

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2014/195554 A1**

(43) Fecha de publicación internacional  
11 de diciembre de 2014 (11.12.2014) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C12N 1/20 (2006.01) A61K 31/721 (2006.01)  
C12N 9/10 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)  
C12P 19/08 (2006.01) C12R 1/225 (2006.01)  
C12P 19/18 (2006.01)

Biológicas (CIB), C/ Ramiro De Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **AZNAR NOVELLA, Rosa**; Universitat De Valencia, Avda. Blasco Ibañez nº 13, E-46010 Valencia (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070464

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Angel**; Glorieta Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:

5 de junio de 2014 (05.06.2014)

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P 201330831 5 de junio de 2013 (05.06.2013) ES

(71) Solicitantes: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Serrano nº 117, E-28006 Madrid (ES). **UNIVERSITAT DE VALENCIA** [ES/ES]; Avda. Blasco Ibañez nº 13, E-46010 Valencia (ES).

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventores: **NACHER VAZQUEZ, Montserrat**; Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro De Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **LOPEZ GARCIA, Paloma**; Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro De Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **PRIETO ORZANO, Alicia**; Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro De Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **PEREZ PRIETO, Sara Isabel**; Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro De Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **RODRIGUEZ SAINT-JEAN, Sylvia**; Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro De Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **MOHEDANO BONILLA, Maria De La Luz**; Centro de Investigaciones

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCE ENCODING AN ENZYME HAVING DEXTRANSUCRASE ACTIVITY, CELLS THAT EXPRESS SAME AND USE OF SAID CELLS FOR THE PRODUCTION OF EXOPOLYSACCHARIDES HAVING ANTIVIRAL ACTIVITY, AND COMPOSITIONS CONTAINING SAID EXOPOLYSACCHARIDES

(54) Título : SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS CODIFICANTE DE UNA ENZIMA CON ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA, CÉLULAS QUE LA EXPRESAN Y SU USO PARA LA OBTENCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS CON ACTIVIDAD ANTIVIRAL Y COMPOSICIONES QUE LOS CONTIENEN

(57) Abstract: The invention relates to a novel nucleotide sequence coding for an enzyme having dextranase activity, isolated from a bacterial strain of Lactobacillus sakei that can produce exopolysaccharide, more specifically from pork loin lunch meat. The invention also relates to the method for obtaining and purifying said exopolysaccharide, as well as to the use of the exopolysaccharide as an antiviral agent in the treatment of fish species, mainly salmonidae. The invention further relates to dietary or veterinary pharmaceutical compositions containing said exopolysaccharide.

(57) Resumen: La presente invención trata de una nueva secuencia de nucleótidos que codifica para una enzima con actividad dextranasa aislada a partir de una cepa bacteriana de Lactobacillus sakei, más concretamente de fiambre de magro de cerdo, que presenta capacidad para producir un exopolisacárido. La invención se refiere también al procedimiento de obtención y purificación de dicho exopolisacárido así como al uso del exopolisacárido como agente antiviral en el tratamiento de especies piscícolas, principalmente salmónidos. La invención también protege composiciones farmacéuticas veterinarias o alimentarias que contienen dicho exopolisacárido.

WO 2014/195554 A1

## DESCRIPCIÓN

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS CODIFICANTE DE UNA ENZIMA CON  
ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA, CÉLULAS QUE LA EXPRESAN Y SU  
5 USO PARA LA OBTENCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS CON ACTIVIDAD  
ACTIVIRAL Y COMPOSICIONES QUE LOS CONTIENEN

### SECTOR Y OBJETO DE LA INVENCION

10 La presente invención se circunscribe dentro del sector de la biotecnología y se  
refiere a una nueva cepa bacteriana y a una secuencia de nucleótidos  
codificante de una enzima con actividad dextransacarasa, con capacidad para  
producir un exopolisacárido con actividad antivírica y a un procedimiento para  
producir dicha enzima y dicho compuesto. Esta invención se refiere, además, a  
15 composiciones alimentarias o farmacéuticas veterinarias que contienen el  
exopolisacárido y que son de aplicación en el sector de la acuicultura para  
combatir enfermedades infecciosas virales, principalmente en salmónidos.

### ESTADO DE LA TECNICA

20 Las bacterias ácido lácticas son microorganismos considerados GRAS  
(*Generally Recognized as Safe*) y algunas de estas bacterias son capaces de  
sintetizar polisacáridos extracelulares (EPS) tanto heteropolisacáridos como  
homopolisacáridos. Las propiedades de dichos EPS están determinadas por: (i)  
25 el tipo de enlace y unidades de monosacáridos que lo formen, (ii) su grado y  
tipo de ramificación, y (iii) tanto su masa molecular como su conformación.

