de la señal mediada por dicho AIP. La actividad inhibidora de las señales mediadas por AIP puede determinarse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, tales como los métodos descritos en Boles and Horswill, 2008.

En otra divulgación, el péptido con actividad inhibidora de QS es un péptido que degrada o inhibe las señales AI-2, tal como un péptido con actividad hidrolasa, es decir, un péptido que hidroliza el AI-2 o que inhibe la actividad de la señal mediada por dicho AI-2. La actividad inhibidora de las señales mediadas por AI-2 puede determinarse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. La actividad de degradación de AI-2 puede determinarse usando cultivos de diferentes cepas de la especie marina bioluminiscente *Vibrio harveyi* con mutaciones específicas en los sistemas de QS que controlan la producción de luz, a los que se añade el péptido con actividad inhibidora de QS, y se evalúa la cantidad de luz producida. En concreto, en la cepa JMH597 de esta especie, solo el canal de AI-2 (AHL-, AI-2 +, CAI-1-) está activo, por lo que en caso de que el péptido añadido al cultivo tenga actividad QQ contra AI-2, no se produciría luz en esta cepa en concreto.

En otra divulgación, el péptido con actividad inhibidora de QS es un péptido que degrada o inhibe las señales mediadas por AI-3, tal como un péptido con actividad hidrolasa, es decir, un péptido que hidroliza el péptido AI-3 o que inhibe la actividad de la señal mediada por dicho AI-3. La actividad inhibidora de las señales mediadas por AI-3 puede determinarse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, tales como los descritos en Hughes et al, 2009.

La SEQ ID NO: 1 se ha identificado a partir de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J (CECT 7426), una bacteria marina con alta capacidad de degradación de señales de AHL, como se menciona en la Solicitud de Patente Europea EP 2 356 991 A1 y en la Patente Española ES2342807, mediante un ensayo basado en la construcción de una librería genómica de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J en fósido y cribado funcional, como se describe en el Ejemplo 1. Dicha

SEQ ID NO: 1 codifica un péptido con actividad inhibidora de QS. Ensayos realizados por los inventores han demostrado claramente que el péptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 2 (definido más adelante), codificado por dicha SEQ ID NO: 1, inhibe las señales de QS mediadas por AHL ya que tiene, al menos, actividad lactonasa e hidroliza AHL (Ejemplo 3).

5 Por tanto, en una realización particular, el polinucleótido de la invención comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 1 incluye tanto el codón de inicio (ATG) como el de terminación (TAA).

10 En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos del polinucleótido consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

En otra realización particular, el polinucleótido de la invención es una variante sustancialmente homóloga y funcionalmente equivalente del polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos se muestra en la SEQ ID NO: 1.

15 En el sentido utilizado en la presente descripción, un polinucleótido es “sustancialmente homólogo” al polinucleótido de SEQ ID NO: 1 cuando la secuencia de nucleótidos del mismo tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 de, al menos, un 76 %, ventajosamente de, al menos un 85 %, preferentemente de, al menos, un 90 %, más preferentemente de, al menos, un 91 %, 92 %, 93 %, 95 %, 96 %, 20 97 % o 98 %, y, todavía más preferentemente de, al menos un 99 %. El grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos convencionales de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo, BLAST (Altschul S.F. et al. 1990). A modo ilustrativo, un polinucleótido sustancialmente homólogo al polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos comprende, o consiste en, la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 se puede construir en 25 base a la secuencia de nucleótidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 1 mediante la introducción de, por ejemplo, nucleótidos o codones que codifican aminoácidos que constituyen sustituciones conservadoras o no conservadoras con respecto a los aminoácidos codificados por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1. Otros ejemplos ilustrativos de posibles modificaciones incluyen la inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la secuencia, o la delección de uno o más 30 nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia.

En el sentido utilizado en la presente descripción, un polinucleótido es “funcionalmente equivalente” al polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos comprende, o consiste en, la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 cuando codifica un péptido que tiene actividad inhibidora de QS. La actividad inhibidora del péptido codificado por 35 polinucleótido funcionalmente equivalente al polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos comprende, o consiste en, la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 puede determinarse por métodos convencionales para determinar dicha actividad inhibidora de QS (actividad inhibidora de señales mediadas por las AHL), tales como los mencionados anteriormente.

40 En una realización particular, el polinucleótido de la invención es una variante sustancialmente homóloga y funcionalmente equivalente del mismo, es decir, es un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos tiene un grado de identidad de al menos un 76 %, ventajosamente de, al menos un 85 %, preferentemente de, al menos, un 90 %, más preferentemente de, al menos, un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 %, y, todavía más preferentemente de, al menos un 99 %, con respecto a la secuencia de nucleótidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 45 1 y codifica un péptido con actividad inhibidora de QS. En una realización particular, el polinucleótido de la invención es un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos tiene un grado de identidad de al menos un 76 % con respecto a la secuencia de nucleótidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 1 y codifica un péptido con actividad inhibidora de QS, en el que dicho péptido es un péptido que inhibe las señales mediadas por una N-acyl-homoserina lactona (AHL) hidrolizando el anillo de lactona presente en dicha AHL. En otra realización particular, el polinucleótido de la 50 invención es un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos tiene un grado de identidad de al menos un 90 % con respecto a la secuencia de nucleótidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 1 y codifica un péptido con actividad inhibidora de QS, en el que dicho péptido es un péptido que inhibe las señales mediadas por una N-acyl-homoserina lactona (AHL) hidrolizando el anillo de lactona presente en dicha AHL. En otra realización particular, el polinucleótido de la invención es un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos tiene un grado de identidad de al menos un 99 % 55 con respecto a la secuencia de nucleótidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 1 y codifica un péptido con actividad inhibidora de QS, en el que dicho péptido es un péptido que inhibe las señales mediadas por una N-acyl-homoserina lactona (AHL) hidrolizando el anillo de lactona presente en dicha AHL.

60 El polinucleótido de la invención puede encontrarse como tal o formando parte de una construcción génica, en adelante construcción génica de la invención, que comprende dicho polinucleótido de la invención.

La construcción génica de la invención puede incorporar, de manera operativamente unida, una secuencia reguladora de la expresión del polinucleótido de la invención, constituyendo de este modo un cassette de expresión. Tal como se usa en la presente descripción, la expresión “operativamente unida” significa que el péptido de la 65 invención, codificado por el polinucleótido de la invención, se expresa en el marco de lectura correcto bajo el control de las secuencias de control o reguladoras de expresión. Las secuencias de control son secuencias que controlan y

regulan la transcripción y, en su caso, la traducción del péptido de la invención, e incluyen secuencias promotoras, secuencias codificantes para reguladores transcripcionales, secuencias de unión a ribosomas (RBS) y/o secuencias terminadoras de transcripción. En una realización particular, dicha secuencia de control de expresión es funcional en células y organismos procariotas, por ejemplo, bacterias, etc., mientras que en otra realización particular, dicha

secuencia de control de expresión es funcional en células y organismos eucariotas, por ejemplo, células de insecto, células vegetales, células de mamífero, etc. Ventajosamente, la construcción de la invención comprende, además, un marcador o gen que codifica un motivo o un fenotipo que permita la selección de la célula hospedadora transformada con dicha construcción. La construcción génica de la invención puede obtenerse mediante el uso de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica (Sambrook et al., 2001).

La construcción génica de la invención puede insertarse en un vector adecuado. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un vector, tal como un vector recombinante, en adelante vector de la invención, que comprende el polinucleótido de la invención o la construcción génica de la invención. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. En una realización particular, el vector de la invención es un vector de expresión. A modo ilustrativo, no limitante, el vector el que se introduce el polinucleótido de la invención puede ser un plásmido que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se puede integrar o no en el genoma de dicha célula. Ejemplos ilustrativos, no limitantes, de vectores en los que puede insertarse el polinucleótido de la invención o la construcción génica de la invención incluyen el plásmido pET28c(+). El vector de la invención puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (Sambrook et al., 2001). En una realización particular, dicho vector es un vector útil para transformar células competentes de *Escherichia coli* (Ejemplo 3).

El vector de la invención puede utilizarse para transformar células susceptibles de ser transformadas por dicho vector. Dichas células pueden ser procariotas o eucariotas. El vector de la invención puede utilizarse para transformar células eucariotas, tales como levaduras, por ejemplo, *Pichia pastoris*, etc., o microalgas, por ejemplo, *Chlamydomonas reinhardtii*, etc., o células procariotas, tales como bacterias, por ejemplo, *E. coli*, etc.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una célula hospedadora transformada con el vector de la invención, en adelante célula de la invención, y es capaz de expresar la proteína de la invención, o el péptido de la invención (definido más adelante), con la condición de que dicha célula de la invención no sea una bacteria del género *Tenacibaculum*. Tal como se usa en el presente documento, el término “célula”, se refiere a la unidad más pequeña que mantiene las propiedades fundamentales de la vida, y, comprende células procarióticas, eucarióticas y mesocarióticas, así como células de organismos unicelulares (por ejemplo, bacterias) y multicelulares (por ejemplo, animales, plantas). Así, a modo ilustrativo, la célula de la invención puede ser una célula eucariota, tal como, por ejemplo, una célula de tejido vegetal, una levadura, una microalga, etc., una célula procariota, tal como una bacteria, por ejemplo, *E. coli*, etc. La obtención de células de tejidos vegetales transformadas con el vector de la invención (definido más adelante) puede ser muy interesante desde diversos puntos de vista, por ejemplo, para aumentar la resistencia a bacterias patógenas, en particular, bacterias productoras de señales de QS. Las células de la invención pueden obtenerse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (Sambrook et al., 2001). Dicha célula de la invención es una célula hospedadora transformada con un vector de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a un organismo no humano transgénico, en adelante “organismo transgénico de la invención”, que comprende, insertado en el genoma del mismo, el polinucleótido de la invención, la construcción génica de la invención, el cassette de expresión proporcionado por la presente invención o el vector de la invención, con la condición de que dicho organismo no humano no sea una bacteria del género *Tenacibaculum*. El organismo transgénico de la invención puede ser una planta, por ejemplo, de tabaco, patata, tomate, cebolla, algodón, lino, café, cacao, caucho, roble, castaño, cerezo, etc., un cereal, por ejemplo, maíz, trigo, arroz, cebada, avena, etc., o un animal, por ejemplo, pez cebra, salmón, conejo, ratón, etc. Debido a que el polinucleótido de la invención codifica un péptido con actividad inhibidora de QS, el organismo transgénico de la invención será resistente, o sustancialmente más resistente que el correspondiente organismo no transgénico que no contiene insertado en el genoma del mismo el polinucleótido de la invención, a las infecciones provocadas por organismos que producen señales de QS, por ejemplo, bacterias, y/o podrá provocar un proceso de *Quorum Quenching* (QQ) en respuesta a un proceso de QS. El organismo transgénico de la invención puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (Sambrook et al., 2001); dichos métodos incluyen el uso de cañones de genes o el uso de bacterias o virus como vectores para transferir el polinucleótido de la invención. Dong et al (2001) describe la obtención de plantas de tabaco y de patata transformadas con la secuencia correspondiente a una lactonasa de *Bacillus* sp. con actividad sobre AHL, por lo que el organismo transgénico de la invención puede obtenerse, por ejemplo, mediante los métodos descritos en dicha publicación.

2. Péptido de la invención

En otro aspecto, la invención se refiere a un péptido aislado, en adelante “péptido de la invención”, cuya secuencia de aminoácidos corresponde a la secuencia de aminoácidos codificada por el polinucleótido de la invención.

El término “péptido”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cadena de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, independientemente de su longitud, e incluye tanto cadenas de aminoácidos de 10 o menos

aminoácidos (en algunas publicaciones identificados como “oligopéptidos”) como cadenas de aminoácidos de más de 10 aminoácidos, por ejemplo, más de 100 aminoácidos.

En una realización particular, el péptido de la invención comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 corresponde a la secuencia codificada por el polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos se muestra en la SEQ ID NO: 1. Dicho péptido tiene actividad inhibidora de QS. Las características de dicha actividad inhibidora de QS se ha mencionado anteriormente en relación con el polipéptido de la invención así como los ensayos para identificar si un determinado péptido tiene o no dicha actividad inhibidora de QS. Ensayos realizados por los inventores han demostrado claramente que el péptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 2, inhibe QS, tales como las señales mediadas por AHL, por lo que, al menos, tiene actividad lactonasa e hidroliza las AHL (Ejemplo 3).

En otra realización particular, la secuencia de aminoácidos del péptido de la invención consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. En ocasiones, dicho péptido se denomina “Aii20J” en la presente descripción.

En otra realización particular, el péptido de la invención es una variante sustancialmente homóloga y funcionalmente equivalente del péptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 2.

En el sentido utilizado en la presente descripción, un péptido es “sustancialmente homólogo” al péptido de SEQ ID NO: 2 cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 de, al menos, un 76 %, ventajosamente de, al menos un 85 %, preferentemente de, al menos, un 90 %, más preferentemente de, al menos, un 91 %, 92 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 %, y, todavía más preferentemente de, al menos un 99 %. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos convencionales de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo, BLAST (Altschul S.F. et al. 1990). A modo ilustrativo, un péptido sustancialmente homólogo al péptido cuya secuencia de nucleótidos comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 se puede construir basándose en la secuencia de aminoácidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 2 mediante la introducción de, por ejemplo, aminoácidos que constituyen sustituciones conservadoras o no conservadoras con respecto a los aminoácidos presentes en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2. Otros ejemplos ilustrativos de posibles modificaciones incluyen la adición de uno o más aminoácidos en cualquiera de los extremos (extremos amino o carboxilo), la inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia, o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia.

En el sentido utilizado en la presente descripción, un péptido es “funcionalmente equivalente” al péptido cuya secuencia de aminoácidos comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 cuando tiene actividad inhibidora de QS, en el que dicho péptido es un péptido que inhibe las señales mediadas por una N-acil-homoserina lactona (AHL) hidrolizando el anillo de lactona presente en dicha AHL. La actividad inhibidora del péptido funcionalmente equivalente al péptido cuya secuencia de aminoácidos comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 puede ser determinada por métodos convencionales de determinación de dicha actividad inhibidora de QS (actividad inhibidora de señales mediadas por las AHL), tales como los métodos mencionados anteriormente.

En una realización particular, el péptido de la invención es una variante sustancialmente homóloga y funcionalmente equivalente del mismo, es decir, es un péptido cuya secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad de al menos un 76 %, ventajosamente de, al menos un 85 %, preferentemente de, al menos, un 90 %, más preferentemente de, al menos, un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 %, y, todavía más preferentemente de, al menos un 99 %, con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 2 y tiene actividad inhibidora de QS, en el que dicho péptido es un péptido que inhibe las señales mediadas por una N-acil-homoserina lactona (AHL) hidrolizando el anillo de lactona presente en dicha AHL. En una realización específica, el péptido de la invención es un péptido cuya secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad de al menos un 76 % con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 2 y tiene actividad inhibidora de QS, en el que dicho péptido es un péptido que inhibe las señales mediadas por una N-acil-homoserina lactona (AHL) hidrolizando el anillo de lactona presente en dicha AHL. En otra realización específica, el péptido de la invención es un péptido cuya secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad de al menos un 93 % con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 2 y tiene actividad inhibidora de QS, en el que dicho péptido es un péptido que inhibe las señales mediadas por una N-acil-homoserina lactona (AHL) hidrolizando el anillo de lactona presente en dicha AHL. En otra realización específica, el péptido de la invención es un péptido cuya secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad de al menos un 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 2 y tiene actividad inhibidora de QS, en el que dicho péptido es un péptido que inhibe las señales mediadas por una N-acil-homoserina lactona (AHL) hidrolizando el anillo de lactona presente en dicha AHL.

Un experto en la materia entenderá que las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en la presente descripción pueden estar modificadas químicamente, por ejemplo, mediante modificaciones químicas que son

fisiológicamente relevantes, tales como, fosforilaciones, acetilaciones, etc.

Asimismo, el experto en la materia entenderá que dentro de dichas variantes sustancialmente homólogas y funcionalmente equivalentes del péptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 2 se encuentran los fragmentos peptídicos que satisfacen dichas condiciones.

El péptido de la invención puede encontrarse como tal o formando parte de una proteína de fusión, la cual constituye un aspecto adicional de la presente invención. Dicha proteína de fusión comprende, por tanto, un polipéptido A que comprende un péptido de la invención, y un polipéptido B, donde dicho polipéptido B es un polipéptido diferente a dicho polipéptido A. El polipéptido B puede estar unido a cualquier extremo del polipéptido A. Así, en una realización particular, el extremo amino terminal del polipéptido B está unido al extremo carboxilo terminal del polipéptido A, mientras que, en otra realización particular, el extremo carboxilo terminal del polipéptido B está unido al extremo amino terminal del polipéptido A. Ambos polipéptidos A y B pueden estar unidos directamente entre sí, o bien a través de un péptido enlazador entre dichos polipéptidos A y B. La proteína de fusión puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante la expresión de un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína de fusión en células hospedadoras adecuadas. El polipéptido A comprende un péptido de la invención, cuyas características ya se han mencionado. La proteína de fusión tiene actividad inhibidora de QS, en particular, actividad inhibidora de señales de QS mediadas por AHL, más concretamente, actividad lactonasa para hidrolizar AHL. El polipéptido B es un polipéptido "diferente" del polipéptido A, es decir, es un polipéptido distinto del polipéptido A; en este sentido, en una realización particular, el polipéptido B es un péptido diferente de un péptido de la invención, mientras que, en otra realización particular, el polipéptido B es un péptido de la invención pero diferente del péptido de la invención concreto comprendido en el polipéptido A en una proteína de fusión determinada. Prácticamente cualquier polipéptido puede utilizarse como polipéptido B en la proteína de fusión de la invención, siempre y cuando cumpla la condición de que sea diferente del polipéptido A. Ejemplos ilustrativos, no limitantes, de péptidos que pueden utilizarse como polipéptido B en la presente invención incluyen péptidos útiles para aislar y/o purificar proteínas, etc. Así, en una realización particular, dicho polipéptido B es un péptido útil para aislar y/o purificar proteínas. En general, dicho péptido útil para aislar y/o purificar proteínas estará situado en una región de la proteína de fusión de la invención que no afecte adversamente a la funcionalidad del péptido de la invención. Prácticamente cualquier péptido que pueda utilizarse para aislar y/o purificar una proteína de fusión (denominado genéricamente "péptidos marcadores" o "marcadores") puede estar presente en dicha proteína de fusión. A modo ilustrativo, no limitante, dicho péptido útil para aislar y/o purificar una proteína, tal como una proteína de fusión, puede ser, por ejemplo, un marcador arginina (Arg-tag), un marcador de histidina (His-tag), FLAG-tag, Strep-tag, un epítipo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo, tal como c-myc-tag, etc. En una realización particular y preferida de dicha proteína de fusión, dicho polipéptido B comprende un marcador de polihistidina.

Ensayos realizados por los inventores han demostrado claramente que el péptido de la invención, en particular, el péptido cuya secuencia de aminoácidos comprende, o consiste en, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, es estable en determinadas condiciones. En el sentido utilizado en la presente descripción, el término "estable" se refiere a la capacidad del péptido de la invención de mantener su actividad inhibidora de QS en determinadas condiciones, por ejemplo, pH, proteinasas, entre otras, y que además carece de actividad frente a antibióticos β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas. Así, se ha observado que dicho péptido de la invención, además de tener actividad lactonasa de amplio espectro, degradando AHL con cadenas laterales comprendidas entre 4 y 14 átomos de carbono, tanto oxo- o hidroxil-sustituídas como no sustituidas, es resistente al pH en el intervalo comprendido entre 3 y 9, es resistente a proteinasa K y quimiotripsina, y no interactúa con antibióticos β -lactámicos (por ejemplo, Penicilina G, Metecilina, Amoxicilina, Ampicilina, Cefalotina, Cefaclor, Cefoxitina, Ceftriaxona, Cefoperazona, Imipenem y Meropenem) ni con inhibidores de las β -lactamasas (por ejemplo, Sulbactam y ácido clavulánico), como se observa en el Ejemplo 3.

La estabilidad de un péptido puede determinarse empleando diversos ensayos conocidos por los expertos en la materia. Algunos de dichos ensayos se basan en determinar la conservación (o pérdida) de la actividad del péptido en determinadas condiciones. A modo ilustrativo, no limitante, la estabilidad de un péptido puede determinarse mediante los ensayos mencionados en el Ejemplo 3.

El péptido de la invención puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Aunque dicho péptido de la invención puede aislarse a partir de un organismo productor del mismo, por ejemplo, *Tenacibaculum* sp. cepa 20J (CECT 7426), en una realización particular y preferida, dicho péptido de la invención puede obtenerse por métodos basados en la tecnología del ADN recombinante.