Los  $\alpha$ -glucanos son homopolisacáridos y se clasifican en función del tipo de  
enlace  $\alpha$ -glicosídico que une las diferentes moléculas de glucosa. Los  
30 dextranos, presentan principalmente uniones  $\alpha$ -(1→6) (Robyt y Walseth (1979)  
Carbohydr. Res. 68:95–111). Los reuteranos poseen uniones  $\alpha$ -(1→4) (Kralj,  
van Geel-Schutten, Dondorff, Kirsanovs, van der Maarel y Dijkhuizen (2004)

Microbiology 150: 3681–3690). Los mutanos, contienen uniones  $\alpha$ -(1→3) (Shiroza, Ueda, y Kuramitsu (1987) J. Bacteriol. 169:4263–4270) y los alternanos, como su nombre indica, alternan uniones  $\alpha$ -(1→3) y uniones  $\alpha$ -(1→6) (Arguello-Morales, Remaud-Simeon, Pizzut, Sarçabal, Willemot y Monsan (2000) FEMS Microbiol. Lett. 182:81–85). Las especies bacterianas capaces de sintetizarlos son bacterias lácticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Weisella* (Amari, Gomez Arango, Gabriel, Robert, Morel, Moulis, Gabriel, Remaun-Siméon y Fontagné-Faucher (2012) Appl. Microbiol. Biotechnol. DOI 10.1007/s00253-012-4447-8) (Rühmkorf, Bork, Mischnick, Rüksam, Becker y Vogel (2013) Food Microbiol. 34 (2013) 52-61).

Los  $\alpha$ -glucanos son sintetizados por glucansacarosas también conocidas como glucosiltransferasas. Estas enzimas pertenecen a la familia de las glicosilhidrolasas (GH70) con cuatro tipos de dominios estructurales en base a su secuencia de aminoácidos: (i) un péptido señal en su extremo amino terminal, (ii) una región variable, (iii) un dominio catalítico y (d) una región carboxilo terminal (van Hijum, Kralj, Ozimek, Dijkhuizen y van Geel-Schutten (2006) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70:157–176).

Las dextransacarosas (EC 2.4.1.5) son enzimas secretadas al medio o que permanecen unidas a la superficie de la célula. Estas enzimas sintetizan dextrano utilizando como sustrato sacarosa y catalizando la siguiente reacción química:  $\text{sacarosa} + (1,6\text{-}\alpha\text{-D-glucosil})_n \rightarrow \text{D-fructosa} + (1,6\text{-}\alpha\text{-D-glucosil})_{n+1}$ . Los dextranos presentan diferentes tipos de ramificaciones:  $\alpha$ -(1→3);  $\alpha$ -(1→2) o  $\alpha$ -(1→4) y presentan un elevado peso molecular (superior a  $10^6$  Da). En presencia de aceptores eficientes, como la maltosa, la reacción se desplaza hacia la síntesis de oligosacáridos de interés como prebióticos (Ruiz-Matute, Brokl, Sanz, Soria, Côté, Collins y Rastal (2011) J. Agric. Food Chem., 59:3693-3700). Las dextransacarosas de las especies de *Streptococcus* en general se producen de forma constitutiva, mientras que las de las especies de

*Leuconostoc* son inducidas por sacarosa, aunque se han conseguido mutantes constitutivos.

5 El dextrano sintetizado por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F fue uno de los primeros biopolímeros producidos a escala industrial con varias aplicaciones en biotecnología y medicina. El dextrano se lleva empleando hace mucho tiempo como espesante, como sustituto de plasma sanguíneo y como matriz en columnas de Sephadex® (Naessens, Cerdobbel, Soetaert y Vandamme (2005) J. Chem. Technol. Biotechnol. 80:845–860). En la  
10 actualidad, el número de bacterias productoras de dextrano ha ido en aumento junto a nuevas aplicaciones del mismo como prebiótico, agente bioactivo y/o agente anticorrosión, en cosmética y en productos horneados (US0059633; US6399119; US8263380; US0165290).

15 Ciertos tipos de dextrano, como el dextrano sulfatado, también se han empleado para combatir ciertos virus como son el del dengue (Alen y Schols (2012) J. Tropical Medicine doi:10.1155/2012/628475) ó el virus de la influenza (Yamada, Moriishi, Haredy, Takenaka, Mori, Yamanishi y Okamoto (2012) Antiviral Res. 96:344–352).

20 Por otra parte, actualmente en acuicultura las enfermedades infecciosas de origen vírico provocan grandes pérdidas económicas. Entre los virus de salmónidos más relevantes se encuentran, el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) y el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI)  
25 que son capaces de inducir persistencia, y en animales supervivientes a la infección se produce un estado de portador asintomático, que implica mayor dificultad para la erradicación del virus. Además, el VNPI se está aislando últimamente en el medio marino en especies de alto valor comercial, como el salmón del Atlántico, al que causa altas mortalidades. El impacto económico es  
30 aún mayor si además se producen coinfecciones con otro virus, como por ejemplo el de la anemia infecciosa del salmón (VAIS), un orthomixovirus emergente en países productores.

Aunque existen vacunas de ácido desoxirribonucleico (ADN) probadas a nivel de laboratorio que han mostrado ser eficaces (de las Heras, Rodríguez Saint-Jean y Pérez-Prieto (2010) Fish Shellfish Immunol. 27:120-129), en la actualidad sólo se está utilizando en piscifactorías una vacuna de ADN en Canadá contra el VNHI (Salonius, Simard, Harland y Ulmer (2007) Curr. Opin. Invest. Drugs 8:635–641).

En base a lo anterior, la invención que aquí se presenta tiene gran interés dentro de la búsqueda de estrategias para combatir las infecciones víricas, como son las vacunas y los suplementos dietéticos incluyendo prebióticos, que ayuden a mejorar la resistencia contra las enfermedades infecciosas en acuicultura.

## 15 **EXPLICACION DE LA INVENCION**

### **Breve descripción de la invención**

Un objeto de la invención lo constituye una secuencia de nucleótidos, en adelante secuencia de nucleótidos de la invención, caracterizada por que se corresponde con la secuencia SEQ ID NO: 4.

Una realización particular de la invención la constituye una secuencia de nucleótidos caracterizada por que presenta una identidad del 80% con la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 4 y por que codifica una enzima dextranacarasa útil para la obtención de exopolisacáridos.

Otro objeto de la invención la constituye un vector de expresión tipo procariota o eucariota, en adelante vector de expresión de la invención, que comprende la SEQ ID NO: 4, o una secuencia de nucleótidos caracterizada por que presenta una identidad del 80% con la SEQ ID NO: 4 y que codifica una enzima dextranacarasa útil para la obtención de exopolisacáridos.

Una realización particular de la invención la constituye el vector de expresión de la invención, que comprende la SEQ ID NO: 6.

- 5 Otro objeto de la invención lo constituye una enzima con actividad dextransacarasa útil para la obtención de un exopolisacárido, en adelante enzima dextransacarasa de la invención, que está codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención, o por una secuencia de nucleótidos caracterizada por que presenta una identidad del 80% con la SEQ ID NO: 4.

10

Otra realización particular de la invención la constituye la enzima dextransacarasa de la invención constituida por la SEQ ID NO: 5.

- Otro objeto de la invención lo constituye una célula útil para obtener exopolisacáridos, en adelante célula de la invención, que comprende una  
15 secuencia de nucleótidos de la invención, preferentemente la SEQ ID NO: 4, o un vector de expresión de la invención.

Otra realización particular de la invención la constituye la célula de la invención que se corresponde con la cepa *Lactobacillus sakei* MN1 con CECT 8329.

20

Otro objeto de la invención lo constituye el uso de la célula de la invención para la obtención de una enzima con actividad dextransacarasa que comprende la  
SEQ ID NO: 5.

- 25 Otro objeto de la invención lo constituye el uso de la célula de la invención en un procedimiento útil para la obtención de un exopolisacárido.

- Otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención de un exopolisacárido celular, en adelante procedimiento de obtención de un  
30 exopolisacárido celular de la invención, donde se usa la célula de invención y que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una bacteria *L. sakei* en medio de cultivo suplementado con al menos un azúcar, seleccionado de entre sacarosa y maltosa, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento del exopolisacárido;
- b) eliminar las bacterias por centrifugación y separar el sobrenadante;
- 5 c) añadir un alcohol, preferentemente etanol, o una cetona, preferentemente acetona, para obtener un precipitado del exopolisacárido; y
- d) centrifugar el precipitado del paso (c) para eliminar el sobrenadante, y obtener un exopolisacárido precipitado.
- 10 Otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención de un exopolisacárido mediante una enzima dextransacarasa, en adelante procedimiento de obtención de un exopolisacárido enzimático de la invención, donde se utiliza una enzima de actividad dextransacarasa de la invención.
- 15 Otro objeto de la invención lo constituye un exopolisacárido, en adelante exopolisacárido de la invención, que se obtiene por cualquiera de los procedimientos de obtención un exopolisacárido de la invención.
- Otro objeto de la invención lo constituye el uso del exopolisacárido de la  
20 invención, en adelante uso del exopolisacárido de la invención, como agente antiviral frente a virus de especies piscícolas, preferentemente salmónidos.
- Otro objeto de la invención lo constituye el uso del exopolisacárido de la  
25 invención para la elaboración de una composición farmacéutica veterinaria o alimentaria útil para la prevención o tratamiento de infecciones virales de especies piscícolas.
- Otro objeto de la invención lo constituye una composición veterinaria o  
30 alimentaria útil para la prevención o tratamiento de infecciones virales de especies piscícolas, en adelante composición de la invención, que comprende un exopolisacárido de la invención.

### Descripción detallada

La presente invención se basa en la identificación de una nueva enzima con actividad dextransacarasa, obtenida a partir que una nueva cepa de *Lactobacillus sakei* aislada de productos cárnicos (ver Ejemplo 1), que puede ser utilizada en un procedimiento para producir un exopolisacárido (ver Ejemplo 4), que sorprendentemente se ha observado que presenta actividad antiviral frente a virus de especies piscícolas (ver Ejemplo 7). La detección de la producción del exopolisacárido por la cepa bacteriana de la invención en placas conteniendo sacarosa indica que el enzima de secuencia SEQ ID NO: 5, que es responsable de la síntesis u obtención de dicho exopolisacárido, es una dextransacarasa.