Por tanto, en otro aspecto, se desvela un método para la obtención de un péptido de la invención, que comprende cultivar una célula de la invención en condiciones que permiten la producción de dicho péptido y, si se desea, recuperar dicho péptido del medio de cultivo. Las condiciones para optimizar el cultivo de dicha célula dependerán de la célula utilizada. El experto en la materia conoce dichas condiciones. El procedimiento para producir el péptido de la invención incluye, opcionalmente, el aislamiento y purificación de dicho péptido de la invención.

3. Usos

Debido a la actividad inhibidora de QS del péptido de la invención, el polinucleótido de la invención, el vector de la invención, la célula de la invención, el organismo transgénico de la invención, o el péptido de la invención presentan multitud de potenciales usos en diferentes sectores de la técnica, entre los que se encuentran el sector alimentario, el sector farmacéutico y el sector agrícola.

En general, para la administración y/o uso del mismo, el péptido de la invención, o el polinucleótido de la invención, o el vector de la invención, o la célula de la invención, o el organismo transgénico de la invención, se combinará con un vehículo adecuado.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una composición, en adelante composición de la invención, que comprende el vector de la invención o la célula hospedadora de la invención.

Por razones de simplicidad, en la presente descripción, se hará referencia, en ocasiones, al vector de la invención o la célula hospedadora de la invención con la expresión genérica "componente activo de la invención".

Las características del componente activo (vector o célula) en la composición de la invención ya se han definido anteriormente. El componente activo de la invención, presente en la composición de la invención, se selecciona entre el grupo que consiste en el vector de la invención y la célula hospedadora de la invención.

Como se ha mencionado anteriormente, el componente activo de la invención puede estar presente en un vehículo adecuado para la administración y/o uso del mismo. En general, dicho vehículo se elegirá dependiendo del uso al que se destina el componente activo de la invención y de la forma de dosificación del mismo. No obstante, en una realización particular, el vehículo en el que puede estar presente el componente activo de la composición de la invención es un vehículo seleccionado entre:

- un vehículo adecuado para alimentación;
- un vehículo farmacéuticamente aceptable; y
- un vehículo agrícolamente aceptable.

3.1 Usos en el sector alimentario

En una realización particular, la composición de la invención comprende un componente activo de la invención junto con un vehículo adecuado para alimentación.

Así, de acuerdo con esta realización particular, la composición de la invención es un producto alimenticio. En el sentido utilizado en la presente descripción, el término "producto alimenticio" incluye cualquier sustancia o producto de cualquier tipo, es decir, sólido o líquido, natural o transformado, que por sus características, usos, componentes, preparación y estado de conservación, sea susceptible de ser habitual o idóneamente utilizado en alguno de los fines siguientes: a) para la nutrición normal humana o animal o como componentes que no tienen ningún valor nutricional; o b) como aditivos o productos dietéticos, en casos especiales de alimentación humana o animal. Asimismo, dicho término también incluye los piensos o materias naturales y productos elaborados, de cualquier origen, que, por separado o convenientemente mezclados entre sí, sean adecuados para la alimentación animal. El término "producto alimenticio", tal como se usa en el presente documento también incluye composiciones nutracéuticas, es decir, composiciones adecuadas para su uso en seres humanos o animales que comprenden uno o más productos naturales con acción terapéutica o que proporcionan un beneficio para la salud o que se han asociado a la prevención o disminución de enfermedades, por ejemplo, bacterias probióticas, etc., e incluye suplementos dietéticos presentados en una matriz no alimenticia (por ejemplo, cápsulas, polvo, etc.) de un producto natural bioactivo concentrado presente normalmente (o no) en los alimentos y que, tomado en dosis superior a la existente en esos alimentos ejerce un efecto favorable sobre la salud, mayor que el que podría tener el alimento normal. Un alimento listo para consumir es aquel que no necesita diluirse mediante, por ejemplo, una solución acuosa adecuada para el consumo. En teoría, los ingredientes presentes en un alimento listo para consumir están equilibrados y no se necesita añadir ingredientes adicionales al alimento para volverlo listo para el consumo, tal como considera un experto en la materia. Un alimento concentrado es un alimento en el que uno o más ingredientes están presentes en mayor concentración que en un alimento listo para consumir, por lo que para el uso del mismo, es necesario diluirlo mediante, por ejemplo, una solución acuosa adecuada para el consumo. Ejemplos ilustrativos, no limitantes, de alimentos proporcionados por la presente invención incluyen tanto productos alimenticios destinados a consumo humano, como piensos y productos concentrados para alimentación animal, tales como piensos y concentrados alimenticios destinados para su uso en acuicultura o en cualquier animal, ya sea que dicho animal sea un animal de producción, doméstico o silvestre, tal como perros, gatos, bóvidos, óvidos, suidos, équidos, etc.

El uso del polinucleótido aislado de la invención, el vector de la invención, la célula hospedadora de la invención, el organismo no humano transgénico de la invención en el que dicho organismo no humano transgénico es una planta, o el péptido aislado de la invención, en la preparación de un producto alimenticio, constituye un aspecto adicional de

la presente invención. En una realización particular, dicho producto alimenticio es una sustancia o producto susceptible de utilizarse en alimentos, piensos, aditivos alimentarios, suplementos dietéticos, composiciones nutraceuticas, etc., tanto para alimentación humana como animal.

5 3.2 Usos en el sector farmacéutico

En otra realización particular, la composición de la invención es una composición farmacéutica que comprende, además del componente activo presente en la composición de la invención, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Composiciones de este tipo son adecuadas para la administración a un sujeto del componente activo presente en la composición de la invención. En general, dicho vehículo farmacéuticamente aceptable se elegirá en función de la naturaleza del componente activo (por ejemplo, vector de la invención, célula de la invención), de la forma de presentación elegida, por ejemplo, sólida (por ejemplo, comprimidos, cápsulas, comprimidos recubiertos, gránulos, supositorios, etc.) o líquida (por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.) y de la vía de administración elegida, por ejemplo, oral, parenteral (por ejemplo, intramuscular, subcutánea, intravenosa, etc.), rectal, etc. En cada caso se elegirán los excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados para la forma farmacéutica de administración y vía de administración elegida. Información sobre excipientes adecuados para la formulación de composiciones farmacéuticas destinadas a su administración por vía oral, parenteral o rectal, así como sobre la producción de dichas composiciones farmacéuticas puede encontrarse en el libro titulado "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 10ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

En otro aspecto, la invención se refiere a un producto de la invención (es decir, el polinucleótido aislado de la invención, el vector de la invención, la célula hospedadora de la invención, el organismo no humano transgénico de la invención en el que dicho organismo no humano transgénico es una planta, o el péptido aislado de la invención) para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una infección bacteriana. En una realización particular, la bacteria causante de dicha infección bacteriana es una bacteria productora de señales de QS. En una realización específica, dichas señales de QS producidas por la bacteria causante de la infección comprenden, al menos, una AHL. Ejemplos ilustrativos, no limitantes de dichas AHL incluyen AHL no sustituidas, tales como, por ejemplo, C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL o C14-HSL, así como AHL oxo- o hidroxí-sustituidas, tales como, por ejemplo, OC6-HSL, OC12-HSL, etc. En una realización particular, dicha bacteria es *Escherichia coli*, un patógeno humano importante (véase el Ejemplo 4 en el que el uso potencial de Aii20J en el control de la expresión de *E. coli* se muestra claramente). En otra realización particular, las infecciones causadas por bacterias productoras de las señales de QS son debidas a la formación de biofilms. Las bacterias que forman biofilm pueden ser, pero sin limitarse, bacterias de la cavidad oral tales como las causantes de caries y enfermedad periodontal, o bacterias que colonizan las superficies de los implantes médicos o de los dispositivos insertados en el organismo, tales como catéteres, prótesis, etc. Por tanto, en una realización particular, la composición farmacéutica de la invención es una composición dentifírica. En otra realización particular, la composición farmacéutica está destinada a prevenir la formación de biofilms o a eliminar los biofilms ya formados sobre dispositivos o implantes médicos tales como catéteres, prótesis, etc.

La composición farmacéutica proporcionada por la presente invención también puede contener, si se desea, uno o más agentes antibacterianos, siempre y cuando no sean incompatibles con el componente activo de la invención presente en la composición de la invención. La combinación del componente activo de la invención con antibióticos puede ser una estrategia muy interesante en el tratamiento de enfermedades bacterianas causadas por bacterias multirresistentes.

La composición farmacéutica proporcionada por la presente invención puede aplicarse o administrarse a un sujeto en necesidad de prevención y/o tratamiento. El término "sujeto", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un miembro de una especie animal, preferentemente, un mamífero, e incluye, pero no se limita a, animales domésticos, primates y humanos; preferentemente, el sujeto es un ser humano, masculino o femenino, de cualquier edad o raza.

Las características de la composición farmacéutica proporcionada por la presente invención y de los componentes activos de la invención ya se han definido anteriormente. Asimismo, las características de la forma de presentación y administración de la composición farmacéutica proporcionada por la presente invención, así como de los componentes activos de la invención ya se han mencionado anteriormente.

3.3 Usos en el sector agrícola

En otra realización particular, la composición de la invención es una composición agrícola que comprende, además del componente activo presente en la composición de la invención, un vehículo agrícolamente aceptable. Composiciones de este tipo son adecuadas para la administración a las plantas del componente activo presente en la composición de la invención. En general, dicho vehículo agrícolamente aceptable se elegirá en función de la naturaleza del componente activo, de la forma de presentación elegida, por ejemplo, sólida o líquida, etc. En cada caso se elegirán los ingredientes agrícolamente aceptables adecuados para la forma de administración elegida. Prácticamente cualquier vehículo agrícolamente aceptable puede utilizarse en la preparación de la composición agrícola proporcionada por la presente invención; no obstante, en una realización particular, dicho vehículo

agrícolamente aceptable comprende un fertilizante, tal como, por ejemplo, un fertilizante, sólido o líquido. Ejemplos ilustrativos, no limitantes, de dichos fertilizantes sólidos incluyen fertilizantes sólidos de tipo NPK, etc. Alternativamente, puede utilizarse cualquier fertilizante líquido con un pH comprendido entre 3 y 9, en el que el péptido de la invención mantiene su actividad inhibidora de QS; ejemplos ilustrativos, no limitantes de dichos fertilizantes líquidos incluyen fertilizantes a base de ácidos fúlvicos, fertilizantes líquidos con distinta composición NPK, tales como las mezclas 16:2:4, las mezclas 20:5:0, etc., o diversos tipos de fertilizantes en gotas con composición NPK de 8:9:9, 16:4:4, etc.

La composición agrícola proporcionada por la presente invención puede obtenerse por métodos convencionales mediante la mezcla del componente activo con el vehículo agrícolamente aceptable.

La composición agrícola proporcionada por la presente invención puede utilizarse en la prevención y/o el tratamiento de una infección bacteriana en plantas. En una realización particular, la bacteria causante de dicha infección bacteriana es una bacteria productora de señales de QS. En una realización particular, dichas señales de QS producidas por la bacteria causante de la infección comprenden, al menos, una AHL. Ejemplos ilustrativos, no limitantes de dichas AHL incluyen AHL no sustituidas, tales como, por ejemplo, C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL o C14-HSL, así como AHL oxo- o hidroxi-sustituidas, tales como, por ejemplo, OC6-HSL, OC12-HSL, etc.

La composición agrícola proporcionada por la presente invención también puede contener, si se desea, uno o más agentes antibacterianos, siempre y cuando no sean incompatibles con el componente activo de la invención presente en la composición de la invención.

La composición agrícola proporcionada por la presente invención puede presentarse en cualquier forma de presentación adecuada para su administración o aplicación a la planta o al suelo que rodea a las plantas, por ejemplo, en forma sólida o líquida. Las formas de presentación líquidas son adecuadas para su pulverización sobre el suelo, la planta o el material vegetal, en general, o para crear un baño en el que se sumergen las plantas o el material vegetal.

La composición agrícola proporcionada por la presente invención puede aplicarse por cualquier método convencional. En una realización particular, la composición de la invención se aplica mediante pulverización al suelo, a la planta o al material vegetal, o mediante inmersión de la planta o el material vegetal en un baño que contiene la composición de la invención. Alternativamente, las semillas de las plantas pueden someterse a un tratamiento de granulación con la composición agrícola proporcionada por la presente invención.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso del polinucleótido aislado de la invención, el vector de la invención, el péptido aislado de la invención, la célula hospedadora de la invención o el organismo no humano transgénico de la invención en el que dicho organismo no humano transgénico es una planta, en la preparación de una composición agrícola.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para controlar una enfermedad bacteriana en una planta, que comprende poner en contacto dicha planta con el péptido aislado de la invención, en el que dicha enfermedad bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de QS, en condiciones que permiten controlar dicha enfermedad bacteriana. En una realización particular, el péptido de la invención se formula en una composición agrícola proporcionada por la presente invención y dicha composición se aplica sobre la planta que se ha de tratar. En otra realización particular, el péptido de la invención se pone en contacto con la bacteria productora de señales de QS en condiciones que permiten el contacto y la interacción entre el péptido de la invención y las señales de QS producidas por la bacteria causante de la infección. Un experto en la materia entenderá que el péptido de la invención debe añadirse en una cantidad suficiente como para obtener resultados beneficiosos o deseados, es decir, en la cantidad apropiada para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, retardar o retrasar la progresión de estadios de enfermedades causadas por bacterias en plantas. Dicha cantidad puede administrarse en una sola aplicación o en varias aplicaciones. Asimismo, el experto en la materia conoce, o puede identificar, las condiciones de administración del péptido de la invención que permiten controlar dicha enfermedad bacteriana.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para controlar una enfermedad bacteriana en una planta, que comprende transformar dicha planta con el polinucleótido aislado de la invención, o con el vector de la invención, en el que dicha enfermedad bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de QS. La obtención de plantas transformadas con el polinucleótido o vector de la invención se lleva a cabo por métodos convencionales de transformación de plantas, basados, por ejemplo, en el uso de vectores apropiados, así como en los métodos descritos en, por ejemplo, Izquierdo 1993 o Dong et al. 2011.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para controlar una enfermedad bacteriana en una planta, que comprende el uso de una bacteria transformada con el polinucleótido aislado de la invención, o con el vector de la invención, en el que dicha enfermedad bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de QS, en condiciones que permiten controlar dicha enfermedad bacteriana.

En cualquiera de los tres métodos mencionados anteriormente para controlar una enfermedad bacteriana en una planta, la enfermedad bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de QS. En una realización específica, dichas señales de QS producidas por la bacteria causante de la infección comprenden, al menos, una AHL. Ejemplos ilustrativos, no limitantes de dichas AHL incluyen AHL no sustituidas, tales como, por ejemplo, C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL o C14-HSL, así como AHL oxo- o hidroxi-sustituidas, tales como, por ejemplo, OC6-HSL, OC12-HSL, etc.

Ejemplos ilustrativos y no limitantes de bacterias fitopatógenas incluyen bacterias grampositivas tales como, por ejemplo, bacterias pertenecientes a los géneros *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Streptomyces*, etc., así como bacterias gramnegativas tales como, por ejemplo, bacterias pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Brenneria*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Gluconacetobacter*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Xylella*, etc. En una realización particular, dicha bacteria fitopatógena es una bacteria gramnegativa patógena de plantas con QS y una bacteria productora de cualquier AHL tal como, por ejemplo, *Brenneria* sp., *Burkholderia glumae*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* (en caña de azúcar), *Pantoea ananatis*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pseudomonas syringae*, etc.

La composición agrícola proporcionada por la presente invención puede aplicarse o administrarse a una planta en necesidad de controlar una enfermedad bacteriana. La expresión “controlar una enfermedad bacteriana” en una planta hace referencia a prevenir y/o tratar la enfermedad bacteriana, así como a mantener el control sobre una población bacteriana en niveles que no ocasionan daño para la planta ni efectos nocivos para los sujetos que se alimentan de dichas plantas. El término “planta”, tal como se usa en el presente documento, incluye a cualquier ser vivo fotosintético.

3.4 *Quorum quenching* e inhibición del proceso de QS

En otro aspecto, la invención se refiere a la invención se refiere a un método para provocar un proceso de QQ en respuesta a un proceso de QS o para inhibir un proceso de QS, en el que dicho proceso de QS es causado por una bacteria productora de señal QS, que comprende poner en contacto dicha bacteria con el polinucleótido aislado de la invención, el vector de la invención, el péptido aislado de la invención, la célula hospedadora de la invención o el organismo no humano transgénico de la invención en el que dicho organismo no humano transgénico es una planta, en condiciones que permiten provocar dicho proceso de QQ o inhibir dicho proceso de QS, y en el que dicho método no consiste en un método de tratamiento quirúrgico o terapéutico del cuerpo humano o animal.

En el sentido utilizado en la presente descripción, la expresión provocar un “proceso de *quorum quenching* (QQ)” en respuesta a un proceso de QS hace referencia al desarrollo de una estrategia de inactivación del proceso de QS.

En el sentido utilizado en la presente descripción, la expresión “inhibir un proceso de QS” incluye inactivar el proceso de QS, así como interceptar la comunicación bacteriana mediada por señales de QS (por ejemplo, AHL, APIs, AI-2 y AI-3). Este método constituye, por tanto, un prometedor método para controlar bacterias, en particular, bacterias patógenas (por ejemplo, de plantas y animales, incluyendo seres humanos) que emplean un proceso de QS basado en distintos tipos de señales de QS para regular la síntesis de factores de virulencia o para formar biofilms.

Las características del polinucleótido, vector, célula, organismo transgénico o péptido de la invención ya se han definido anteriormente. Un experto en la materia conoce las condiciones que permiten poner en contacto la bacteria productora de señales de QS con el polinucleótido, vector, péptido, célula u organismo transgénico de la invención para provocar dicho proceso de QQ en respuesta a dicho proceso de QS o para inhibir dicho proceso de QS; en general, dichas condiciones incluyen aquellas en las que el polinucleótido, vector, péptido, célula u organismo transgénico de la invención permanece estable y mantiene su actividad. En una realización particular, la bacteria productora de señales de QS, es una bacteria que produce, al menos, una AHL. Ejemplos ilustrativos, no limitantes de dichas AHL incluyen AHL no sustituidas, tales como, por ejemplo, C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL o C14-HSL, así como AHL oxo- o hidroxi-sustituidas, tales como, por ejemplo, OC6-HSL, OC12-HSL, etc.

Numerosas bacterias patógenas de plantas y animales, incluyendo seres humanos, usan un proceso de QS basado en distintos tipos de señales de QS (por ejemplo, AHL, APIs, AI-2 y AI-3) para regular la síntesis de factores de virulencia o para formar biofilms (biopelículas). Por tanto, la interceptación de la comunicación bacteriana mediada por dichas señales de QS constituye un prometedor método para el control de bacterias, en particular, bacterias patógenas productoras de señales de QS.

En consecuencia, el polinucleótido aislado de la invención, el vector de la invención, la célula de la invención, el organismo no humano transgénico de la invención en el que dicho organismo no humano transgénico es una planta y el péptido aislado de la invención, pueden utilizarse para interceptar la comunicación entre bacterias productoras de señales de QS, provocando de este modo un proceso de QQ, o para inhibir un proceso de QS provocado por bacterias productoras de señales de QS y, de este modo, controlar infecciones causadas por dichas bacterias. Puesto que los procesos de QQ para el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias, en particular, bacterias productoras de señales de QS, no afectan directamente a la supervivencia de la bacteria patógena, sino a

la expresión de los factores de virulencia, no parecen ejercer una presión selectiva sobre la bacteria, evitando de este modo la aparición de resistencias, lo que constituye una importante ventaja.

3.5 Degradación de señales de QS

Se desvela un método *in vitro* para degradar una señal de QS, en el que dicha señal de QS es producida por una bacteria productora de señales de QS, que comprende poner en contacto un polinucleótido de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, un organismo transgénico de la invención o un péptido de la invención, con dicha señal de QS en condiciones que permiten degradar dicha señal de QS.

En el sentido utilizado en la presente descripción, la expresión “degradar una señal de QS” incluye hidrolizar una señal de QS, tal como una AHL, un API, un AI-2 o un AI-3, de manera que dicha señal de QS degradada ya no pueda ejercer la función de comunicación entre bacterias para la que estaba destinada; de este modo, se puede controlar una población bacteriana interceptando la comunicación entre sus miembros mediante la degradación de las señales responsables de dicha comunicación. Por tanto, este método constituye un método alternativo para controlar bacterias, en particular, bacterias patógenas (por ejemplo, de plantas y animales, incluyendo seres humanos) que usan un proceso de QS basado en distintos tipos de señales de QS para regular la síntesis de factores de virulencia o para formar biofilms.