Las ventajas técnicas de la invención se describen a continuación:

- 15 a) con respecto al procedimiento de obtención y purificación del exopolisacárido:
- resulta económico, sencillo y presenta un alto rendimiento (2 g L<sup>-1</sup> de cultivo);
- b) con respecto al exopolisacárido:
- 20 - no presenta toxicidad en líneas celulares de peces,
- posee una elevada solubilidad en agua (superior a 10 mg mL<sup>-1</sup>),
  - posee un alto grado de pureza (superior al 95%),
  - posee una elevada masa molecular (superior a 2 x 10<sup>6</sup> Da);
- c) con respecto al uso como antivírico del exopolisacárido:
- 25 - presenta un efecto antiviral *in vitro* frente a VNHI significativamente superior al que producen otros dextrans producidos por otras bacterias lácticas y algún dextrano comercial,
- su alta solubilidad permite una fácil administración a través de la incorporación como aditivos en alimentos funcionales para los peces o como
- 30 productos veterinarios.

Las técnicas de cultivo en medio sólido permiten el crecimiento de determinadas bacterias. Más concretamente, la utilización de productos cárnicos, medios de cultivo CDM y sacarosa y el uso de microscopia electrónica de transmisión, han permitido el crecimiento de determinadas colonias mucosas bacterianas en dichos medios, la detección de productos derivados de su metabolismo como exopolisacáridos y la identificación de la bacteria de la invención (ver Ejemplo 1 y Figura 1).

Por el término “exopolisacárido” se entiende un polímero compuesto de subunidades mayoritariamente monosacáridicas secretado por un organismo.

Por el término “medio de cultivo” se entiende un alimento sólido o líquido conteniendo los nutrientes requeridos para el crecimiento de la bacteria.

Por el término “sacarosa” se entiende un disacárido  $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1-2)- $\beta$ -D-fructofuranósido.

Por el término “dextransacarasa o DsrLS” se entiende un enzima capaz de catalizar la síntesis de un exopolisacárido utilizando sacarosa como sustrato.

Como punto de partida de la presente invención, se sitúa en primer lugar una secuencia de nucleótidos, en adelante secuencia de nucleótidos de la invención, caracterizada por que se corresponde con la secuencia SEQ ID NO: 4.

La secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 4 del gen *dsrLS* de la cepa *Lactobacillus sakei* MN1 con CECT 8329 es sustancialmente diferente a los genes de otras bacterias incluyendo el gen *gtfKg15* (Kralj, van Geel-Schutten, Dondorff, Kirsanovs, van der Maarel y Dijkhuizen (2004) Microbiology 150:3681-3690) de la cepa productora de dextrano *Lactobacillus sakei* Kg15.

Una realización particular la constituye cualquier secuencia de nucleótidos que comprende una identidad del 80% con la secuencia de nucleótidos SEQ ID

NO: 4 y que codifica una enzima dextransacarasa útil para la obtención de exopolisacáridos.

Es de esperar que la identidad global de los genes que codifican una enzima dextransacarasa útil para la obtención de exopolisacáridos, sea igual o mayor de un 50%, y más concretamente al nivel de la secuencia polinucleotídica correspondiente a la SEQ ID NO: 4 sea del 80% o mayor. Además, el grado de identidad o la homología existente entre las secuencias de aminoácidos de la invención y otras secuencias de aminoácidos pueden determinarse por métodos conocidos en estado de la técnica.

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

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos idénticos entre dos polinucleótidos que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLASTP o BLASTN, ClustalW y FASTA. Puesto que dos proteínas se consideran homólogas si tienen el mismo origen evolutivo, en general, se asume que valores superiores de similitud o identidad del 80% indican estructuras homólogas. Podemos considerar, por tanto, que porcentajes de identidad de, al menos, un 80% mantendrán las mismas propiedades de dicho polipéptido.

Con la información suministrada en la presente invención un experto en la materia es capaz de identificar secuencias de nucleótidos homólogas a las descritas en la presente invención. Por tanto, la secuencia de nucleótidos de la invención, constituye la secuencia codificante de cualquier variante modificada

con las características anteriormente descritas, cuya secuencia de nucleótidos se corresponde a:

- a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada o en su cadena complementaria,
  - 5 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar con una secuencia polinucleotídica de (a), o
  - c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de (a) y/o (b) debido a la degeneración del código genético.
- 10 Otro objeto de la invención la constituye un vector de expresión tipo procariota o eucariota, en adelante vector de expresión de la invención, que comprende la SEQ ID NO: 4, o una secuencia de nucleótidos caracterizada por que presenta una Identidad del 80% con la SEQ ID NO: 4 y que codifica una enzima dextransacarasa útil para la obtención de exopolisacáridos.
- 15 Una realización particular de la invención la constituye el vector de expresión de la invención, que comprende la SEQ ID NO: 6.
- Una realización particular del vector procariota se refiere al vector de expresión
- 20 de la invención constituido por el plásmido denominado pMN1, en adelante plásmido de la invención, presente en la cepa bacteriana de la invención (cepa *Lactobacillus sakei* MN1 con CECT 8329) y detectado mediante la técnica de hibridación de Southern. El plásmido es portador del gen *dsrLS* y se caracteriza por poseer una masa molecular de 15 kDa y un replicón caracterizado por comprender la SEQ ID NO: 6 y que incluye los genes *repA* y *repB*. Sus
- 25 productos génicos RepA y RepB se caracterizan por comprender las secuencias SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, y están implicados en la replicación del plásmido.
- 30 El replicón de pMN1 es sustancialmente diferente de otros replicones plasmídicos y pertenece a la familia del plásmido pUCL287 (Benachour, Frère, Flahaut, Novel y Auffray (1997) Mol. Gen. Genet. 255: 504-513).