Las características del polinucleótido, vector, célula, organismo transgénico o péptido de la invención ya se han definido anteriormente. Un experto en la materia conoce las condiciones que permiten poner en contacto la señal de QS con el polinucleótido, vector, célula, organismo transgénico o péptido de la invención para degradar dicha señal de QS; en general, dichas condiciones incluyen aquellas en las que el polinucleótido, vector, célula, organismo transgénico o péptido de la invención permanece estable y mantiene su actividad. En una realización particular, la bacteria productora de señales de QS, es una bacteria que produce, al menos, una AHL. Ejemplos ilustrativos, no limitantes de dichas AHL incluyen AHL no sustituidas, tales como, por ejemplo, C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL o C14-HSL, así como AHL oxo- o hidroxi-sustituidas, tales como, por ejemplo, OC6-HSL, OC12-HSL, etc.

Por tanto, el polinucleótido de la invención, el vector de la invención, la célula de la invención, el organismo transgénico de la invención y el péptido de la invención, pueden utilizarse para degradar una señal de QS, producida por una bacteria productora de señales de QS y, de este modo, controlar infecciones causadas por dichas bacterias.

3.6 Modulación de la actividad señalizadora de AHL

Se desvela un método *in vitro* para modular la actividad señalizadora de una AHL, que comprende poner en contacto un polinucleótido de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, un organismo transgénico de la invención o un péptido de la invención, con dicha AHL, en condiciones que permiten modular la actividad señalizadora de dicha AHL.

En el sentido utilizado en la presente descripción, la expresión “modular la actividad señalizadora de una AHL” incluye degradar o hidrolizar, total o parcialmente, una AHL, de manera que dicha AHL total o parcialmente degradada o hidrolizada ya no pueda ejercer la función de comunicación entre bacterias para la que estaba destinada; de este modo, se puede controlar una población bacteriana productora de señales de QS, en el que dichas señales de QS comprenden una o más AHL, interceptando la comunicación entre sus miembros mediante la degradación o hidrólisis de las señales (AHL) responsables de dicha comunicación. Por tanto, este método constituye un método alternativo para controlar bacterias, en particular, bacterias patógenas (por ejemplo, de plantas y animales, incluyendo seres humanos) que emplean un proceso de QS basado en la producción de AHL para regular la síntesis de factores de virulencia o para formar biofilms.

Las características del polinucleótido, vector, célula, organismo transgénico o péptido de la invención ya se han definido anteriormente. Un experto en la materia conoce las condiciones que permiten poner en contacto el polinucleótido, vector, célula, organismo transgénico o péptido de la invención con la AHL; en general, estas condiciones incluyen aquellas en las que el polinucleótido, vector, célula, organismo transgénico o péptido de la invención permanece estable y mantiene su actividad.

En una realización particular, dicha AHL es una AHL no sustituida, tal como, por ejemplo, C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL o C14-HSL, o una mezcla de las mismas. En otra realización particular, dicha AHL es una AHL oxo- o hidroxi-sustituida, tal como, por ejemplo, OC6-HSL, OC12-HSL, etc., o mezclas de las mismas.

Por tanto, el polinucleótido de la invención, el vector de la invención, la célula de la invención, el organismo transgénico de la invención y el péptido de la invención, pueden utilizarse para modular la actividad señalizadora de una AHL, producida por una bacteria productora de señales de QS, en el que dichas señales de QS comprenden una o más AHL, y, de este modo, controlar infecciones causadas por dichas bacterias.

3.7 Inhibición de la formación de un biofilm bacteriano

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* o *ex vivo* para inhibir la formación de un biofilm bacteriano, en el que dicho biofilm bacteriano es producido por una bacteria productora de una señal de QS, que comprende poner en contacto dicho polinucleótido aislado de la invención, vector de la invención, péptido aislado de la invención, célula hospedadora de la invención, organismo no humano transgénico de la invención en el que dicho organismo no humano transgénico es una planta, con dicha bacteria productora de señales de QS, en condiciones que permiten inhibir la formación de dicho biofilm bacteriano.

En el sentido utilizado en la presente descripción, la expresión “inhibir la formación de un biofilm bacteriano” se refiere a evitar o impedir que bacterias productoras de señales de QS puedan formar un biofilm. Como es conocido, la formación de biofilms es un proceso controlado por fenómenos de QS, mediados por señales de QS tales como AHL, APIs, AI-2 y/o AI-3, y tiene un importante impacto económico y clínico. Muchos de dichos biofilms están íntimamente relacionados con procesos bacterianos infecciosos, tanto en plantas como en animales, incluyendo seres humanos. En general, las bacterias formadoras de biofilms son muy resistentes a antibióticos y pueden adherirse a los alimentos o a sustancias en contacto con ellos, provocando tanto problemas de higiene como posibles tox infecciones alimentarias y en último término, grandes pérdidas económicas. Además, a menudo se encuentran en la 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. Se ha demostrado el papel de la molécula de QS AI-2 en la formación de biopelículas de los patógenos oportunistas *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y de distintas especies de *Streptococcus*, incluyendo la cepa involucrada en la formación de la placa dental *S. mutans*. Además, estos biofilms contribuyen a la contaminación biológica de superficies, al bloqueo mecánico en conductos, sistemas de distribución de agua potable, sistemas de aire acondicionado, sistemas antiincendios, etc. Finalmente, merece la pena destacar que favorecen la formación de biocorrosión al constituir la base del crecimiento de otros organismos superiores en superficies sumergidas, constituyendo un grave problema económico en el sector de la acuicultura y transporte marítimo. Este método, por tanto, constituye un prometedor método para controlar tanto la formación de biofilms como para controlar bacterias productoras de biofilms mediante un proceso controlado por señales de QS, en particular, bacterias patógenas (por ejemplo, de plantas y animales, incluyendo seres humanos) que usan un proceso de QS basado en distintos tipos de señales de QS para formar biofilms.

Las características del polinucleótido, vector, célula, organismo transgénico o péptido de la invención ya se han definido anteriormente. Un experto en la materia conoce las condiciones que permiten poner en contacto la bacteria formadora de biofilms mediante un proceso controlado por señales de QS con el polinucleótido, vector, célula, organismo transgénico o péptido de la invención para inhibir la formación de dichos biofilms bacterianos; en general, dichas condiciones incluyen aquellas en las que el polinucleótido, vector, célula, organismo transgénico o péptido de la invención permanece estable y mantiene su actividad. En una realización particular, la bacteria formadora de biofilms es una bacteria productora de señales de QS, tal como una bacteria productora de, al menos, una AHL. Ejemplos ilustrativos, no limitantes de dichas AHL incluyen AHL no sustituidas, tales como, por ejemplo, C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL o C14-HSL, así como AHL oxo- o hidroxi-sustituidas, tales como, por ejemplo, OC6-HSL, OC12-HSL, etc.

Por tanto, el polinucleótido de la invención, el vector de la invención, la célula de la invención, el organismo transgénico de la invención y el péptido de la invención, pueden utilizarse para inhibir la formación de biofilms bacterianos controlada mediante señales de QS causadas por bacterias productoras de señales de QS y, de este modo, controlar infecciones causadas por dichas bacterias.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben considerarse en un sentido limitante de la misma.

EJEMPLO 1

Identificación de Aii20J, gen responsable de la actividad QQ en *Tenacibaculum* sp. cepa 20J

1.1 Construcción de una librería genómica en fósido y cribado funcional

Con el objetivo de identificar y clonar el gen o genes responsables de la actividad degradadora de AHL de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J (CECT 7426), se construyó una biblioteca genómica usando el kit *CopyControl™ Fosmid Library Production Kit* (Epicentre, Madison, WI) con el vector pCC2FOS conforme el protocolo del fabricante.

Se extrajo el ADN de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J mediante el kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. El ADN (2,5 µg) se fragmentó aleatoriamente mediante pipeteo (50-100 veces) con una punta de pipeta de 200 µl. El ADN fragmentado se trató enzimáticamente para reparar y generar extremos romos (“*blunt ends*”) y fosforilados. A continuación, se seleccionaron fragmentos de 40 kb mediante electroforesis de gel de campos pulsantes (PFGE) y se ligaron al fósido pCC2FOS linealizado y defosforilado. A continuación se transformaron células de *Escherichia coli* DH10β mediante fago lambda. Las células

bacterianas se sembraron en placas con medio Luria-Bertani (LB) en presencia del antibiótico cloranfenicol a una concentración de 12,5 µg/ml y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Las colonias de *E. coli* DH10β transfectadas con el fósido se recogieron robóticamente (*Genetix Q-bot*) y se distribuyeron en placas de microtitulación (microtiter) de 96 pocillos que contenían 150 µl de LB más cloranfenicol y glicerol que se añadió para la correcta congelación de las mismas. La biblioteca genómica constaba de 6.912 clones distribuidos en 72 placas microtiter de 96 pocillos cada una y se conservó hasta su utilización en un congelador a -80 °C.

Se realizó un cribado funcional de la librería genómica de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J para la detección del gen o de los genes responsables de la actividad degradadora de AHL de esa cepa. El cribado funcional se realizó de forma simultánea para una señal corta (N-hexanoil-L-homoserina lactona, C6-HSL) y una larga (N-decanoil-L-homoserina lactona, C10-HSL) con el objetivo de incrementar las posibilidades de identificar la enzima o enzimas responsables de la actividad QQ, utilizando una modificación de la técnica de cribado en placa de agar descrita en Romero et al., 2011. Cada placa microtiter de 96 pocillos de la biblioteca genómica se copió a una nueva placa con 50 µl de LB líquido complementado con cloranfenicol (12,5 µg/ml), 2 µl/ml de la solución de autoinducción ("solución de autoinducción"), contenida en el kit *CopyControl™ Fosmid Library Production Kit* (Epicentre, Madison, WI), y C6-HSL a una concentración 12 µg/ml. La solución de autoinducción induce el alto número de copias del fósido en cada célula lo que permite aumentar la expresión de los genes del inserto. Las placas se incubaron a 37 °C para permitir la degradación de la señal por parte de los posibles clones positivos. Tras 24 h se llevaron alícuotas de 10 µl de cada pocillo a nuevas placas microtiter, que se irradiaron con luz UV durante 1 hora para destruir las células de *E. coli* DH10β. A continuación, se añadieron 50 µl de una dilución 1/5 (v/v) de un cultivo de 24 h de *C. violaceum* CV026 para detectar la degradación de C6-HSL y de *C. violaceum* VIR07 para detectar la degradación de C10-HSL, en agar LB blando al 0,2 % complementado con el antibiótico kanamicina a una concentración de 25 µg/ml y se incubaron a 30 °C durante 24 h para observar la producción de violaceína. Las placas aparecen con los pocillos de color violeta debido a la producción del pigmento violaceína, excepto en los pocillos donde se encuentre el gen o los genes capaces de degradar las AHL, que serán los clones positivos.

Fue posible identificar un solo clon positivo que inhibiese la actividad AHL evitando la formación de violaceína en el pocillo (Figura 1). Este clon positivo, se encontraba en la placa 13, coordenada E2, por lo que se denominó clon 13-E2, presentando actividad inhibitoria en el bioensayo tanto contra C6-HSL como contra C10-HSL.

La actividad del único clon positivo identificado en el cribado funcional (clon 13-E2, Figura 1) de la biblioteca genómica se comprobó, una vez transferido a cultivo en placa Petri con cloranfenicol para comprobar la pureza del clon, mediante la realización de un bioensayo en placa mediante pocillos igual al utilizado para la identificación de bacterias con actividad QQ contra AHL en anteriores trabajos (Romero et al., 2011). El clon positivo se inoculó en tubos Eppendorf con 500 µl de LB líquido complementado con cloranfenicol (12,5 µg/ml) y solución de autoinducción (2 µl/ml). Se incubó en agitación a 200 rpm y 37 °C. Tras 24 horas se añadieron 20 µl de una solución madre de cada AHL (C6 y C10-HSL) para que quedase una concentración final de 2 µg/ml y se incubaron de nuevo durante 24 h a 37 °C y a 200 rpm. Para detectar la actividad QQ se tomaron 100 µl del sobrenadante tras centrifugar el cultivo durante 5 min a 10.000 rpm y se añadieron a pocillos hechos en placas de LB cubiertas con 5 ml de una dilución 1/100 de un cultivo de 24 horas de las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 y *C. violaceum* VIR07 correspondientes en LB semi-sólido (0,8 % de agar). Como controles negativos se usaron tubos Eppendorf de LB sin inocular o inoculados con clones negativos sin actividad QQ en el cribado de la biblioteca genómica. Las placas se incubaron 24 h a 30 °C para la posterior observación de la producción de violaceína.

A continuación, se usó HPLC-EM (cromatografía de líquidos de alta resolución-espectroscopía de masas) para comprobar si el clon positivo de la librería genómica en fósido activo contra las AHL, clon 13-E2, presentaba actividad de degradación de señales. Para ello se obtuvo el extracto celular crudo (ECC) del clon con actividad QQ de *E. coli* DH10β a partir de un cultivo de 24 h en 15 ml de LB complementado con cloranfenicol y solución de autoinducción. El cultivo se centrifugó durante 5 min a 10.000 rpm para separar la biomasa del medio de cultivo. El pellet se lavó con 15 ml de tampón fosfato salino (PBS) pH 6,5, se resuspendió en otros 5 ml del mismo tampón, se sometió a ultrasonidos mediante pulsos de 30 s, durante 5 min en hielo y se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se filtró (0,22 µm) y el ECC obtenido se almacenó a 4 °C para su uso posterior.

Se utilizaron alícuotas de 500 µl de ECC para la interceptación de las señales C6-HSL o C10-HSL que se añadieron a una concentración de 2 µg/ml y se incubaron durante 24 h a 22 °C y 200 rpm. Una alícuota de la reacción se acidificó para comprobar la recuperación del anillo lactona. Posteriormente se realizó una extracción orgánica de las mezclas de reacción, para lo cual se extrajo tres veces con el mismo volumen de acetato de etilo (500 µl). El disolvente se recuperó y evaporó mediante flujo de nitrógeno en baño a 50 °C y el extracto seco obtenido se resuspendió en 400 µl de acetonitrilo para su posterior análisis y cuantificación de la concentración de la señal restante por HPLC-EM según la metodología descrita anteriormente (Romero et al., 2011). Como controles se utilizaron PBS y un ECC de *E. coli* DH10β sin fósido complementados con la misma cantidad de señales C6-HSL o C10-HSL y procesados y extraídos orgánicamente del mismo modo.

El clon positivo de 13-E2, seleccionado de la biblioteca genómica de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J fue capaz de reducir significativamente la concentración de ambas AHL cuantificada por HPLC-EM en comparación con los controles (Figuras 2 y 3) lo que confirma la presencia de un gen codificante de una enzima capaz de degradar las

AHL en este clon, que presenta al igual que *Tenacibaculum* sp. cepa 20J, una mayor actividad frente a C10-HSL. En ambos casos fue posible recuperar una parte de la actividad AHL después de la acidificación del medio, sugiriendo que el gen responsable de la actividad degradadora de AHL del clon 13-E2 podría tener actividad lactonasa.

5 1.2 Identificación de la secuencia de Aii20J en el clon positivo 13-E2

Debido a que el fósido del clon positivo 13-E2 de *E. coli*, cuya actividad de QQ para los dos tamaños de AHL ensayados fue confirmada tanto en bioensayo como por HPLC-EM, contenía un inserto del genoma de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J de aproximadamente 40 kb de longitud, fue necesario un análisis genético detallado de este inserto para identificar la secuencia responsable de la actividad QQ del clon. Para ello se siguieron dos estrategias complementarias:

1. Pirosecuenciación del inserto del fósido del clon positivo 13-E2 para obtener la secuencia completa del mismo y la búsqueda de secuencias homologas a las enzimas degradadoras de AHL conocidas hasta el momento; y
2. Construcción de una segunda biblioteca genómica en la que se fragmentó y subclonó en plásmido el inserto del fósido del clon positivo 13-E2, para permitir la identificación funcional inequívoca de la secuencia responsable de la actividad QQ.

20 1.2.1 Pirosecuenciación del inserto del fósido del clon activo 13-E2

Como primera aproximación a la identificación del gen responsable de la actividad QQ, el inserto del clon positivo 13-E2 obtenido en el cribado de la biblioteca genómica se secuenció usando el secuenciador *GS-FLX* de Roche. Para ello se extrajo el fósido (150 ng/μl) del clon positivo siguiendo el protocolo del *Fosmid Max™ DNA Purification Kit* (Epicentre, Madison, WI). Las secuencias obtenidas se analizaron mediante las herramientas informáticas: BLASTX y CD-Search (Búsqueda de dominios conservados) del NCBI. Las secuencias se alinearon y se ensamblaron con el programa Phrap, obteniéndose una secuencia de 39.828 pares de bases (pb). Para la identificación de los ORF del fragmento se procedió a la búsqueda en la base de datos 'nr' disponible en el NCBI, no pudiéndose identificar ningún gen con homología significativa con genes conocidos con actividad QQ. Fue posible, sin embargo, identificar 4 ORF con elevada homología (superior al 70 %) con genes de especies del agrupamiento *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB), lo que confirma que el inserto del clon 13-E2 proviene de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J (CECT 7426), miembro del grupo Bacteroidetes. En la búsqueda de todos los dominios conservados en la base de datos 'cdd' se detectó un dominio β-lactonasa al final de la secuencia analizada del clon positivo 13-E2. Se tradujo toda esa zona de la secuencia y se identificaron los codones de inicio (ATG) y de terminación (TAA) de la enzima obteniéndose una secuencia de 861 nucleótidos (SEQ ID NO: 1) que codifica un péptido de 286 aminoácidos (SEQ ID NO: 2), que presenta una identidad del 31 % a nivel de aminoácidos con la lactonasa AiiA de *Bacillus* sp. (Tabla 1, Dong et al. 2000). Esta nueva secuencia de lactonasa se ha denominado *aii20J* (*Auto Inductor Inhibitor* de 20J).

40 1.2.2 Construcción y análisis de una biblioteca genómica del inserto del clon activo 13-E2

Simultáneamente y con el objetivo de identificar inequívocamente en base a su actividad el gen responsable de la actividad QQ, se procedió a la subclonación del inserto de 40 kb del clon positivo 13-E2 para el análisis funcional de los fragmentos. Para ello se construyó una nueva biblioteca genómica, a partir del inserto del fósido del clon positivo 13-E2 purificado mediante el kit *Fosmid Max™ DNA Purification* (Epicentre, Madison, WI). El ADN extraído se fragmentó aleatoriamente mediante hidrólisis ("hydroshearing"), se seleccionaron los fragmentos entre 3 y 5 kb mediante electroforesis y se trataron enzimáticamente para generar extremos romos y fosforilados. Estos fragmentos se ligaron en el plásmido de alto número de copias *pBluescript II KS (+)* y después se transformó *E. coli* DH10β mediante electroporación. Los transformantes se sembraron en placa de LB con 200 μg/ml de ampicilina, 80 μg/ml de X-Gal y 1 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a 37 °C. Tras 24 h las colonias recombinantes blancas se recogieron robóticamente (*Genetix Q-bot*) y se sembraron en 10 placas microtiter de 96 pocillos con 150 μl de LB sólido (1,2 % de agar) más ampicilina.

De forma similar al análisis de la primera biblioteca genómica, se realizó un cribado funcional de las placas microtiter de la genoteca para detectar los clones capaces de degradar AHL. Se utilizó la cepa bioindicadora *C. violaceum* VIR07 para el análisis de degradación de C10-HSL, con una concentración de 12 μg/ml de la señal. El procedimiento fue el mismo que en la primera biblioteca genómica, pero en esta librería subclonada se usó el antibiótico ampicilina a una concentración de 200 μg/ml e IPTG a 1 mM para inducir la expresión de los genes del inserto.

En el cribado funcional de esta biblioteca genómica para la señal C10-HSL, aparecieron aproximadamente 6 o más positivos por cada placa microtiter. De todos los positivos conseguidos en el cribado de la nueva biblioteca genómica subclonada, se eligieron 10 al azar para realizar un nuevo bioensayo de inhibición en medio sólido para C6-HSL y C10-HSL tal y como se describió anteriormente, para confirmar que se trataba de actividad QQ. Como resultado, todos los clones probados fueron positivos (Figura 4), evitando la producción de un halo de violaceína en la placa.

Se secuenciaron los insertos de estos 10 clones positivos obtenidos en el análisis de la biblioteca genómica

subclonada seleccionados al azar. Los insertos de entre 3 y 5 kb de los plásmidos de 10 clones confirmados como positivos tras el cribado de la biblioteca genómica subclonada se secuenciaron por técnicas convencionales utilizando los cebadores del vector pBluescript II KS (+). Para el análisis de las secuencias se utilizaron las herramientas BLASTX y CD-Search (Búsqueda de dominios conservados) del NCBI y las secuencias se alinearon y se ensamblaron con el programa Phrap. Debido al tamaño de los insertos (3-5 Kb) no fue posible obtener la secuencia completa de ninguno de ellos en 1 sola ronda de secuenciación, pero en todos los casos las secuencias obtenidas presentaban un 100 % de identidad con la secuencia del inserto del clon 13-E2 obtenida por pirosecuenciación y todos ellos contenían el gen *aii20J*, confirmando esta secuencia como la responsable de la actividad QQ en el clon 13-E2. Esta secuencia presenta una bajísima homología a nivel nucleotídico con la secuencia de *aiiA* de *Bacillus*, de forma que no puede ser detectada mediante el software de alineación estándar (Figura 5). En cuanto a la secuencia aminoacídica, en la secuencia de Aii20J se encuentra el dominio conservado de unión a zinc característico de la superfamilia de las metalo- β -lactamasas, (HXXHDXH), además de otros residuos de histidina y aspartato, para su correcta actividad (Dong et al., 2000). Al alinear la secuencia consenso de Aii20J con otras lactoninas del género *Bacillus* ya descritas en la bibliografía (Figura 6), se observó que, a pesar de la baja homología, coinciden en las regiones características conservadas de esta superfamilia. En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de identidad de esta secuencia con otras lactoninas descritas en la bibliografía. Para alinear las secuencias nucleótidas y aminoacídicas y obtener las homologías se usaron las herramientas informáticas de BLAST del NCBI.

Tabla 1. Porcentajes de identidad de la secuencia de aminoácidos de Aii20J con otras lactoninas descritas en la bibliografía. Para ello se usaron las herramientas informáticas de BLAST del NCBI.

Especie	Homología a nivel de aminoácidos	Referencia
<i>AiiA</i> de <i>Bacillus</i> sp. 240B1	31 %	Dong et al., 2000
<i>AiiA</i> de <i>Bacillus</i> sp. AI96	26 %	Cao et al., 2012
<i>AiiA</i> de <i>Bacillus</i> sp. sin cultivar	30 %	Carlier et al., 2003
<i>AhlK</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	26 %	Park et al., 2003
<i>QsdA</i> de <i>Rhodococcus erythropolis</i>	18 %	Riaz et al., 2008
<i>AttM/AiiB</i> de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38 %	Carlier et al., 2003; Zhang et al., 2002
<i>AhlD</i> de <i>Arthrobacter</i> sp.	23 %	Park et al., 2003
<i>QlcA</i> cósmido de <i>Acidobacteria bacterium</i> p2H8	25 %	Riaz et al., 2008

EJEMPLO 2

Secuenciación de los genes homólogos al gen de QQ de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J en otras cepas del género *Tenacibaculum*

Se comprobó la presencia de genes homólogos a Aii20J en otras especies del género *Tenacibaculum* que se muestran en la Tabla 2. En primer lugar, se realizó un bioensayo en medio sólido para comprobar que las células vivas de estas cepas eran capaces de degradar C6-HSL y C10-HSL. Solamente las dos cepas de *T. maritimum* no presentaron actividad degradadora, en contraste con análisis anteriores, que habían descrito que *T. maritimum* NCBI 2154^T presentaba actividad frente a C10-HSL. Esta diferencia se debe probablemente a que en este caso el ensayo de actividad se realizó en condiciones de pH controlado (células vivas re-suspendidas en PBS, pH 6,5) mientras que anteriormente este ensayo se realizó directamente en el medio de cultivo, y, por lo tanto, la degradación podría derivar de valores de pH elevados derivados de la actividad metabólica de la bacteria. Dos de las especies probadas *T. aestuarii* y *T. lutimaris* presentaron actividad solamente frente a C10-HSL (Tabla 2 y Figura 7).

Tabla 2. Cepas de distintas especies del género *Tenacibaculum* y actividad de células vivas contra C6-HSL y C10-HSL medida mediante bioensayo con cepas bioindicadoras de *C. violaceum* CV026 y VIR07

Cepas bacterianas	Origen	C6-HSL	C10-HSL
<i>Tenacibaculum</i> sp. 20J	Romero, 2010.	+	+
<i>T. aestuarii</i> JCM 13491 ^T	CECT (Valencia, España)	-	+
<i>T. discolor</i> DSM 18842 ^T	CECT (Valencia, España)	+	+
<i>T. gallaicum</i> CECT 7122 ^T	CECT (Valencia, España)	+	+
<i>T. lutimaris</i> DSM 16505 ^T	CECT (Valencia, España)	-	+
<i>T. maritimum</i> CECT 4276	CECT (Valencia, España)	-	-
<i>T. maritimum</i> NCBI 2154 ^T	The National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria Ltd. (Aberdeen, UK)	-	-
<i>T. soleae</i> CECT 7292 ^T	CECT (Valencia, España)	+	+

Se procedió a la amplificación mediante PCR de los genes homólogos a *aii20J* en las especies con actividad QQ confirmada en el bioensayo. El ADN de las cepas se extrajo a partir de cultivos de 24 h con el kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cebadores (oligonucleótidos cebadores) utilizados en las PCR para amplificar las secuencias de los genes de las lactonasas de cada una de las cepas de *Tenacibaculum* (Tabla 2), se diseñaron a partir de las secuencias conocidas del plásmido y del inicio y final del gen *aii20J* de la lactonasa de *Tenacibaculum* sp. 20J, suponiendo que el resto de las cepas del género *Tenacibaculum* tendrían alguna similitud a nivel nucleotídico con *Tenacibaculum* sp. 20J. Con el objetivo de preparar las secuencias amplificadas para una posterior clonación y sobre-expresión, se incluyeron en las secuencias de los cebadores sitios de restricción para las enzimas NcoI, EcoRI y manteniendo en fase la secuencia del plásmido para que la cola de poli-histidina que el vector permite añadir se expresase correctamente. Las secuencias de estos cebadores, denominados Lact20Jf y Lact20JR, se muestran en SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, respectivamente.

Todos los cebadores diseñados en el laboratorio fueron suministrados por Sigma. Las reacciones de PCR se realizaron con el termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf) en las siguientes condiciones: 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 45 s, hibridación a 55 °C durante 45 s, extensión a 72 °C durante 45 s, precedidos de 5 minutos de desnaturalización a 94 °C y seguidos de 10 min de extensión a 72 °C. En el caso de *T. soleae* sin embargo, no funcionaron en un inicio estas condiciones de reacción por lo que se realizó de nuevo una PCR con gradiente de temperatura con las siguientes condiciones: 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 15 s, hibridación a 45 °C, 50 °C y 55 °C durante 30 s, extensión a 72 °C, 1 min, precedidos de 5 minutos de desnaturalización a 94 °C y seguidos de 10 min de extensión a 72 °C. Los fragmentos así obtenidos se purificaron a partir del gel y se secuenciaron por técnicas convencionales, obteniéndose en todos los casos una secuencia con elevada homología a la secuencia de *aii20J* tanto a nivel de nucleótidos como de secuencia de aminoácidos (Figura 8, Tabla 3). La secuencia que presentó un menor grado de homología fue la de *T. soleae*, con un porcentaje de identidad igual al 76 % (Tabla 3). Los genes homólogos a *aii20J* de estas cepas, presumiblemente responsables de su actividad degradadora de AHL, fueron nombrados como *aiiTD* (de *Tenacibaculum discolor*), *aiiTG* (de *T. gallaicum*), *aiiTL* (de *T. lutimaris*), *aiiTA* (de *T. aestuarii*) y *aiiTS* (de *T. soleae*) productores de las proteínas, AiiTD, AiiTG, AiiTL, AiiTA y AiiTS, respectivamente. Las secuencias nucleotídicas de estos genes se muestran en SEQ ID NO: 4 (*aiiTD*), SEQ ID NO: 5 (*aiiTG*), SEQ ID NO: 6 (*aiiTS*), SEQ ID NO: 7 (*aiiTA*) y SEQ ID NO: 8 (*aiiTL*). Las secuencias mostradas incluyen los codones de inicio (ATG) y terminación (TAA).

Tabla 3. Porcentajes de identidad de la secuencia de nucleótidos del gen *aii20J* (SEQ ID NO: 1) y de aminoácidos de la proteína Aii20J (SEQ ID NO: 2) con las secuencias obtenidas para otras especies del género *Tenacibaculum*. Los porcentajes de identidad se calcularon usando las herramientas informáticas de BLAST del NCBI.

	Identidad a nivel nucleotídico	Identidad a nivel de aminoácidos
<i>T. discolor</i>	99 %	99 %
<i>T. gallaicum</i>	90 %	93 %
<i>T. soleae</i>	76 %	76 %
<i>T. aestuarii</i>	99 %	99 %
<i>T. lutimaris</i>	99 %	99 %

Se construyó un árbol filogenético de las lactonasas del grupo de Aii20J y los representantes más importantes de la familia de lactonasas de AHL descritas en la bibliografía (Figura 9), utilizando el software MEGA 5.1 que se obtuvo mediante el método “neighbor-joining” (Saitou y Nei, 1987) y los valores de “bootstrap” se calcularon mediante el software MEGA 5.1 (Tamura et al., 2008). En el árbol se aprecia claramente que las lactonasas del género *Tenacibaculum* forman una rama claramente diferenciada del resto de las lactonasas descritas.

EJEMPLO 3

Sobre-expresión, purificación y caracterización de la actividad enzimática de Aii20J

3.1 Clonación y sobreexpresión

Tal y como se describe en el apartado anterior, se amplificó mediante PCR la secuencia de *aii20J* con cebadores específicos que permitieron insertar las dianas de restricción compatibles con el plásmido de expresión pET28c(+) (Novagen). Se eligió este vector porque presenta la posibilidad de realizar un clonaje direccional y añade una proteína de fusión, en nuestro caso una cola de poli-histidina (6 restos de histidina consecutivos) en el extremo N, que facilita la purificación de proteínas.

El resultado de la amplificación por PCR se corrió en un gel de electroforesis de agarosa al 1 % y se extrajeron las bandas de ADN correspondientes mediante el *Gel Extraction Kit* (Omega) siguiendo el protocolo del fabricante. De forma paralela se extrajo el plásmido pET28c(+) de la cepa donde estaba cultivado de forma rutinaria (*E. coli* XL1blue) mediante una miniprep con el *QIAprep® Spin Miniprep Kit* de Quiagen siguiendo el protocolo del fabricante. A continuación, se realizó una doble digestión tanto de los fragmentos obtenidos de ADN como del plásmido para obtener los extremos cohesivos (“sticky-ends”) compatibles. Las digestiones se llevaron a cabo con las enzimas *FastDigest* NcoI, EcoRI, y Sall (Fermentas, Thermo Scientific) según las condiciones recomendadas por

el fabricante. Tras las digestiones se insertaron los productos de las PCR ya cortados en el interior del plásmido linearizado, mediante una ligadura enzimática utilizando la T4 ADN ligasa de Thermo Scientific durante 15 min a 22 °C como se indica en las instrucciones del producto. Para observar si la ligadura ocurría como se esperaba y el plásmido se había digerido correctamente, se realizó un control de la ligadura con el plásmido sin el inserto de ADN.

Una vez obtenido el plásmido con el inserto de ADN, se transformaron células competentes de *E. coli* XL1blue para la clonación de las secuencias de interés mediante electroporación utilizando el *ECM® 399 Electroporation System*, BTX™ a 1.000 V, 4 ms. Las células electroporadas se cultivaron en placas 100 µl en placas de LB complementadas con el antibiótico kanamicina (30 µg/ml) y se incubaron durante 24 h a 37 °C. La ligadura control del plásmido sin el inserto se electroporó también como control de la electroporación, de este modo, si el plásmido estaba bien digerido no crecerían colonias en las placas. Las colonias recombinantes obtenidas se pasaron a placas nuevas y paralelamente se congelaron en viales de congelación *Cryoinstant Mixed* (VWR®) a -80 °C para su almacenamiento.

Se realizó una electroforesis en gel de 1 % de agarosa de una miniprep extraída con el kit de Qiagen de un cultivo de 15 ml de LB fresco en matraz de *E. coli* XL1blue transformado con pET28c(+) con el inserto y de la doble digestión del plásmido con las enzimas correspondientes para comprobar que las colonias recombinantes crecidas en las placas tras la electroporación contenían el plásmido con el inserto (Figura 10).

También se realizó una PCR control de las colonias recombinantes con cebadores complementarios a los dominios homólogos internos de las lactonasas, las secuencias de dichos cebadores se muestran en SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, respectivamente.

El fragmento obtenido por PCR confirmó la identidad de la secuencia insertada (Figura 11). Las condiciones de PCR aplicadas fueron: 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 45 s, hibridación a 58 °C durante 45 s, extensión a 72 °C, 45 s, precedidos de 5 minutos de desnaturalización a 94 °C y seguidos de 10 min de extensión a 72 °C. Esta comprobación se observó mediante la electroforesis del producto de las PCR en un gel de 1 % de agarosa. Las colonias recombinantes obtenidas elegidas se pasaron a placas nuevas de LB con kanamicina (30 µg/ml) para cultivarlas de forma rutinaria a 37 °C en el laboratorio y paralelamente se congelaron en viales de congelación *Cryoinstant Mixed* (VWR®) a -80 °C para su almacenamiento.

Con el inserto de ADN introducido en el plásmido y transformado en células de *E. coli* XL1blue, las extracciones de ADN plasmídico con el inserto de interés se secuenciaron por técnicas clásicas utilizando los cebadores de secuenciación específicos del vector (SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14).

Las extracciones se realizaron mediante minipreps de cultivos de 24 h en 15 ml de medio LB complementado con kanamicina (30 µg/ml) a 37 °C, 170 rpm. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con los programas Editseq y SeqMan Pro de Lasergene y MEGA 5.1 Beta3 (Tamura et al., 2008) para ensamblar adecuadamente las secuencias. Para traducir las secuencias se utilizó la herramienta informática *Protein translate* de ExPASy eligiendo el marco abierto de lectura (ORF) adecuado. La secuencia definitiva del gen *aii20J* modificado para su sobre-expresión y purificación se muestra en la SEQ ID NO: 3.

Una vez obtenida la secuencia del plásmido con el inserto y comprobado que la secuencia se encontraba en fase para la correcta producción del marcador de poli-histidina que tiene el plásmido pET28c(+) se procedió a clonar el gen de interés en la cepa de sobreexpresión *E. coli* BL21(DE3). Para transformar las células de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pET28c(+) con el inserto de ADN, por un lado se realizó una miniprep con el kit de Quiagen, de un cultivo de 24 h de 15 ml de *E. coli* XL1blue con pET28c(+) y el inserto, en medio fresco LB complementado con kanamicina (30 µg/ml) a 37 °C, 170 rpm. Por otra parte, se hicieron las células competentes de un cultivo de BL21(DE3) de 24 horas en medio LB. Para ello se centrifugaron 1,5 ml del cultivo a 14.000 rpm durante 2 min, se lavaron dos veces las células con 1 ml de ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) 1 mM-Glicerol 10 % pH 7,3, se resuspendieron con el volumen de enrase en MOPS-Glicerol, se vertieron en una cubeta de electroporación estéril de 90 µl y 1 mm de tamaño de hueco de VWR® enfriada anteriormente en hielo y se añadieron 5 µl del plásmido con el inserto. Se electroporaron las células en el *ECM® 399 Electroporation System*, BTX™ a 1.000 V, 4 ms. Después se añadió a la cubeta 1 ml de medio fresco LB y se dejó incubar durante 1 hora a 37 °C, tras la que se plaquearon con 100 µl placas de LB suplementadas con el antibiótico kanamicina (30 µg/ml) y se incubaron 24 h a 37 °C. Se realizó como control una electroporación del plásmido sin el inserto para comprobar que el plásmido estaba bien digerido, en este caso observando que no crecían colonias en las placas.

Por último, se realizó un bioensayo de actividad en placas con los biosensores de *Chromobacterium violaceum* para asegurarse de que la construcción del inserto en el plásmido transformado en la cepa de sobreexpresión presentaba actividad QQ. Para ello se sembraron al azar algunas de las colonias recombinantes obtenidas en nuevas placas de LB complementado con kanamicina (30 µg/ml). Con estas colonias y con un control negativo del *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido se realizaron cultivos en 15 ml de LB líquido complementado con el antibiótico de 24 h a 37 °C y 200 rpm. Tras 24 horas se realizaron bioensayos con las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 para comprobar la degradación de C6-HSL tal y como se describió anteriormente. Como control negativo también se usó PBS pH 6,7 con la misma concentración de la AHL añadida. Las colonias recombinantes obtenidas con actividad se pasaron a placas nuevas de LB con kanamicina (30 µg/ml) para cultivarlas de forma rutinaria a 37 °C en el laboratorio y

paralelamente se congelaron en viales de congelación *Cryoinstant Mixed* (VWR®) a -80 °C para su almacenamiento.

Se realizó una electroforesis desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) para comprobar que la banda de la proteína estaba presente en la cepa de sobreexpresión (Figura 12). Para ello se preparó un cultivo de 50 ml de LB complementado con kanamicina (30 µg/ml) a 170 rpm, 37 °C de una colonia de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pET28c(+) y el inserto de Aii20J, de una colonia de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido sin el inserto como control y de una colonia del mismo *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido y el inserto al que se le añadió el inductor IPTG a una concentración 1 mM al alcanzar una densidad óptica del cultivo a 600 nm (DO₆₀₀) de entre 0,4-1 (0,6 la recomendada) para inducir la sobreexpresión de la proteína y dejándolo incubar durante 3 horas más en las mismas condiciones. Los cultivos se centrifugaron a 9.000 rpm, 10 min, los gránulos obtenidos se resuspendieron con un vórtex en 3 ml de PBS pH 6,7. Después se rompieron las células mediante ultrasonidos con el aparato *Branson Sonifier 250* con pulsos constantes de 30-40 % a potencia media durante media hora y en hielo para no sobrecalentar las muestras en el proceso. Por último, se filtraron con filtros Minisart® estériles de 1,20 µm (Sartorius Stedim Biotech). Tras la electroforesis el gel se tiñó con azul de coomasie y la imagen fue obtenida con el Gel Doc™ XR+ system de Bio Rad.

3.2 Purificación de Aii20J

Se preparó un cultivo de 50 ml de LB complementado con kanamicina (30 µg/ml) de una colonia de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pET28c(+) y el inserto correspondiente al gen de la lactonasa de la cepa de *Tenacibaculum* sp. determinada a purificar, incubándolo a 170 rpm, 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) del cultivo de entre 0,4-1 (0,6 la más recomendada). Se le añadió IPTG a una concentración 1 mM para inducir la sobreexpresión de la proteína y se dejó incubar durante 3 horas más en las mismas condiciones. El cultivo se centrifugó a 9.000 rpm, 10 min, el pellet se resuspendió con vórtex en 20 ml de PBS pH 6,7. Después se rompieron las células mediante sonicación con el aparato *Branson Sonifier 250* con pulsos constantes de 30-40 % a potencia media durante media hora y en hielo para no sobrecalentar la muestra en el proceso. Se centrifugó para bajar las células durante 10 min, a 9.000 rpm. Se realizaron dos lavados resuspendiendo el pellet mediante vórtex en 10 ml de PBS pH 6,7 con Tritón al 1 %, sometiendo a ultrasonidos de forma continuada a potencia media durante 1 min. Después se resuspendió el pellet en 5 ml de tampón de unión ("*binding buffer*") de la columna de purificación, se ajustó el lisado a pH 7,4 y se dejó reposar durante 1 hora en hielo. Se procedió a purificar a través de la columna de afinidad por histidina *His GraviTrap™ affinity column* de GE Healthcare con tampón de elución ("*elution buffer*") según las instrucciones indicadas por el fabricante. El "*binding buffer*" y el "*elution buffer*" se prepararon mediante el kit *His Buffer Kit* de GE Healthcare con urea 6 M. Para eliminar el exceso de urea, se dializó el eluido obtenido de la columna que contenía la proteína. Se utilizaron para ello membranas *Seamless Tubing* de Sigma introducidas en agua destilada anteriormente, y rebajando la molaridad de la urea con PBS pH 6,7 a la mitad cada hora para evitar que precipite la proteína y hasta eliminarla por completo. Para comprobar que se obtenía la enzima purificada de forma correcta se realizó una SDS-PAGE de la proteína purificada y dializada (Figura 13). El gel se tiñó con azul de coomasie y la imagen se obtuvo con el Gel Doc™ XR+ system de Bio Rad. El resultado de la diálisis se repartió en tubos Eppendorf® y se conservó a 4 °C en la nevera. Para su conservación a larga duración se congeló en alícuotas de 100 µl a -80 °C, evitando ciclos de congelación/descongelación para asegurar que la enzima no perdía la actividad. La concentración de proteína obtenida en cada purificación fue cuantificada con el *UV-Vis Spectrophotometer Q500* de Quawell.