Por el término “replicón” se entiende la región mínima requerida para la replicación del plásmido e incluye el origen de replicación y los genes que codifican las proteínas RepA y RepB.

- 5 La secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 4 de la invención puede obtenerse a partir de la cepa bacteriana de la invención o de otras cepas bacterianas por procedimientos biotecnológicos de obtención y síntesis de secuencias de nucleótidos ampliamente conocidos en el estado de la técnica, así como secuencias de nucleótidos de elevada homología a la secuencia de nucleótidos  
10 de la invención que codifiquen enzimas con actividad dextransacarasa.

El análisis de secuencias de varios nucleótidos de genes codificantes de dextransacarasas bacterianas, permite la detección de una región conservada en la secuencia codificante del centro catalítico de las enzimas que permite el  
15 diseño de oligonucleótidos que se utilizan para amplificar fragmentos de ADN y detectar genes *dsr*. Concretamente, el uso de una preparación de ADN genómico o de ADN plasmídico de la cepa bacteriana de la invención permite el diseño de los oligonucleótidos *dsrF* y *dsrR* que pueden ser utilizados para detectar genes *dsr*.

20

En bacterias lácticas – por ejemplo, bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* y preferentemente *Lactobacillus plantarum* MMB2 y *Leuconostoc mesenteroides* RTF10- podrían identificarse estas secuencias mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- 25 i. obtener preparaciones de ADN genómico de la bacteria objeto de estudio;
- ii. generar un amplicón utilizando el oligonucleótido *dsrF* que comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 y el oligonucleótido *dsrR* que comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 y los ADN obtenidos en (i) mediante la reacción de  
30 polimerización en cadena;
- iii. determinar la secuencia de nucleótidos del amplicón;
- iv. fraccionar los ADN obtenidos en (i) en gel de agarosa;

- v. transferir los ADN fraccionados en (iv) a una membrana, y
- vi. realizar una hibridación de Southern utilizando los amplicones generados en (ii).

- 5 Otro objeto de la invención lo constituye una enzima con actividad dextranacarasa útil para la obtención de un exopolisacárido, en adelante enzima dextranacarasa de la invención, que está codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención, o por una secuencia de nucleótidos caracterizada por que presenta una identidad del 80% con la SEQ ID NO: 4.
- 10 Otra realización particular de la invención la constituye la enzima dextranacarasa de la invención constituida por la SEQ ID NO: 5.

Otro objeto de la invención lo constituye una célula útil para obtener exopolisacáridos, en adelante célula de la invención, que comprende una  
15 secuencia de nucleótidos de la invención, preferentemente la SEQ ID NO: 4, o un vector de expresión de la invención.

Otro objeto particular lo constituye la célula de la invención que se corresponde con una cepa *Lactobacillus sakei* con capacidad para producir un  
20 exopolisacárido, preferentemente una cepa bacteriana *Lactobacillus sakei* que se aísla de fiambre de magro de cerdo.

Otra realización particular de la invención lo constituye la célula de la invención que se corresponde con la cepa *Lactobacillus sakei* MN1 con CECT 8329. Esta  
25 cepa bacteriana *Lactobacillus sakei* MN1 ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 8329) siguiendo el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes, en fecha 22 de abril de 2013.

30 Estas células son útiles herramientas biotecnológicas para la producción del vector de expresión de la invención así como de la proteína de SEQ ID NO: 5 de la invención.

Otro objeto de la invención lo constituye el uso de la célula de la invención para la obtención de una enzima con actividad dextransacarasa que comprende la SEQ ID NO: 5.

- 5 Otro objeto de la invención lo constituye el uso de la célula de la invención en un procedimiento útil para la obtención de un exopolisacárido.

Otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención de un exopolisacárido celular, en adelante procedimiento de obtención de un  
10 exopolisacárido celular de la invención, donde se usa la célula de invención y que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una bacteria *L. sakei* en medio de cultivo suplementado con al menos un azúcar, seleccionado de entre sacarosa y maltosa, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento del exopolisacárido;
- 15 b) eliminar las bacterias por centrifugación y separar el sobrenadante;
- c) añadir un alcohol, preferentemente etanol, o una cetona, preferentemente acetona, para obtener un precipitado del exopolisacárido; y
- d) centrifugar el precipitado del paso (c) para eliminar el sobrenadante, y obtener un exopolisacárido precipitado.