3.3 Caracterización de la actividad de Aii20J

Se caracterizó la actividad de la enzima Aii20J purificada obtenida mediante las técnicas descritas en el apartado 3.2. Para ello se estableció la Concentración Mínima Activa (CMA), definida como la cantidad mínima de enzima necesaria para eliminar completamente una concentración de AHL de 10 µM en un periodo de tiempo determinado. Para ello se realizaron diluciones seriadas (1:10, 1:100, 1:1.000 y 1:10.000) en PBS pH 6,7 de una solución de enzima de concentración 0,2 mg/ml. A estas soluciones se añadieron C6-HSL y C10-HSL para obtener una concentración final de 10 µM, incubándose durante 3 y 24 horas a 22 °C en agitación, 200 rpm. Una vez finalizada la incubación se evaluó la presencia de C6-HSL y C10-HSL mediante bioensayo en placa con las cepas bioindicadoras *C. violaceum* CV026 y *C. violaceum* VIR07, estableciéndose que las CMA de Aii20J tanto para C6-HSL como para C10-HSL son 2 µg/ml para tiempos de incubación de 3 horas y diez veces menos, 0,2 µg/ml para tiempos de incubación de 24 horas (Figura 14). Sobre esta base, en todos los ensayos de caracterización se utilizó una concentración de 20 µg/ml, correspondiente a 10 veces la CMA de 3 horas sobre C6-HSL y C10-HSL.

3.3.1 Cinética de degradación de C6-HSL y C10-HSL

Se usó HPLC-EM para evaluar la cinética de degradación de 2 AHL (C6-HSL y C10-HSL) de la enzima purificada Aii20J. Para ello, se incubó a una concentración de 20 µg/ml en PBS pH 6,7 con C6-HSL y con C10-HSL a una concentración final de 50 µM a 22 °C, 200 rpm. A diferentes tiempos de incubación (0, 10, 20, 30, 60 y 90 min), se tomaron alícuotas de 200 µl por triplicado de todos los tubos para realizar la extracción orgánica de las mezclas de reaccion, extrayendo tres veces con el mismo volumen de acetato de etilo (200 µl). El disolvente se recuperó y evaporó mediante flujo de nitrógeno en baño a 50 °C y el extracto seco obtenido se resuspendió en 400 µl de acetonitrilo para su posterior análisis y cuantificación de la concentración de la señal restante por HPLC-EM. Se

realizó la misma cinética de la misma manera con AiiA purificado para las dos señales a una concentración final de 40 µg/ml para compararlo con la actividad de Aii20J, extrayendo en los tiempos de incubación 0, 30 y 90. Los controles se realizaron con PBS complementado con la misma cantidad de señal C6-HSL o C10-HSL y se procesaron y extrajeron orgánicamente de la misma manera.

Se realizó un análisis con la serie HPLC 1100 (Agilent USA) equipada con una precolumna C8 (2,1 x 12,5 mm, tamaño de partícula 5 µm) y una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 2,1 x 150 mm (con tamaño de partícula 5 µm), mantenida a 45 °C. La fase móvil consistió en ácido fórmico al 0,1 % en agua (A) y ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo (B) con un caudal de 0,22 ml/min. Condiciones de elución: 0 min 35 % de B, gradiente lineal hasta 60 % de B durante 10 min, gradiente lineal del 60 al 95 % de B durante 5 min, 95 % de B durante 5 min y un minuto para volver a las condiciones iniciales que se mantuvieron durante 9 min. Se diluyeron alícuotas de 20 µl de cada muestra en acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 % antes de la inyección en la columna. El espectrómetro de masas (EM) utilizado fue un API 4000 de triple cuadrupolo (Applied Biosystem, CA, EE.UU.) equipado con una fuente Turbo Ion utilizada en el modo de electronebulización de iones positivos y control de reacción múltiple (CRM). Las señales de CRM se usaron para obtener información de cuantificación relativa en comparación con una curva de calibración construida por la abundancia de iones moleculares obtenida de AHL sintéticas convencionales (Milton et al., 2001).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 15, donde se puede observar que, entre otras cosas, Aii20J degrada completamente C10-HSL en 20 minutos, mientras que lleva más de 80 minutos degradar completamente C6-HSL. Sin embargo, en el tiempo considerado, no se observa degradación completa de C6-HSL ni degradación completa de C10-HSL debido a la acción de AiiA.

3.3.2 Especificidad de Aii20J

Se realizaron ensayos iguales a los descritos en el apartado 3.3.1 para las AHL no sustituidas C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL, C14-HSL y para las AHL oxo- o hidroxi-sustituidas OC6-HSL y OC12-HSL con una concentración de AHL de 10 µM y una concentración de enzima de 20 µg/ml. Las concentraciones iniciales y finales se midieron por triplicado en extractos realizados en PBS pH 6,7 y cuantificados mediante HPLC-EM (Romero et al., 2011). Aii20J presenta el menor grado de afinidad contra C4-HSL, seguido de la oxo-AHL OC6-HSL. El resto de las AHL ensayadas son degradadas completamente en 1 hora por una concentración de 20 µg/ml de la enzima (Figura 16). Este amplio espectro de actividad convierte a Aii20J en una de las enzimas de QQ más activas descritas, ya que en otros casos el rango de AHL que puede retirarse es menor. En el caso de AiiA_{A196} la mayor actividad se encuentra frente a C-6, C-7, C-8 y C-10-HSL, pero no se encontró actividad frente a C12-HSL (Cao et al., 2012).

3.3.3 Resistencia al pH

Con el objetivo de medir el efecto del pH del medio sobre la estabilidad de Aii20J y establecer por lo tanto la viabilidad de su inclusión en piensos u medicamentos de deban ingerirse por vía oral, se comprobó la estabilidad de la enzima después de ser expuesta a distintas soluciones de pH controlado en el intervalo 3-9. Una solución de Aii20J de 20 µg/ml se incubó en distintos tampones estériles con diferentes pH durante 30 min a 22 °C. Después se ajustó el pH con HCl 1 M o NaOH 1 M hasta alcanzar pH 6,7 (condiciones convencionales para medir la actividad) y se añadió la AHL (C6-HSL y C10-HSL con concentración final de 10 µM) dejando incubarse durante 3 h, 22 °C. La presencia de AHL se reveló mediante bioensayo con las cepas indicadoras de *C. violaceum*, CV026 y VIR07 (Figura 17). Los pocillos del centro se corresponden con los controles negativos de PBS pH 6,7 pH con la AHL correspondiente. Los tampones utilizados fueron el tampón McIlvaine (para pH 3, 4 y 5), tampón PBS (pH 6 y 7) y Tris-HCl 0,05 M (pH 8 y 9). Estos resultados demuestran claramente la existencia de un intervalo de estabilidad de Aii20J, mucho mayor que el descrito para AiiA_{A196}, que pierde significativamente su actividad cuando se expone a soluciones de pH inferior a 6 (Cao et al., 2012).

3.3.4 Resistencia a la acción de Proteinasa K y quimiotripsina

Con el mismo objetivo que la evaluación de la resistencia al pH, se ensayó la resistencia de Aii20J a la acción de la proteinasa K y la quimiotripsina (Figura 18). Se incubó individualmente Aii20J a una concentración de 20 µg/ml durante 30 min y 1 h a 30 °C en PBS pH 6,7 con proteinasa K en proporción proteasa-proteína 1:10 (p/p) añadida desde una solución madre de 50 µg/ml en H₂O destilada y α-quimiotripsina en una relación proteasa-proteína 1:60 desde una solución madre de 25 µg/ml en 100 mM Tris-HCl, pH 7,4. Después de los tiempos de incubación se añadieron C6-HSL y C10-HSL a una concentración final de 10 µM y se dejaron otras 24 h a 22 °C y 200 rpm. Por medio de bioensayo de inhibición con los biosensores *C. violaceum* CV026 y VIR07 se determinó la resistencia de la actividad de Aii20J a la proteólisis. Se realizaron controles negativos de proteinasa K y quimiotripsina en PBS pH 6,7 sin la enzima con la misma concentración añadida de AHL y control negativo de PBS con las AHL a las mismas concentraciones.

3.3.5 Resistencia a la temperatura

Se evaluó la termoestabilidad de Aii20J sometiendo una solución del enzima que tenía una concentración de 20 µg/ml por triplicado a distintas temperaturas durante 10 minutos, midiéndose la actividad del enzima así tratado

sobre C6-HSL (10 μ M) durante 1 h, 22 °C, 200 rpm, que se cuantificó mediante técnicas de HPLC-EM. Los resultados demuestran una termoestabilidad limitada de Aii20J, ya que pierde su actividad catalítica por encima de los 60 °C (Figura 19). Este resultado contrasta fuertemente con la termoestabilidad de la actividad enzimática en los extractos celulares en bruto, en los que la actividad resiste tratamientos de hasta 100 °C durante 10 minutos (no se muestran los resultados). Además, la estabilidad térmica de Aii20J también se verificó por HPLC-EM sometiendo una solución de Aii20J de 20 μ g/ml a 60 °C durante 10 minutos, después de lo cual se incubó con una concentración de 50 μ M de C6-HSL a 22 °C. A diferentes tiempos de incubación (0, 30 y 90 minutos), se extrajeron alícuotas por triplicado para cuantificar su actividad residual mediante análisis por HPLC-EM de la misma manera que en la sección 3.3.1 (Figura 15). Se usó como control PBS complementado con la misma cantidad de señal de C6-HSL, procesada y extraída orgánicamente de la misma manera. Durante 90 minutos, Aii20J degradó casi por completo toda la señal en comparación con el control, aunque la enzima tratada a 60 °C presentó una cinética algo más lenta que la enzima sin tratar, como se observa en la Figura 15. En comparación con los resultados limitados de estabilidad térmica (Figura 19), Aii20J no pierde la capacidad para degradar AHL a 60 °C (Figura 15).

Para comprobar si la diferencia de termorresistencia entre la enzima purificada y el extracto celular de la *Tenacibaculum* sp. cepa 20J se pudiera deber a la presencia en la cepa de una segunda enzima termorresistente se ensayó la termorresistencia de la actividad en extractos celulares de *E. coli* BL21DE3 con el plásmido pET28c(+). EL extracto celular en bruto diluido a una concentración 10 veces mayor que la concentración mínima activa (46,8 μ g de proteína del extracto/ml tanto a las 3 como a las 24 h) se incubó en tubos Eppendorf® con PBS pH 6,7 a 22 °C, 60 °C, 80 °C y 100 °C durante 10 min. Después se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se les añadió la molécula señal C6-HSL a una concentración final de 10 μ M y se dejaron en agitación a 200 rpm durante 3 h a 22 °C, tras la cual se realizó el bioensayo de inhibición de violaceína. Como control se usó el PBS con la misma cantidad de señal C6-HSL. Los resultados demuestran claramente que el extracto de *E. coli* en el que se expresa Aii20J presenta el mismo perfil de termorresistencia que la cepa original 20J (Figura 20), lo que indica que la baja termorresistencia de Aii20J purificada podría deberse a la falta de algún cofactor que incrementa su sensibilidad y que está presente en los extractos celulares.

3.3.6 Interacción de Aii20J con antibióticos de la familia de los β -lactámicos

Debido a la homología de Aii20J y el resto de las lactonasas de AHL con las β -lactamasas responsables de la resistencia de numerosas bacterias a estos antibióticos (Bebrone, 2007), se comprobó la posible actividad de Aii20J sobre un total de 11 antibióticos β -lactámicos pertenecientes a 5 familias del grupo (Penicilina G, Meticilina, Amoxicilina, Ampicilina, Cefalotina, Cefaclor, Cefoxitina, Ceftriaxona, Cefoperazona, Imipenem y Meropenem) y dos inhibidores de las β -lactamasas (Sulbactam y ácido clavulánico). Los antibióticos se incubaron durante 24 horas con una solución de 20 μ g/ml de Aii20J comprobándose su actividad en comparación con la misma solución de antibiótico sin tratar enzimáticamente mediante antibiograma en pocillo con la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se obtuvieron halos de diámetro idéntico en las placas correspondientes al antibiótico solo y al antibiótico tratado con Aii20J, lo que indica que no existe interacción ente Aii20J y la acción de estos antibióticos β -lactámicos y tampoco con los inhibidores de las β -lactamasas ensayados (Figura 21).

EJEMPLO 4

Resistencia a ácidos en *E. coli* K-12 MG1655 y *E. coli* EHEC EDL 933

Con el fin de observar si la lactonasa Aii20J podría revertir el efecto protector de las AHL en cultivos de *E. coli* cuando se exponen a pH bajos, se realizó un ensayo de resistencia a los ácidos. Se cultivaron cepas de *E. coli* en medio LB durante 48 h a 30 °C y con agitación (170 rpm). Después de ese tiempo, los cultivos se inocularon en medio LB precalentado con glucosa al 0,4 % para reprimir el sistema de resistencia al ácido (AR-1), con las diferentes condiciones y con agitación continua a la misma temperatura: *E. coli*, *E. coli* más OC6-HSL a una concentración final de 5 μ M, *E. coli* más Aii20J a 20 μ g/ml y *E. coli* más OC6-HSL y Aii20J a las mismas concentraciones. Después de 14-15 horas de incubación, se realizó una dilución 1:1000 de cada cultivo en medio ácido (MEM) pH 2,0, complementado con glucosa al 0,4 % y glutamato 1,6 mM precalentado. A las 0, 1,5 y 3 horas (30 °C, 170 rpm), se vertieron 100 μ l de cada reacción en placas LB. Las placas se incubaron durante 24 horas a 30 °C para determinar la supervivencia de *E. coli*. mediante recuento de UFC (unidades formadoras de colonias). El medio MEM se preparó a partir de una solución 50X con 670 ml de agua destilada, 10 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 g de ácido cítrico $\cdot \text{H}_2\text{O}$, 500 g de K_2HPO_4 y 175 g de $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. El volumen aproximado final fue de 1 l, que se usó para hacer una dilución 1X en agua destilada y se ajustó a pH 2,0 antes de esterilizar en autoclave. La glucosa (0,4 %) y el glutamato (1,6 mM) se añadieron independientemente en forma esterilizada.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 22.

Análisis

En *E. coli*, la resistencia a un ambiente ácido se controla mediante la presencia de señales de QS de tipo AHL. *E. coli* no produce esas señales, pero puede captar las señales producidas por otras bacterias en el rumen o en el intestino de los animales debido a la presencia de un sensor específico denominado SdiA. Se ha demostrado que la

inactivación del sensor SdiA reduce la propagación de *E. coli* 0157:H7 en materia fecal en terneros destetados, probablemente por reducción de la capacidad de colonización (Sharma y Bearson, 2013). La Figura 22 muestra el efecto de la adición de la enzima Aii20J sobre la resistencia a los ácidos en la cepa de *E. coli* K-12 MG1655. En este experimento, se ha verificado el efecto de la adición de AHL externas y la acción de la lactonasa Aii20J sobre la viabilidad de células de *E. coli* expuestas a pH 2,0. Los resultados han demostrado que la presencia de AHL externas confiere a *E. coli* resistencia completa al ácido en comparación con los cultivos de control. La adición de Aii20J a los cultivos de control no tiene un efecto significativo sobre la resistencia de *E. coli* a un ambiente ácido, mientras que la adición de Aii20J a los cultivos a los que se añadieron AHL dio como resultado una reducción significativa (aproximadamente el 50 %) en la viabilidad celular en comparación con cultivos que eran resistentes al ácido debido a la presencia de AHL.

La resistencia al ácido es una característica importante de la virulencia de los patógenos gastrointestinales, tales como *E. coli* y el gen *sdiA* desempeña una función clave en la regulación del sistema de resistencia al ácido dependiente de glutamato, así como en el control de la producción de factor de virulencia dependiente de QS en *E. coli* K-12 y EHEC. Los resultados proporcionados en el presente documento confirman el uso potencial de Aii20J en el control de la expresión de patógenos humanos importantes tales como *E. coli*.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul S.F., Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.1990. *Basic local alignment search tool. J Mol Biol*; 215(3):403-10.
- Bassler, B.L., Losick, R. 2006. *Bacterially Speaking. Cell* 125: 237-246.
- Bebrone, C. 2007. *Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. Biochemical Pharmacology* 74:1686-1701.
- Boles B.R., Horswill A.R. 2008. *Agr-mediated dispersal of Staphylococcus aureus biofilms. PLoS Pathog.*;4:e1000052
- Bruhn, J. B., Dalsgaard, I., Nielsen, K. F., Buch, C., Larsen, J. L., Gram, L. 2005. *Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in gram-negative fish pathogenic bacteria. Dis. Aquat. Org.* 65: 43-52.
- Buch, C., Sigh, J., Nielsen, J., Larsen, J. L., Gram, L. 2003. *Production of acylated homoserine lactones by different serotypes of Vibrio anguillarum both in culture and during infection of rainbow trout. Syst. Appl. Microbiol.* 26: 338-349.
- Cam, D. T. V., Hao, N. V., Dierckens, K., Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2009. *Novel approach of using homoserine lactone degrading and poly- β -hydroxybutyrate accumulating bacteria to protect Artemia from the pathogenic effects of Vibrio harveyi. Aquaculture* 291:23-30.
- Cao, Y., He, S., Zhou, Zhigang, Zhang, M., Mao, W., Zhang, H., Yao, B. 2012. *Orally administered thermostable N-acyl homoserine lactonase from Bacillus sp. Strain AI96 attenuates Aeromonas hydrophila infection in fish. Applied and Environmental Microbiology* 78:1899-1908.
- Carlier, A., Faure, D., Latour, X., Uroz, S., Fray, R., Smadja, B., Dessaux, Y. 2003. *The Ti plasmid of Agrobacterium tumefaciens harbors an attM-paralogous gene, aiiB, also encoding N-Acyl homoserine lactonase activity. Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4989-4993.
- Croxatto, A., Chalker, V. J., Lauritz, J., Jass, J., Hardman, A., Williams, P., Cámara, M., Milton, D. L. 2002. *VanT, a homologue of Vibrio harveyi LuxR, regulates serine, metalloprotease, pigment, and biofilm production in Vibrio anguillarum. J. Bacteriol.* 184: 1617-1629.
- Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z., Zhang, L. H. 2000. *AiiA, an enzyme inactivates acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of Erwinia carotovora. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3526-3531.
- Dong Y. H., Wang L. H., Xu J. L., Zhang H. B., Zhang X. F. y Zhang L. H. 2001: *Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. Nature* 411:813-817.
- Freeman, J. A., Bassler, B. L. 1999. *A genetic analysis of the function of LuxO, a two component response regulator involved in quorum sensing in Vibrio harveyi. Mol. Microbiol.* 31: 665-677.
- Fuqua, C., Greenberg, E. P. 2002. *Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signaling. Nature Rev.* 3: 685-695.
- Hughes DT, Clarke MB, Yamamoto K, Rasko DA, Sperandio V. 2009. *The QseC adrenergic signaling cascade in*

Enterohemorrhagic E. coli (EHEC). *PLoS Pathog.*;5(8):e1000553.

Izquierdo Rojo, M., Ingeniería Genética, Ediciones Pirámide, S.A., 1993. Capítulo 9.

- 5 Morohoshi, T., Inaba, T., Kato, N., Kanai, K., Ikeda, T. 2004. *Identification of quorum sensing signal molecules and the LuxRI homologs in fish pathogen Edwardsiella tarda*. *J. Biosci. Bioeng.* 98: 274-281.

Milton, D., Chalker, V., Kirke, D., Hardman, A., Camara, M., Williams, P. 2001. *The LuxM homologue, VanM from Vibrio anguillarum directs the synthesis of N- (3-hydroxyhexanoyl) homoserine lactone and N-hexanoylhomoserine lactone*. *J.Bacteriol.* 183:3537-3547.

Otero Casal, A., Muñoz Crego, A., Benárdez Hermida, M. I., Fábregas, J. 2004. *Quorum sensing: el lenguaje de las bacterias*. Ed. Acibria, Zaragoza, España. 120 pp.

- 15 Park, S. Y., Lee, S. J., Oh, T. K., Oh, J. W., Koo, B. T., Yum, D. Y., Lee, J. K. 2003. *AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in Arthrobacter sp., and predicted homologues in other bacteria*. *Microbiology* 149: 1541-1550.

Piñeiro-Vidal, M., Ríaza, A., Santos, Y. 2008. *Tenacibaculum discolor sp. nov. and Tenacibaculum galaicum sp. nov. Isolated from sole (Solea senegalensis) and turbot (Psetta maxima) culture systems*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 21-25.

Rasmussen, T. B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M. E., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Kote, M., Nielsen, J., Eberl, L., Givskov, M. 2005. *Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector*. *J. Bacteriol.* 187: 1799-1814.

Riaz, K., Elmerich, C., Raffoux, A., Moreira, D., Dessaux, Y., Faure, D. 2008. *Metagenomics revealed a quorum quenching lactonase QlcA from yet unculturable soil bacteria*. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 73: 3-6.

Romero, M. 2010. *Interceptación de señales de comunicación bacteriana tipo N-acylhomoserina lactona (AHL) en bacterias marinas aisladas del medio marino*. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

Romero, M., Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., Cámara, M., Otero, A. 2010. *Acylhomoserine lactone production and degradation by the fish pathogen Tenacibaculum maritimum, a member of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB) group*. *FEMS Microbiol. Lett.* 304: 131-139.

Romero, M., Martín-Cuadrado, A. B., Roca-Rivada, A., Cabello, A. M., Otero, A. 2011. *Quorum quenching in cultivable bacteria from dense marine coastal microbial communities*. *FEMS Microb. Ecol.* 75: 205-217.

Romero, M., Martín-Cuadrado, A. B., Otero, A. 2012a. *Determination of whether quorum quenching is a common activity in marine bacteria by analysis of cultivable bacteria and metagenomic sequences*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:6345-6348.

Romero, M., Acuna, L., Otero, A. 2012b. *Patents on Quorum Quenching: Interfering with Bacterial Communication as a Strategy to Fight Infections*. *Recent Patents on Biotechnology*, 6(1) :2-12.

Sambrook, J., et al., 2001 *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.

Sharma, V.K., Bearson, S.M.D. 2013. *Evaluation of the impact of the quorum sensing transcriptional regulator SdiA on long- term persistence and fecal shedding of Escherichia coli O157:H7 in weaned calves*. *Microb. Pathog.* 57: 21-26.

Swift, S., Williams, P., Stewart, G. S. A. B. 1999. *N-acylhomoserine lactones and quorum sensing in proteobacteria. En Cell-cell signaling in Bacteria*. Dunny, G. M., Winans, S. C. (eds). Washington D.C.: American Society for Microbiology., pp.

Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J., Salmond, G. P. 2001. *Quorum-sensing in Gram-negative bacteria*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 365-404.

Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C., Cámara, M. 2007. *Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world*. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 362: 1119-1134.

Zhang, H. B., Wang, L. H., Zhang, L. H. 2002. *Genetic control of quorum-sensing signal turnover in Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 4638-4643.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA FUNDACION PEDRO BARRIE DE LA MAZA, CONDE DE FENOSA	
5	<120> PÉPTIDO CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE QUORUM SENSING, POLINUCLEÓTIDO QUE CODIFICA DICHO PÉPTIDO Y LOS USOS DE LOS MISMOS	
	<130> P9915PC00	
10	<150> ES P201331060	
	<151> 11-07-2013	
	<160> 14	
15	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 861	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Tenacibaculum</i> sp. cepa 20J	
	<400> 1	
	atgaaaaaaa tattttttatt agctcttacg actattatta catttagttg taaaaatgcc	60
	gaaaagaagc aaacaacaga agaaaaaaca gttgaaaagc ctcaagtaaa acttcatggt	120
	ttagatggag gttcaatttt agttaacaaa cttgaagttt tttctcaaga tacaacatac	180
	acaggacagt ctaaacagtt ttcagatgct tactatgtaa tatctcacc ctaaaggaaat	240
	ttaatgtggg atgctgggtt acctgaagca ctaattactg acgaacctt tacagagcct	300
	agtgggtactt ttactttaca acgtaaagac tcattaaaaa accaactaaa atctattggt	360
	ttaactgttg atgattttta atactttgta ttatctcatc ctcatctcga tcatactggt	420
	cacgcaaaact acttaaaaaa cgcaacatgg ttagttcagg agaacgagta taattttata	480
	actaatgact ctgcaaaagt taaagatcct gacacttata attctattaa ggaattaaag	540
	aatgtagaaa aaattaatgg tgaccatgac gtttttggag acggcacagt agttattaaa	600
	tacatgccag gtcatacaat aggtcaccaa gctttatata ttgaagctgg ttagaaaaa	660
	cctatcttat taacagggtga tttatatcac tttgaagaga atagagaaac taaagggtgtt	720
	ccttctttta actacgatgt tgaacaaact ctagaaagca tgaaaaagtt tgaagctttc	780
	gctaaagaaa agaattgctga ggtgattatt caacactcac caaaagattt caaaaaatta	840
25	caaatctat taaaaaagta a	861
	<210> 2	
	<211> 286	
	<212> PRT	
30	<213> <i>Tenacibaculum</i> sp. cepa 20J	
	<400> 2	

Met Lys Lys Ile Phe Leu Leu Ala Leu Thr Thr Ile Ile Thr Phe Ser
1 5 10 15

Cys Lys Asn Ala Glu Lys Lys Gln Thr Thr Glu Glu Lys Thr Val Glu
 20 25 30
 Lys Pro Gln Val Lys Leu His Val Leu Asp Gly Gly Ser Ile Leu Val
 35 40 45
 Asn Lys Leu Glu Val Phe Ser Gln Asp Thr Thr Tyr Thr Gly Gln Ser
 50 55 60
 Lys Gln Phe Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Ile Ser His Pro Lys Gly Asn
 65 70 75 80
 Leu Met Trp Asp Ala Gly Leu Pro Glu Ala Leu Ile Thr Asp Glu Pro
 85 90 95
 Phe Thr Glu Pro Ser Gly Thr Phe Thr Leu Gln Arg Lys Asp Ser Leu
 100 105 110
 Lys Asn Gln Leu Lys Ser Ile Gly Leu Thr Val Asp Asp Phe Lys Tyr
 115 120 125
 Phe Val Leu Ser His Pro His Phe Asp His Thr Gly His Ala Asn Tyr
 130 135 140
 Leu Lys Asn Ala Thr Trp Leu Val Gln Glu Asn Glu Tyr Asn Phe Ile
 145 150 155 160
 Thr Asn Asp Ser Ala Lys Val Lys Asp Pro Asp Thr Tyr Asn Ser Ile
 165 170 175
 Lys Glu Leu Lys Asn Val Glu Lys Ile Asn Gly Asp His Asp Val Phe
 180 185 190
 Gly Asp Gly Thr Val Val Ile Lys Tyr Met Pro Gly His Thr Ile Gly
 195 200 205
 His Gln Ala Leu Tyr Ile Glu Ala Gly Leu Glu Lys Pro Ile Leu Leu
 210 215 220
 Thr Gly Asp Leu Tyr His Phe Glu Glu Asn Arg Glu Thr Lys Gly Val
 225 230 235 240
 Pro Ser Phe Asn Tyr Asp Val Glu Gln Thr Leu Glu Ser Met Lys Lys
 245 250 255
 Phe Glu Ala Phe Ala Lys Glu Lys Asn Ala Glu Val Ile Ile Gln His

	260	265	270
	Ser Pro Lys Asp Phe Lys Lys Leu Gln Asn Leu Leu Lys Lys		
	275	280	285
5	<210> 3 <211> 1130 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Secuencia del gen de aii20J modificada para la sobreexpresión y purificación del mismo <400> 3		
	cgcgaaatta atacgactca ctatagggga attgtgagcg gataacaatt cccctctaga	60	
	aataattttg ttttaacttta agaaggagat ataccatggt aaaaaaata tttttattag	120	
	ctottaogac tattattaca tttagttgta aaaatgccga aaagaagcaa acaacagaag	180	
	aaaaaacagt tgaaaagcct caagtaaaac ttcattgtttt agatggaggt tcaatttttag	240	
	ttaacaaaact tgaagttttt tctcaagata caacatacac aggacagtct aaacagtttt	300	
	cagatgctta ctatgtaata tctcacccta aaggaaattt aatgtgggat gctggtttac	360	
	ctgaagcact aattactgac gaacctttta cagagcctag tggtaactttt actttacaac	420	
	gtaaagactc attaaaaaac caactaaaat ctattggttt aactgttgat gattttaaat	480	
	actttgtatt atctcatcct catttcgac ctaactgggtca cgcaaactac ttaaaaaacg	540	
	caacatgggt agttcaggag aacgagtata attttataac taatgactct gcaaaagtta	600	
	aagatcctga cacttataat tctattaagg aattaaagaa tgtagaaaaa attaatggtg	660	
	accatgaogt ttttggagac ggcacagtag ttattaaata catgccaggt catacaatag	720	
	gtcaccaagc tttatatatt gaagctggtt tagaaaaacc tatcttatta acaggtgatt	780	
	tatatcactt tgaagagaat agagaaacta aaggtgttcc ttcttttaac tacgatgttg	840	
	aacaaactct agaaagcatg aaaaagtttg aagctttcgc taaagaaaag aatgctgagg	900	
	tgattattca aactcacca aaagatttca aaaaattaca aaatctatta aaaaagttga	960	
	attcgagotc cgtcgacaag cttgcggccg cactcgagca ccaccaccac caccactgag	1020	
	atccggctgc taacaaagcc cgaaaggaag ctgagttggc tgctgccacc gctgagcaat	1080	
	aactagcata accccttggg gcctctaaac gggctctgag gggttttttg	1130	
15	<210> 4 <211> 861 <212> ADN <213> <i>Tenacibaculum discolor</i>		
20	<400> 4		

```

atgaaaaaaaa tttttttatt agctcttacg actattattg catttagttg taaaaatgcc      60
gaaaagaagc aaacaacaga agaaaaaaca gttgaaaagc ctcaagtaaa acttcatgtt      120
ttagatggag gttcaatttt agttaacaaa cttgaagttt tttctcaaga tacaacatac      180
acaggacagt ctaaacaatt ttcagatgct tactatgtaa tatctcaccc taaaggaaat      240
ttaatgtggg atgctggttt acctgaagca ctaattactg acaaaccttt tacagagcct      300
agtgg tactt ttactttaca acgtaaagac tcattaaaaa accaattaaa atctattggt      360
ttaactgttg atgattttta atactttgta ttatctcato ctcatctcga tcatactggt      420
cacgcaaatt acttaaaaaa cgcaacatgg ttagttcagg agaacgaata taattttata      480
actaatgact ctgcaaaaagt taaagatcct gacacttata attctattaa ggaattaaag      540
aatgtagaaa aaattaatgg tgaccatgac gtttttggag acggcacagt agttatcaaa      600
tacatgccag gtcatacaat aggtcaccaa gctttatata ttgaagctgg tttagaaaaa      660
cctatcttat taacaggtga tttatatcac tttgaagaaa atagagaaac taaaggtgtt      720
ccttctttta actacgatgt tgaacaaact ctagaaagca tgaaaaagtt tgaagctttc      780
gctaaagaaa agaattgctga ggtgattatt caacattcac caaaagattt caaaaaatta      840
caaatctat taaaaaagta a                                                    861

```

<210> 5
 <211> 861
 <212> ADN
 <213> *Tenacibaculum gallaicum*

<400> 5

atgaaaaaaa	tatTTTTtatt	agctcttata	agcattatta	caattagttg	taaaaacgct	60
gaaaagaaac	aaacaacaga	agaaaaaaca	attgagaagc	ctcaggtaaa	acttcatggt	120
ttagatggtg	gatcaatttt	agttaacaaa	cttgaagttt	tttctcaaga	cacaacatat	180
acaggacagt	ctaaaaaact	ttcagatggt	ttttatgtaa	tctctcacc	taaaggaaac	240
ttaatgtggg	atgctgggtt	accagaagct	ttaattgtaa	acgagccttt	tactgaacct	300
actggtacat	ttacattaca	acgtaaagac	tctttaaaga	atcaattaaa	atcttttaggt	360
ttaactatag	atgattttta	atacatttcc	ctatctcacc	cacattttga	tcatactggt	420
catgctaact	actttaagaa	ttcaacgtgg	ttaattcagg	agaatgagta	taattttata	480
actagtgatt	ctgcaaaagt	taaggaccct	gacacctata	attctattaa	ggaattaaaa	540
aatgtagaaa	aaataaatgg	tgaccatgat	gtttttggag	atggtacggt	agttataaaa	600
tatatgcctg	gtcatactat	aggtcatcaa	gctttatatg	ttgaagctgg	tttagaaaaa	660
ccaatcttat	taacaggtga	tttatatcac	tttgaagaaa	acagagaaac	taaaggattt	720
cottctttta	attacgatgt	tgagcaaact	ctagaaagta	tgaagaagtt	tgaagctttc	780
gctaaagaaa	agaatgctga	ggtgattata	caacactcac	caaaagattt	caaaaaatta	840
caaatcttat	taaaaaagta	a				861

<210> 6
 <211> 843
 <212> ADN
 <213> *Tenacibaculum solae*

<400> 6

atgaaaaaaaa tttttttatt agctottact atcottatta ttggttgtaa aaaaaccgaa	60
aagaaagaag tacctaacga agttaaaaag ccogaagtaa aattatttca attagttggt	120
ggatcaattt tagtaataa attagagggt ttttogcaag atacaacgta caccgggtcaa	180
acaaaacagt ttaccgatgc ctattatgta atatgcacc caaaaggga cttaatgtgg	240
gatgctggtt tacctgaaaa cttggtatta cctgaagcgg ttactcctgg cgacggaacc	300
tttactgtac aaagaccoga ttcttttagca aatcaattaa aatcgattgg ttttaaaatt	360
gaagatttca agtatttttg aatgtctcac togcattttg atcatactgg gcatgcaaac	420
tatatgaaag acgctacttg gttgatacaa gaaaacgaat acaattcggg tgcaggagat	480
tcttttagcta aaaaaaatcc tgcgatagca gccttaaaaa atgtacaaaa attaaacggg	540
gattatgatg tttttggtga cggtaactgtt gttataaaat acatgccagg tcatactatt	600
ggcatcaag tattatatat tgaagcttct ggagttgaaa aaccaatttt attaacagga	660
gatttatatc attttgaaga aaacagagcc aacaaaggcg ttcttctatt caactataat	720
gttgaacaaa ctttagcaag catgcaaaaa tttgaagott ttgctaaaga aaaaaatgct	780
gaggtgatca ttcaacattc accaatagct ttcaaaaaat tacaaaatct attaaaaaag	840
taa	843

<210> 7
 <211> 861
 <212> ADN
 <213> *Tenacibaculum aestuarii*
 <400> 7

atgaaaaaaaa tttttttatt agctcttacg actattattg catttagttg taaaaatgcc	60
gaaaagaagc aaacaacaga agaaaaaaca gttgaaaagc ctcaagtaaa acttcatggt	120
ttagatggag gttcaatttt agttaacaaa cttgaagttt tttctcaaga tacaacatac	180
acaggacagt ctaaacaatt ttcagatgct tactatgtaa tatctcacc taaaggaaat	240
ttaatgtggg atgctggtt acctgaagca ctaattactg acaaacctt tacagagcct	300
agtggtaact ttactttaca acgtaaagac tcattaaaaa accaattaaa atctattggt	360
ttaactgttg atgattttta atactttgta ttatctcatc ctcatctcga tcatactggt	420
cacgcaaatt acttaaaaaa cgcaacatgg ttagttcagg agaacgaata taattttata	480

actaatgact ctgcaaaagt taaagatcct gacacttata attctattaa ggaattaaag 540
aatgtagaaa aaattaatgg tgaccatgac gtttttggag acggcacagt agttatcaaa 600
tacatgccag gtcatacaat aggtcaccaa gctttatata ttgaagctgg tttagaaaaa 660
cctatcttat taacaggtga tttatatcac tttgaagaaa atagagaaac taaaggtgtt 720
ccttctttta actacgatgt tgaacaaact ctagaaagca tgaaaaagtt tgaagctttc 780
gctaaagaaa agaagctga ggtgattatt caacactcac caaaagattt caaaaaatta 840
caaaatctat taaaaaagta a 861

<210> 8
<211> 861
<212> ADN
<213> *Tenacibaculum lutimaris*

<400> 8

atgaaaaaaa tatttttatt agctcttacg actattattg catttagttg taaaaatgcc 60
gaaaagaagc aaacaacaga agaaaaaaca gttgaaaagc ctcaagtaaa acttcatgtt 120
ttagatggag gttcaatttt agttaacaaa cttgaagttt tttctcaaga tacaacatac 180
acaggacagt ctaaacaatt ttcagatgct tactatgtaa tatctcacc taaaggaaat 240
ttaatgtggg atgctggttt acctgaagca ctaattactg acaaaccttt tacagagcct 300
agtggacttt ttactttaca acgtaaagac tcattaaaaa accaattaaa atctatttgt 360
ttaactgttg atgattttta ataacttgta ttatctcatc ctcatctoga tcatactggg 420
cacgcaaatt acttaaaaaa cgcaacatgg ttagttcagg agaacgaata taattttata 480
actaatgact ctgcaaaagt taaagatcct gacacttata attctattaa ggaattaaag 540
aatgtagaaa aaattaatgg tgaccatgac gtttttggag acggcacagt agttatcaaa 600
tacatgccag gtcatacaat aggtcaccaa gctttatata ttgaagctgg tttagaaaaa 660
cctatcttat taacaggtga tttatatcac tttgaagaaa atagagaaac taaaggtgtt 720
ccttctttta actacgatgt tgaacaaact ctagaaagca tgaaaaagtt tgaagctttc 780
gctaaagaaa agaagctga ggtgattatt caacactcac caaaagattt caaaaaatta 840
caaaatctat taaaaaagta a 861

<210> 9
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador Lact20JF

<400> 9

gattaaccat ggtaaaaaaaa atatttttat tagc 34

5	<210> 10 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador Lact20JR <400> 10 gctatgaatt caactttttt aatagatttt gtaat	35
15	<210> 11 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador TEN1F <400> 11 tctcatcctc atttcgatca tactggt	27
25	<210> 12 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador TEN1R <400> 12 ttggtgacct attgtatgac ctgg	24
35	<210> 13 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador T7Dir <400> 13 taatacgact cactataggg gaa	23
45	<210> 14 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> T7Inv <400> 14 gctagttatt gctcagcgg	19
55		

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante del mismo que tiene un grado de identidad de al menos un 76 % con respecto a dicha SEQ ID NO: 1 y que codifica un péptido con actividad inhibidora de *Quorum Sensing* (QS), en el que dicho péptido es un péptido que inhibe las señales mediadas por una N-acil-homoserina lactona (AHL) hidrolizando el anillo de lactona presente en dicha AHL.
2. Un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Un péptido aislado codificado por la secuencia nucleotídica del polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1.
4. Una célula hospedadora transformada con el vector de la reivindicación 2, con la condición de que dicha célula no sea una bacteria del género *Tenacibaculum*.
5. Un organismo no humano transgénico que comprende, insertado en el genoma del mismo, el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, o el vector de acuerdo con la reivindicación 2, con la condición de que dicho organismo no sea una bacteria del género *Tenacibaculum*.
6. Una composición que comprende el vector de acuerdo con la reivindicación 2 o la célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 4.
7. Un producto alimenticio que comprende la composición de acuerdo con la reivindicación 6 y un vehículo adecuado para alimentación.
8. Uso del polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, o el vector de acuerdo con la reivindicación 2, o el péptido aislado de acuerdo con la reivindicación 3, o la célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 4, o el organismo no humano transgénico de acuerdo con la reivindicación 5 en el que dicho organismo no humano transgénico es una planta, en la preparación de un producto alimenticio.
9. Una composición farmacéutica que comprende la composición de acuerdo con la reivindicación 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. Un producto para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una infección bacteriana, en el que dicho producto se selecciona entre el grupo que consiste en:
 - a) El polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1;
 - b) El vector de acuerdo con la reivindicación 2;
 - c) El péptido aislado de acuerdo con la reivindicación 3;
 - d) La célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 4; y
 - e) El organismo no humano transgénico de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho organismo no humano transgénico es una planta.
11. El producto para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la bacteria que causa la infección bacteriana es una bacteria productora de señales de *quorum sensing* (QS).
12. El producto para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dichas señales de QS producidas por la bacteria causante de la infección comprenden una N-acil-homoserina lactona (AHL), en el que dicha AHL es (i) una AHL no sustituida, en la que dicha AHL no sustituida se selecciona entre el grupo que consiste en C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL, C14-HSL y combinaciones de las mismas; (ii) una AHL oxo- o hidroxi-sustituida, en la que dicha AHL oxo- o hidroxi-sustituida se selecciona entre el grupo que consiste en OC6-HSL, OC12-HSL y combinaciones de las mismas; o (iii) combinaciones de (i) y (ii).
13. Una composición agrícola que comprende la composición de acuerdo con la reivindicación 6 y un vehículo agrícolamente aceptable.
14. Uso del polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, o el vector de acuerdo con la reivindicación 2, o el péptido aislado de acuerdo con la reivindicación 3, o la célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 4, o el organismo no humano transgénico de acuerdo con la reivindicación 5 en el que dicho organismo no humano transgénico es una planta, en la preparación de una composición agrícola.
15. Un método para controlar una enfermedad bacteriana en una planta, que comprende poner en contacto dicha planta con el péptido aislado de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha enfermedad bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de *quorum sensing* (QS), en condiciones que permiten controlar dicha enfermedad bacteriana.

16. Un método para controlar una enfermedad bacteriana en una planta, que comprende transformar dicha planta con el polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, o con el vector de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha enfermedad bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de *quorum sensing* (QS).

5 17. Un método para controlar una enfermedad bacteriana en una planta, que comprende usar una bacteria transformada con el polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, o con el vector de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha enfermedad bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de *quorum sensing* (QS), en condiciones que permiten controlar dicha enfermedad bacteriana.