20

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de obtención de un exopolisacárido de la invención celular que incluye una fase de purificación posterior a la etapa (d) y que comprende las siguientes etapas:

- i. resuspender el exopolisacárido precipitado según la etapa (d) en agua  
25 ultrapura;
- ii. someter al exopolisacárido a una diálisis utilizando membranas de 12-13 kDa, con cambios de agua; y
- iii. congelar a una temperatura entre -60 y -80 °C y liofilizar.

- 30 Otra realización particular de la invención la constituye el procedimiento de obtención de un exopolisacárido de la invención celular donde la cepa *L. sakei* de la etapa (a) es la cepa *Lactobacillus sakei* MN1 con CECT 8329.

Por el término “alcohol” se entiende una molécula que contiene un grupo hidroxilo unido a un radical alifático o a alguno de sus derivados.

5 Por el término “cetona” se entiende una molécula caracterizada por poseer un grupo funcional carbonilo unido a dos átomos de carbono.

Para el experto en la materia resultará obvio que el uso de la célula de la invención en el procedimiento de síntesis u obtención de la invención o de la enzima dextransacarasa de la invención, con las modificaciones pertinentes, 10 permitirá de igual manera la obtención de un exopolisacárido.

Para la obtención del dextrano (exopolisacárido), resulta necesaria la presencia de sacarosa (ver Figura 1A, derecha) en el medio de cultivo, ya que en ausencia de dicho azúcar las bacterias muestran un fenotipo no mucoso (ver 15 Figura 1A, izquierda).

En una realización preferida del procedimiento de obtención de exopolisacárido celular de la invención, se utiliza sacarosa como azúcar en la etapa (a), se añade etanol en la etapa (b) y se obtiene un exopolisacárido que es un dextrano (la eficiencia es buena, en cantidades superiores a  $2 \text{ g L}^{-1}$ , y tras el 20 proceso de purificación descrito se obtiene una cantidad de  $0,7 \text{ g L}^{-1}$ ).

Por el término “dextrano” se entiende un homopolisacárido formado por moléculas de glucosa unidas mediante enlaces  $\alpha$ -(1,6) en su cadena principal y con un bajo porcentaje de ramificación  $\alpha$ -(1,2),  $\alpha$ -(1,3) ó  $\alpha$ -(1,4). Ejemplo de un dextrano, aunque sin limitarse, es aquel que comprende cadenas 25 prácticamente lineales de  $\alpha$ -(1,6)-glucopiranososa (90%) con ramificaciones  $\alpha$ -(1,3) (10%) y una masa molecular superior a  $2 \times 10^6 \text{ Da}$ , y que presenta una gran diferencia de tamaño con otros productos de similar naturaleza como el dextrano comercial T2000 y el dextrano de *Lactobacillus sakei* MN1.

30 La caracterización del exopolisacárido obtenido a través del procedimiento de obtención de un exopolisacárido celular de la invención, presenta un espectro de infrarrojos en el que se observan dos bandas de absorción más intensa, una

a  $849\text{ cm}^{-1}$  y otra a  $916\text{ cm}^{-1}$ , ambas características de  $\alpha$ -anómeros, así como una composición exclusivamente compuesta por moléculas de glucosa. Adicionalmente, genera derivados parcialmente metilados y acetilados de un (1 $\rightarrow$ 6)-glucano con aproximadamente 10% de sustituciones en la posición O-3  
5 con cadenas laterales compuestas por un residuo único de glucosa.

Otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención de un exopolisacárido mediante una enzima dextransacarasa, en adelante procedimiento de obtención de un exopolisacárido enzimático de la invención,  
10 donde se utiliza una enzima de actividad dextransacarasa de la invención.

Otro objeto de la invención lo constituye el exopolisacárido, en adelante exopolisacárido de la invención, obtenido a través del procedimiento de obtención de la invención, ya sea celular o enzimático, donde preferentemente  
15 el exopolisacárido es un dextrano.

El exopolisacárido de la invención consigue un 50% de inhibición, frente a una dosis infectiva viral 50% ( $\text{TCID}_{50}\text{ mL}^{-1}$ ) de 1000, con un tiempo de infección de 3 días a  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  con VNPI, utilizando una concentración de  $1000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ . Estos  
20 resultados contrastan con los obtenidos con otros exopolisacáridos, ensayados en paralelo, como el dextrano comercial T2000 o el dextrano MMB2, que necesitan el triple y el doble de concentración, respectivamente, para obtener resultados iguales (Tabla 1).

Además, el exopolisacárido de la invención consigue un 50% de inhibición, frente a una dosis infectiva viral 50% ( $\text{TCID}_{50}\text{ mL}^{-1}$ ) de 1000, con un tiempo de infección de 7 días a  $20^{\circ}\text{C}$  con VNHI, utilizando una concentración de  $500\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ . Estos resultados contrastan con los obtenidos por otros dextranos como el comercial T2000 o el MMB2 que necesitan entre 1,5 y 10 veces más  
30 concentración, respectivamente, para obtener resultados iguales (Tabla 2).

Así, otro objeto de la invención lo constituye el uso del exopolisacárido de la invención, en adelante uso del exopolisacárido de la invención, como agente antiviral frente a virus de especies piscícolas, preferentemente salmónidos.