10 18. Un método para provocar un proceso de *quorum quenching* (QQ) en respuesta a un proceso de *quorum sensing* (QS) o para inhibir un proceso de *quorum sensing* (QS), en el que dicho proceso de QS es causado por una bacteria productora de señales de QS, que comprende poner en contacto dicha bacteria con un producto seleccionado entre el grupo que consiste en:

- 15 a) El polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1;
- b) El vector de acuerdo con la reivindicación 2;
- c) El péptido aislado de acuerdo con la reivindicación 3;
- d) La célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 4; y
- 20 e) El organismo no humano transgénico de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho organismo no humano transgénico es una planta,

en condiciones que permiten provocar dicho proceso de QQ o inhibir dicho proceso de QS, y en el que dicho método no consiste en un método de tratamiento quirúrgico o terapéutico del cuerpo humano o animal.

25 19. Un método *in vitro* o *ex vivo* para inhibir la formación de biopelículas bacterianas, en el que dicha biopelícula bacteriana es producida por una bacteria productora de señales de *quorum sensing* (QS), que comprende poner en contacto un producto seleccionado entre el grupo que consiste en:

- 30 a) El polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1;
- b) El vector de acuerdo con la reivindicación 2;
- c) El péptido aislado de acuerdo con la reivindicación 3;
- d) La célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 4; y
- e) El organismo no humano transgénico de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho organismo no humano transgénico es una planta,

35 con dicha bacteria productora de señales de QS, en condiciones que permiten inhibir dicha formación de biopelícula bacteriana.

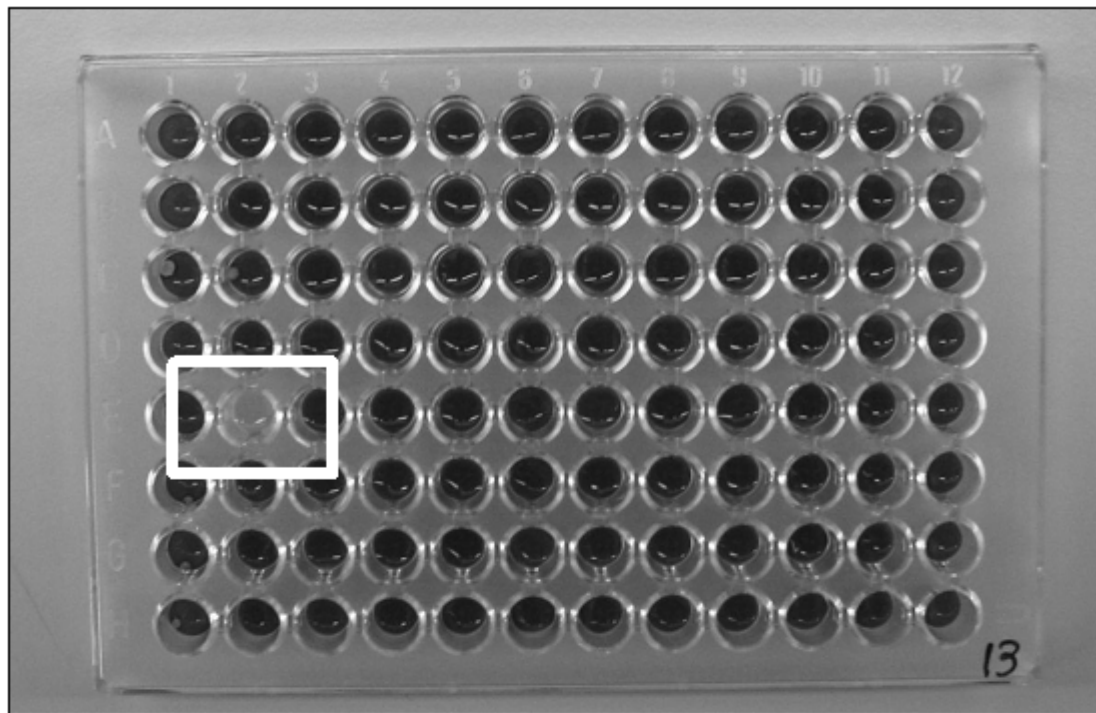


Fig. 1

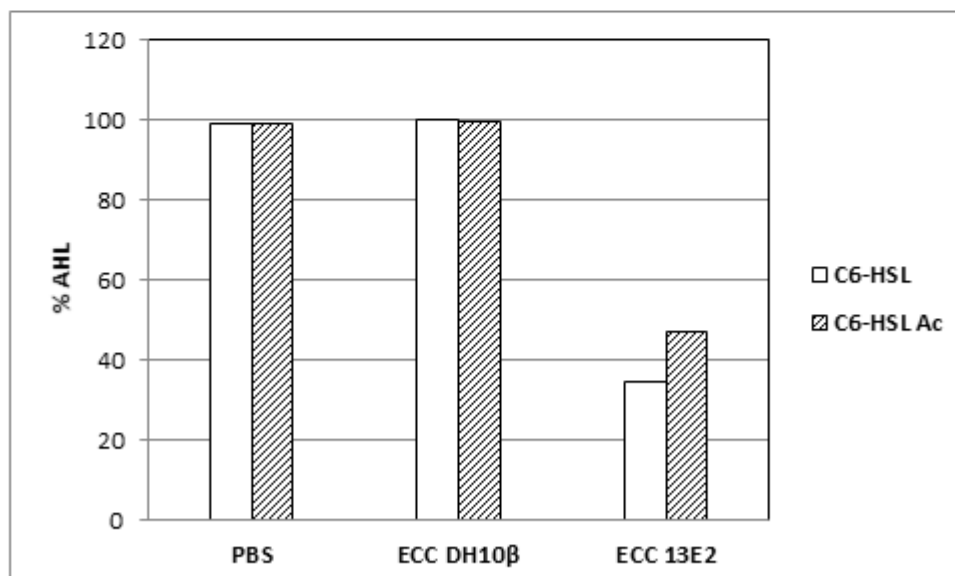


Fig. 2

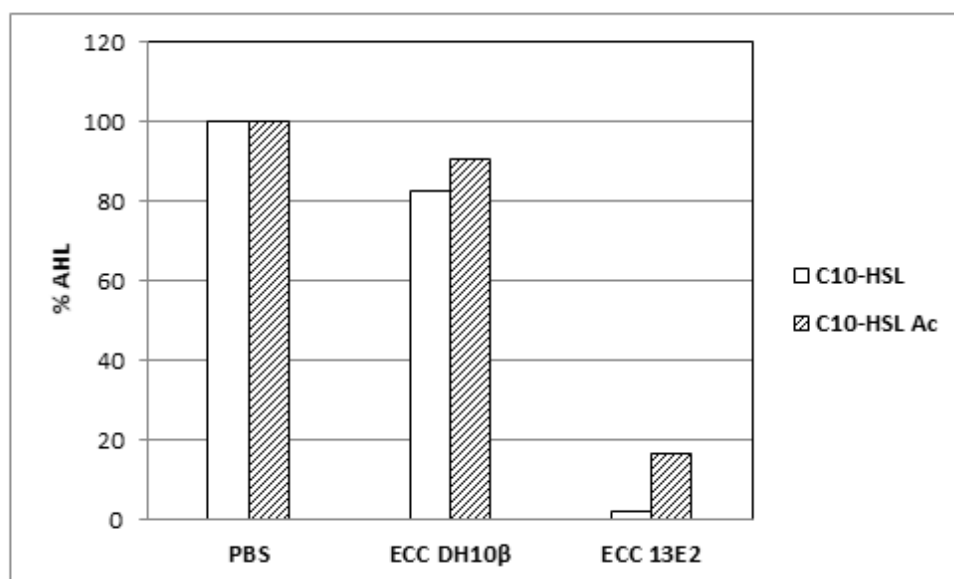


Fig. 3

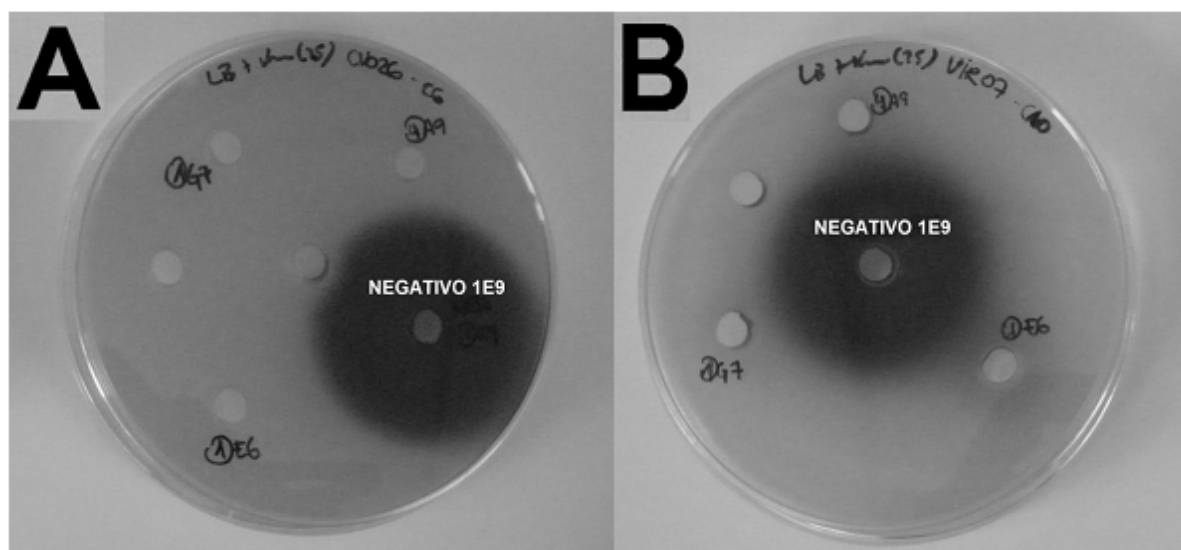


Fig. 4

[illegible]



Fig. 6

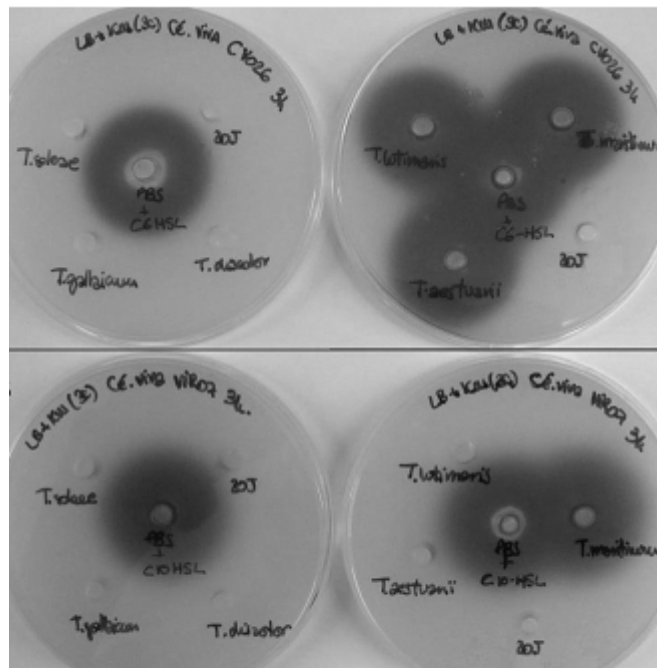
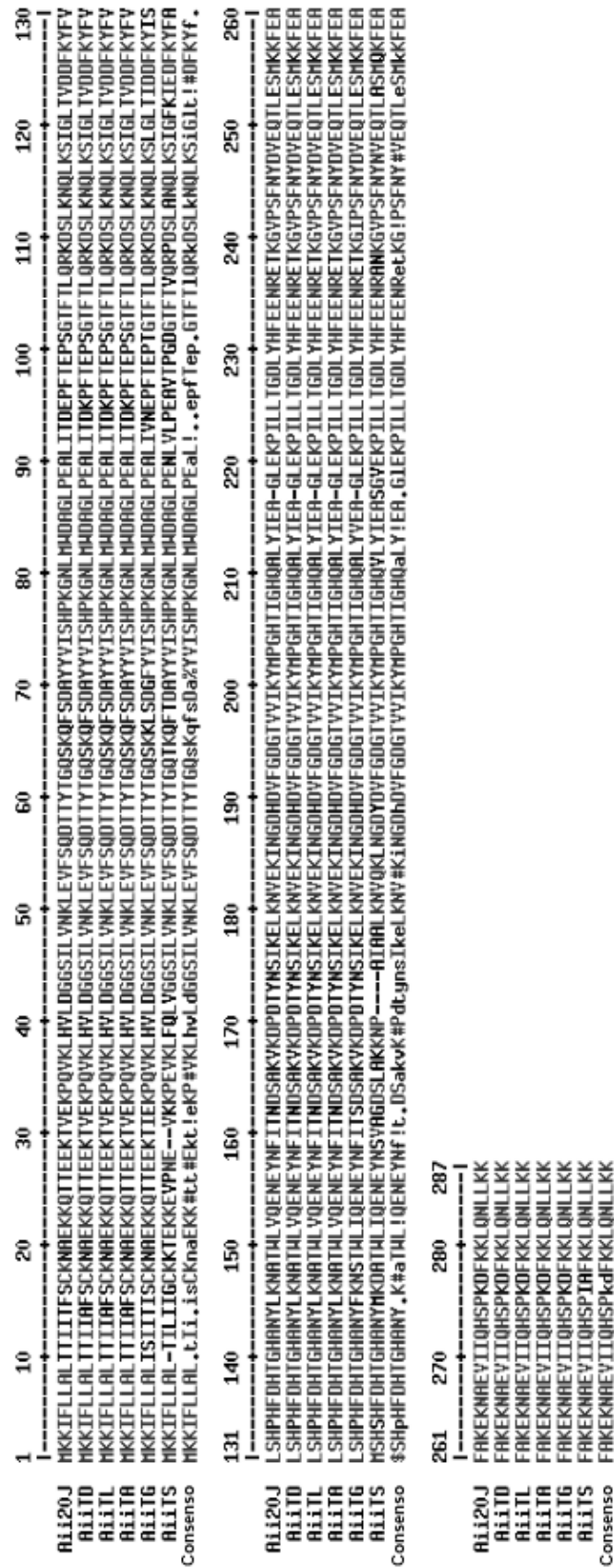