- 5 Ejemplos de especies piscícolas con aprovechamiento comercial, sobre las que puede ser de aplicación el exopolisacárido de la invención, son aunque sin limitarse, *Salmo trutta*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus aguabonita*, *Oncorhynchus clarkii henshawi*, *Oncorhynchus clarkii clarkii*, *Salmo salar*, *Psetta maxima*, *Argyrosomus regius*, *Sciaena umbra*, *Dicentrarchus labrax*,  
10 *Dicentrarchus punctatus* o *Sparus aurata*.

Por el término “agente antiviral” se entiende el compuesto o sustancia capaz de inhibir el ciclo de replicación viral.

- 15 Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso del exopolisacárido de la invención donde el virus pertenece a los géneros Birnavirus o Rhabdovirus, y preferentemente es el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) o el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI).
- 20 Otro objeto de la invención lo constituye el uso del exopolisacárido de la invención para la elaboración de una composición farmacéutica veterinaria o alimentaria útil para la prevención o tratamiento de infecciones virales de especies piscícolas.
- 25 Otro objeto de la invención lo constituye una composición farmacéutica veterinaria o alimentaria útil para la prevención o tratamiento de infecciones virales de especies piscícolas, en adelante composición de la invención, que comprende un exopolisacárido de la invención.
- 30 Otro objeto particular de la invención lo constituye la composición de la invención donde el virus pertenece a los géneros Birnavirus o Rhabdovirus, y

preferentemente es el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) o el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI).

5 El exopolisacárido de la invención puede utilizarse como un aditivo alimentario de los alimentos o piensos que se utilizan para la alimentación de los peces en piscifactorías, principalmente salmónidos, o elaborarse como composiciones farmacéuticas veterinarias para su administración para prevenir o tratar infecciones virales.

## 10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

### **Figura 1.- Identificación de una bacteria productora de exopolisacáridos. (A)**

Fotografía de las colonias de la cepa bacteriana de la invención, en adelante *L. sakei* MN1, crecidas en placas de medio definido CDM suplementadas con 0,8% glucosa (izquierda) o con 0,8% sacarosa (derecha) condición óptima para la producción de exopolisacárido. **(B)** Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión de las bacterias contenidas en las colonias mostradas en (A). Se muestran secciones ultrafinas de las bacterias teñidas con rojo de rutenio.

### 20 **Figura 2.- Detección de genes codificantes de dextransacarasas en bacterias lácticas mediante hibridación de Southern.**

Preparaciones de ADN plasmídico de *Leuconostoc mesenteroides* RTF10 (RTF10), *Lactobacillus plantarum* MMB2 (MMB2), *Lactobacillus sakei* MN1 (MN1) y de *Escherichia coli* V517 (C, estirpe utilizada como estándar de peso molecular, porque contiene varios plásmidos) teñidas con bromuro de etidio **(A)** o hibridadas con un fragmento de ADN de 696 pb, producto de amplificación del gen *dsrLS* con los oligonucleótidos *dsrR* y *dsrF* **(B)**. Se indica la migración electroforética, expresada en kilo pares de bases (kb), de los plásmidos presentes en la estirpe control *Escherichia coli* V517 y de los plásmidos de las bacterias lácticas detectados por hibridación y portadores de los genes codificantes de las enzimas productoras de dextrano.

5 **Figura 3.- Análisis de la producción de exopolisacárido por *L. sakei* MN1 durante su crecimiento en medio CDM.** Se muestra el crecimiento detectado espectrofotométricamente ( $DO_{600\text{ nm}}$ , ●) y los niveles de exopolisacárido (barras grises).

**Figura 4.- Caracterización fisicoquímica del dextrano producido por *L. sakei* MN1. (A)** Espectro de infrarrojos. **(B)** Tipo de enlaces deducidos por análisis de metilación. **(C)** Estructura del dextrano.

10 **Figura 5.- Análisis por resonancia magnética nuclear del dextrano producido por *L. sakei* MN1. (A)** Se muestra una comparación de los espectros 2D-DOSY del dextrano producido por MN1 (MN1) y del dextrano comercial T2000 (T2000). El alineamiento se realizó superponiendo los espectros y utilizando como referencia el agua deuterada ( $D_2O$ ) presente en las  
15 muestras. **(B)** Superposición de las proyecciones mostradas en (A) de las señales en la dimensión de difusión. Se indican los coeficientes de dispersión de MN1, T2000 y  $D_2O$ .

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones la palabra “comprende” y  
20 sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos o pasos. Para el experto en la materia, otros aspectos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

## 25 **MODO DE REALIZACION DE LA INVENCION**

Los siguientes ejemplos se incluyen con fines ilustrativos y no limitativos.