Fig. 7



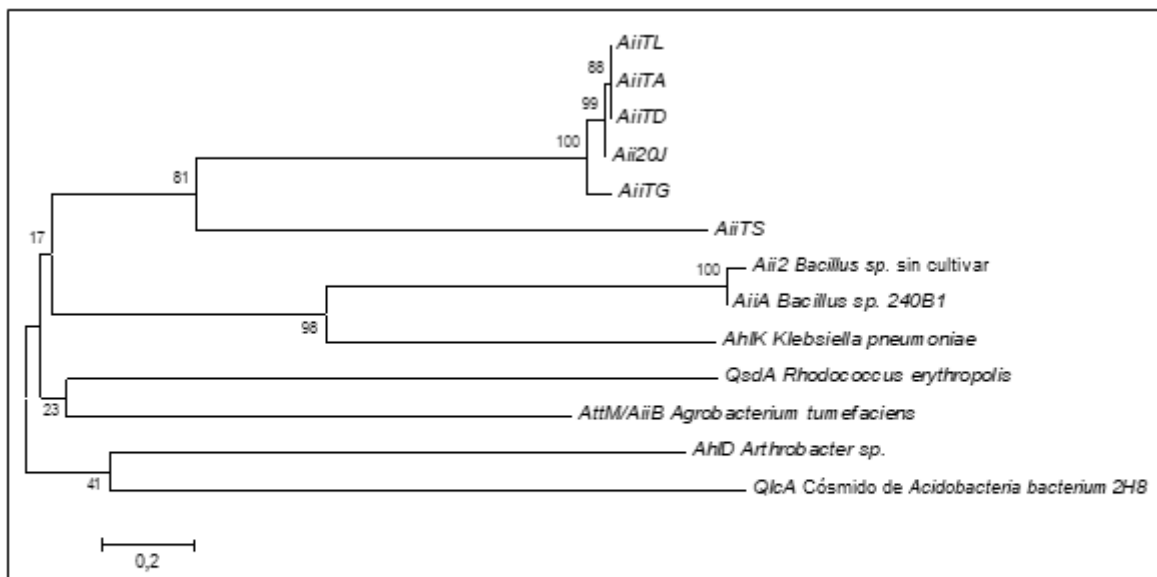


Fig. 9

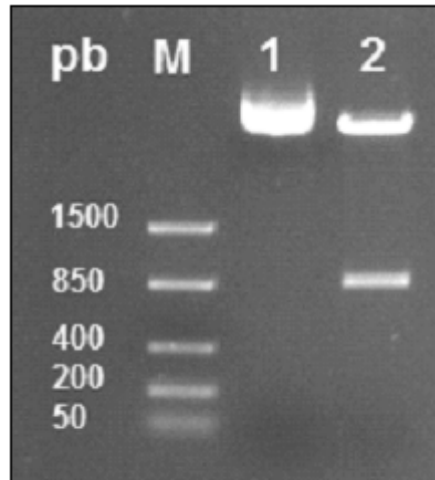


Fig. 10

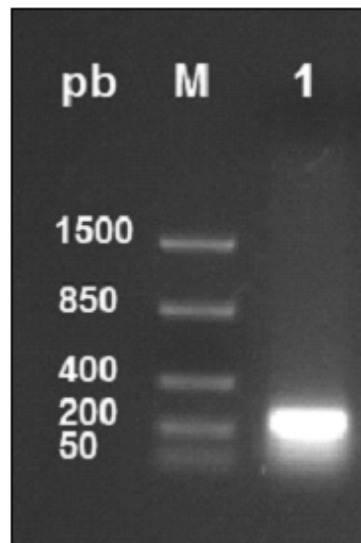


Fig. 11

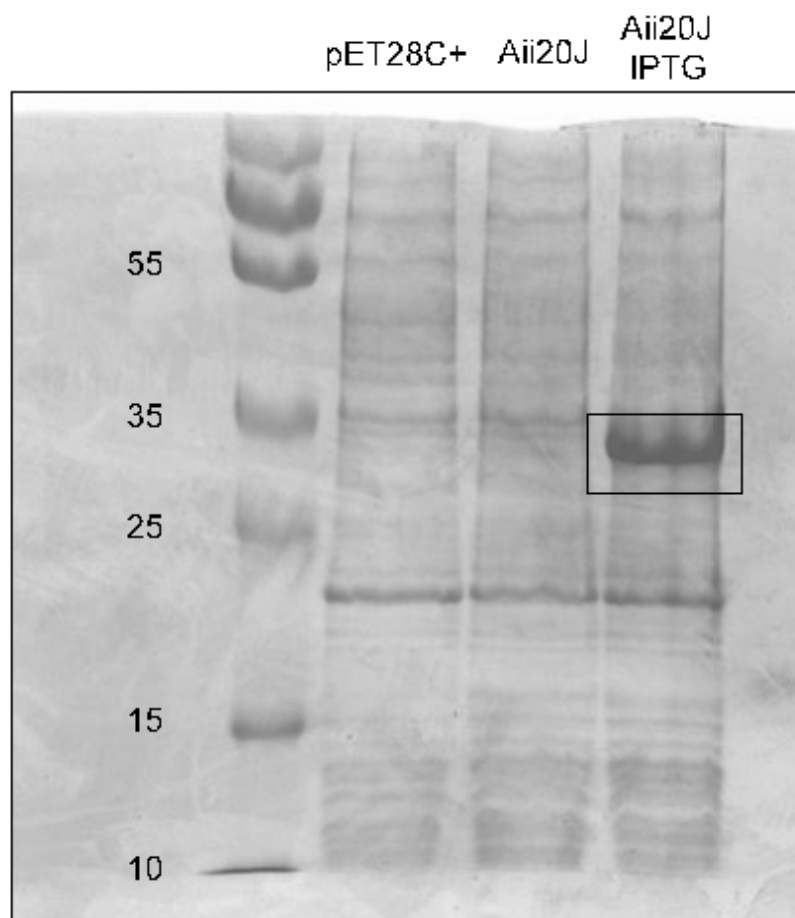


Fig. 12

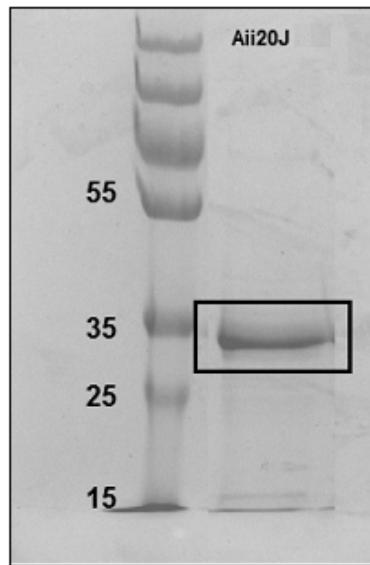


Fig. 13

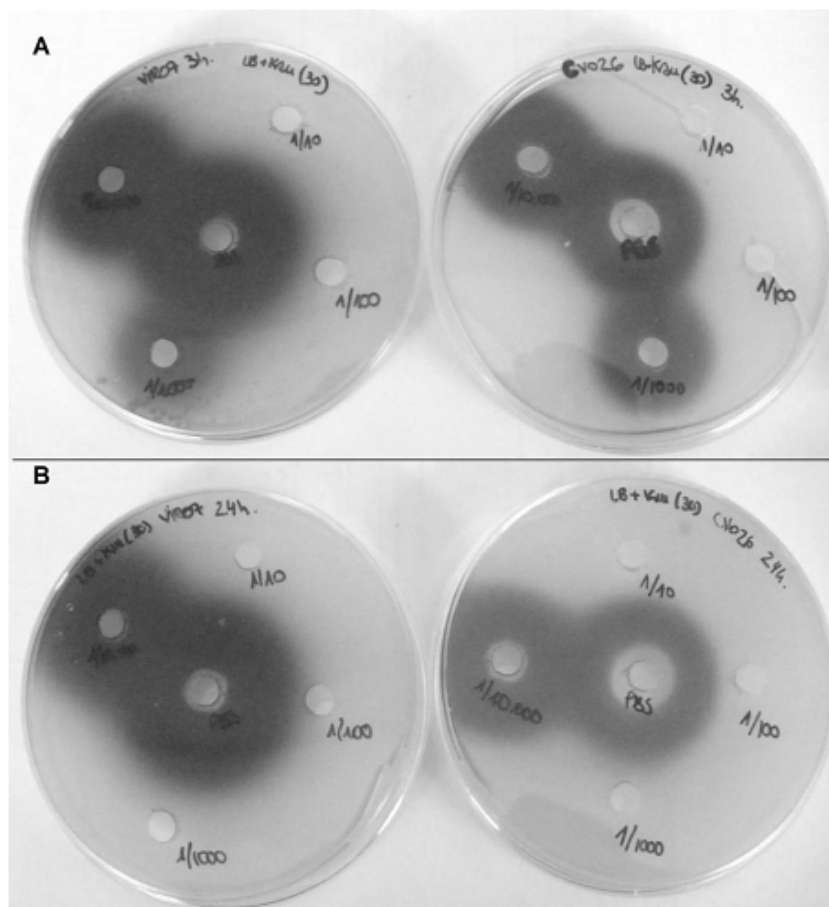


Fig. 14

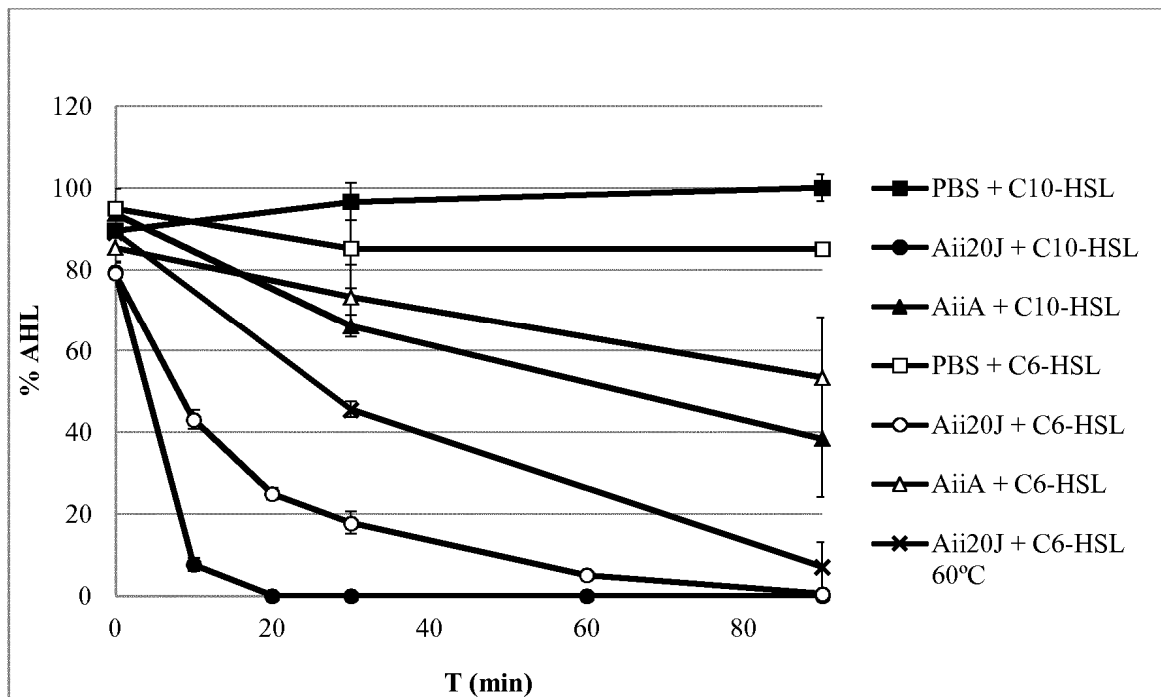


Fig. 15

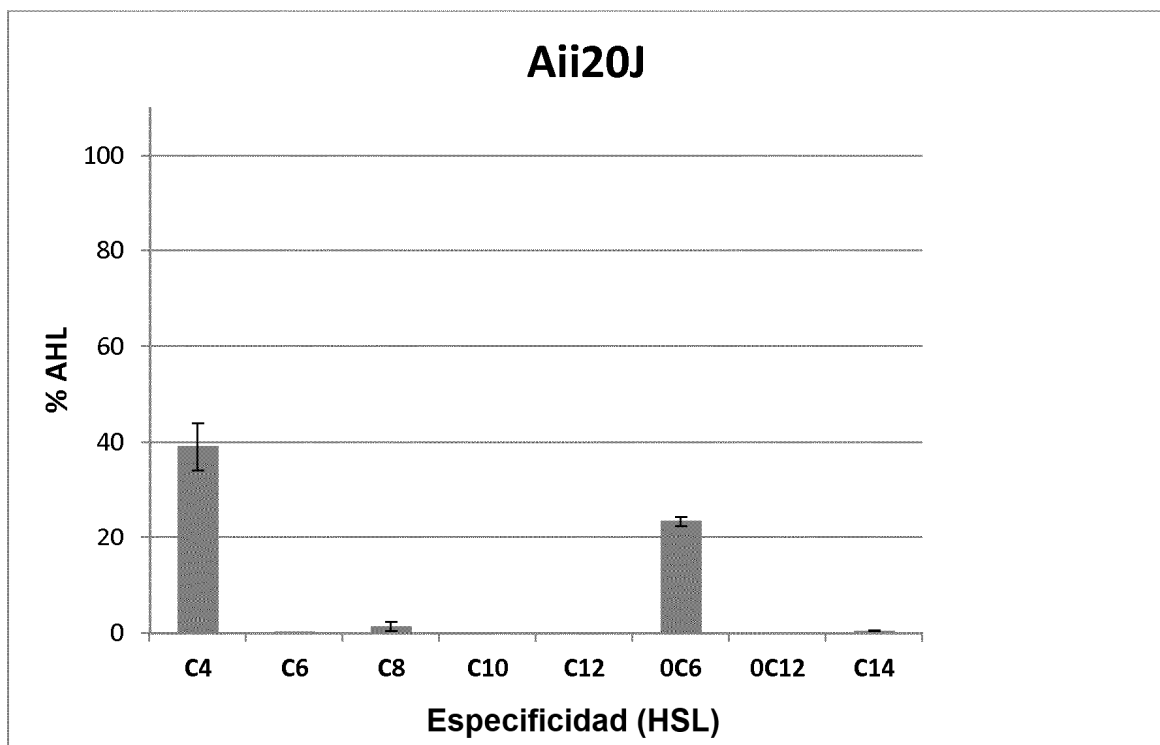


Fig. 16

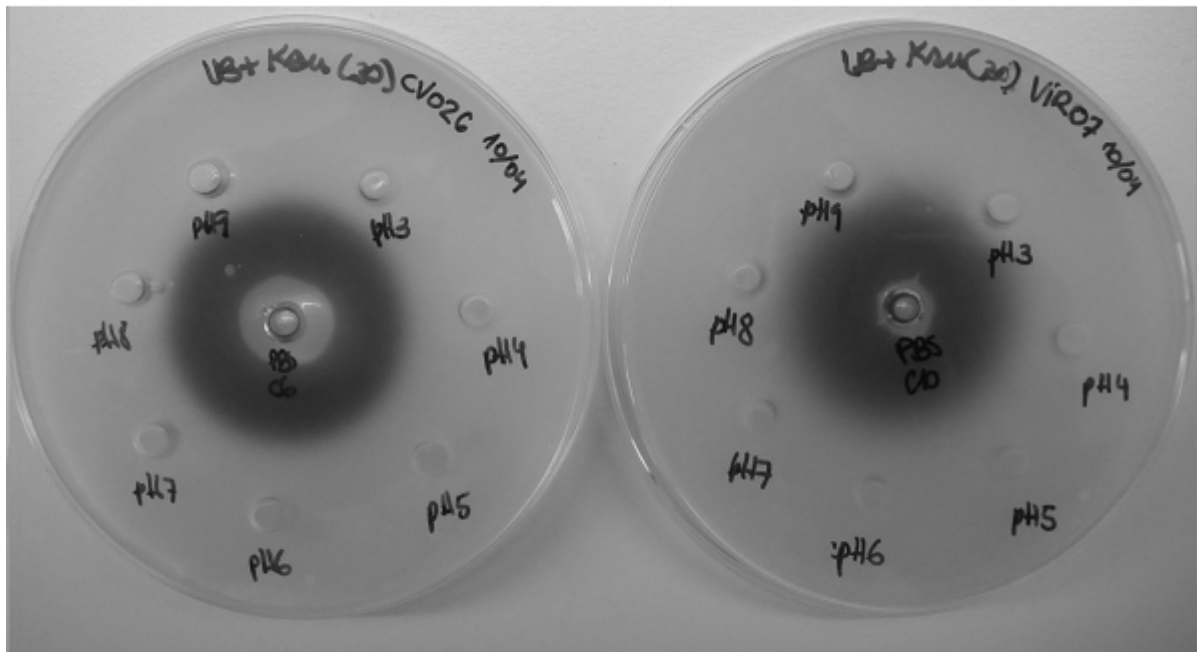


Fig. 17

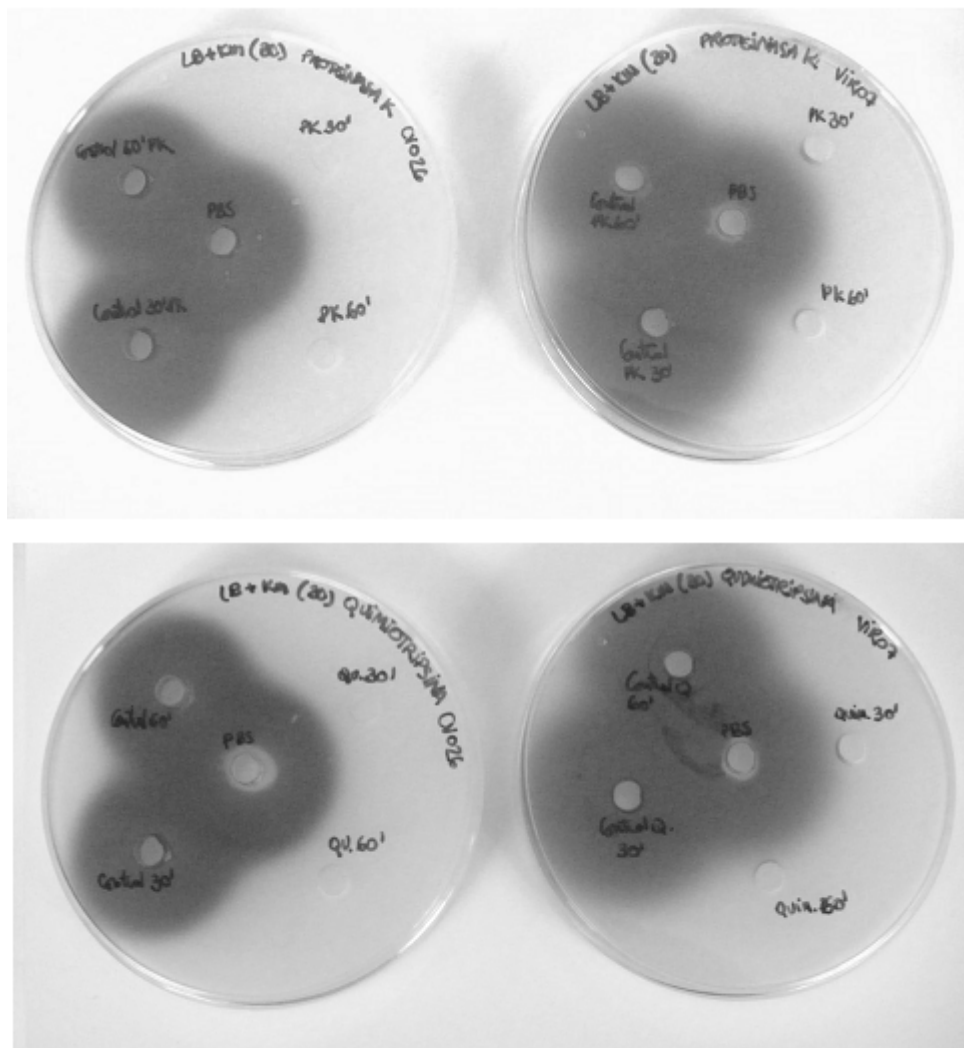


Fig. 18

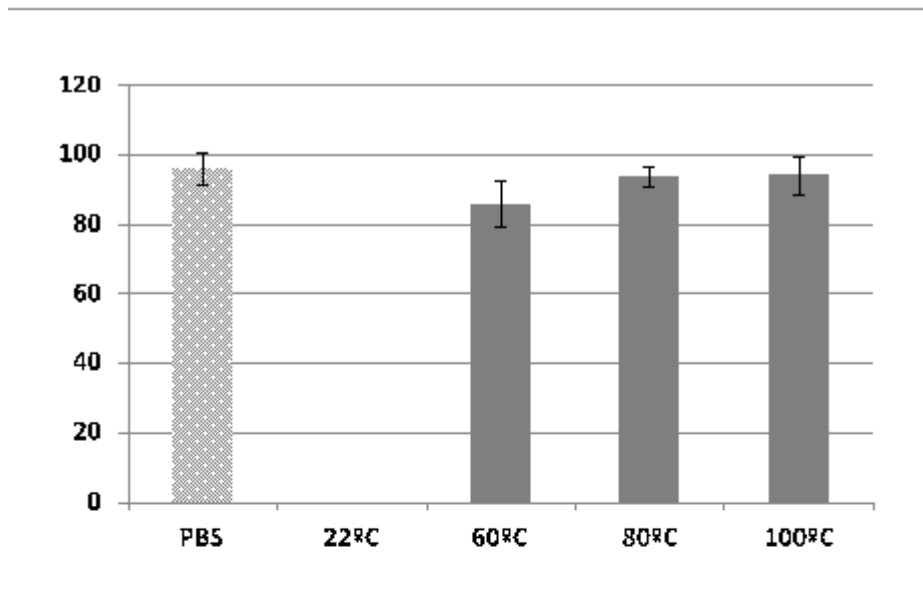


Fig. 19

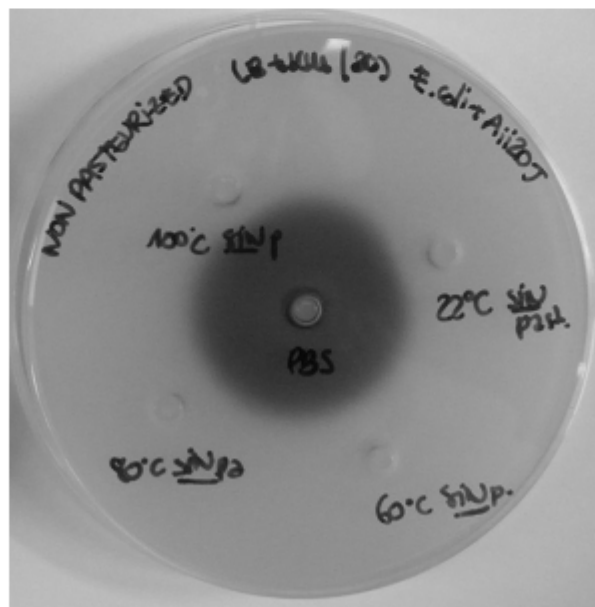


Fig. 20

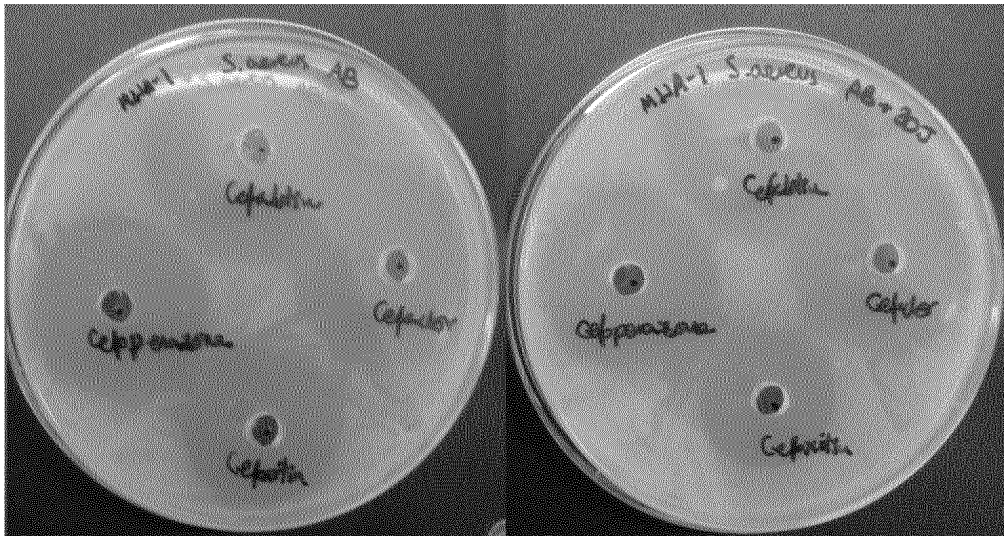


Fig. 21

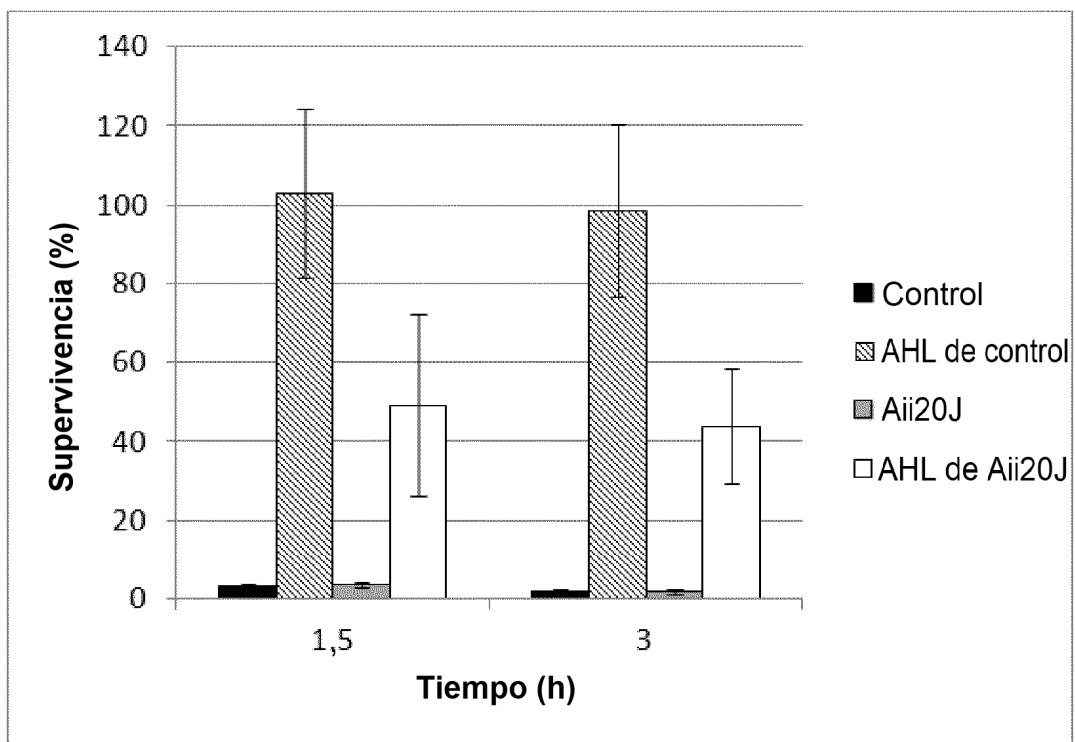


Fig. 22