30 **EJEMPLO 1: Identificación y caracterización de la bacteria productora de exopolisacárido aislada de fiambre magro de cerdo denominada *L. sakei* MN1.**

### 1.1. Identificación

Para la identificación de bacterias productoras de exopolisacárido aisladas de productos cárnicos se utilizó la técnica de cultivo en medio sólido. Se realizó la siembra en placas de Petri conteniendo medio de cultivo CDM (Sánchez et al. (2008) Appl. Environ. Microbiol. 74:1136-1144) y agar al 1,5%, en el cual dichas bacterias generan colonias con aspecto mucoso. Los resultados indicaron que para que dicha detección tuviese lugar, fue necesaria la presencia de sacarosa (ver Figura 1A, derecha) en el medio de cultivo, ya que en ausencia de dicho azúcar las bacterias mostraron un fenotipo no mucoso (ver Figura 1A, izquierda). La producción fue confirmada mediante el análisis a nivel celular de las bacterias contenidas en las colonias por microscopía electrónica de transmisión (Notararigo et al. (2013) Carbohydr. Polym. 93:57-64). Sólo se detectó la presencia de moléculas de exopolisacárido asociadas a la pared bacteriana o rodeando las células en los cultivos crecidos en presencia de sacarosa (ver Figura 1B).

### 1.2. Caracterización

Las bacterias contenidas en las colonias fueron identificadas molecularmente mediante: (i) la extracción del ADN genómico; (ii) la amplificación del ADN codificante del ARNr 16S utilizando oligonucleótidos que contienen las secuencias flanqueantes conservadas; y (iii) la determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón (SEQ ID NO: 1). La caracterización fue realizada por la empresa SECUGEN S.L. (Madrid). Los resultados obtenidos permitieron determinar que la bacteria pertenecía al género *Lactobacillus* y a la especie *Lactobacillus sakei* y se la denominó *Lactobacillus sakei* MN1.

**EJEMPLO 2: Diseño de oligonucleótidos capaces de detectar genes codificantes de dextransacarasas, e identificación y caracterización del gen *dsrLS* de *L. sakei* MN1.**

## 2.1. Diseño de oligonucleótidos capaces de detectar genes codificantes de dextransacararas

La detección de la producción de EPS por *L. sakei* MN1 en placas conteniendo sacarosa indicaba que el enzima responsable de la síntesis era una dextransacarasa. Por este motivo se analizaron las secuencias de nucleótidos de 14 genes codificantes de dextransacararas bacterianas depositadas en el banco de datos GenBank del *National Center for Biotechnology* (NCBI, USA) utilizando el programa BLAST (NCBI, USA). La detección de una región conservada incluida en la secuencia codificante del centro catalítico de los enzimas permitió diseñar los oligonucleótidos dsrF (SEQ ID NO: 2) y dsrR (SEQ ID NO: 3), que fueron utilizados para amplificar un fragmento de ADN de 696 pb. Se empleó como molde una preparación de ADN genómico o de ADN plasmídico de *L. sakei* MN1 y el enzima *Phusion Hot Start High Fidelity Polymerase* (Finnzymes). Las condiciones de la reacción de amplificación fueron las siguientes: (i) una desnaturalización inicial de 30 segundos a 98 °C; (ii) 35 ciclos de desnaturalización 10 segundos a 98°C, hibridación 20 segundos a 64,4 °C y extensión 30 segundos a 72 °C; y (iii) una extensión final de 10 minutos a 72 °C. En las dos amplificaciones se detectó el amplicón esperado indicando que el gen poseía una localización plasmídica. Además, también se obtuvo el amplicón cuando se analizó el genoma de dos bacterias lácticas, *Lactobacillus plantarum* MMB2 y *Leuconostoc mesenteroides* RTF10, productoras de exopolisacáridos y aisladas de productos cárnicos. Estos resultados mostraron la utilidad de los oligonucleótidos dsrR y dsrF para detectar genes *dsr* de igual modo que los oligonucleótidos degenerados descritos por Kralj y cols. (Kralj, Van Geel-Schutten, Van der Maarel y Dijkhuizen (2003) *Biocatalysis and Biotransformation*, 21:181-187) utilizados para la detección de genes codificantes de dextransacararas de bacterias lácticas pertenecientes al género *Lactobacillus*. La determinación de la secuencia de nucleótidos de los tres amplicones reveló una identidad total de los genes de MMB2 y RTF10 y tan sólo una homología del 56,5% con su homónimo de MN1.

## 2.2. Identificación y caracterización

Se identificó y determinó la secuencia de nucleótidos del gen codificante de la dextranasa de *L. sakei* MN1. El gen fue denominado *dsrLS* y contuvo  
5 5.304 nucleótidos (SEQ ID NO: 1). También a partir de dicha secuencia se infirió la secuencia de 1.767 aminoácidos de la dextranasa DsrLS (SEQ ID NO:5). El análisis de dichas secuencias frente a aquellas depositadas en los bancos de datos del NCBI (USA) con el programa BLAST reveló homologías con otros genes bacterianos, mostrando la mayor homología con el gen *gtf1624*  
10 de *L. curvatus* TMW 1.624 (GenBank número de acceso HE972512.1) y su producto génico. Con respecto a la secuencia *gtf1624* de (5094 nt), presentó una diferencia de 215 nucleótidos y de 77 aminoácidos, respectivamente, con el gen y la proteína de *L. sakei* MN1. Dicha diferencia se situó entre las dos dextranasas en la región C-terminal. Por otro lado, el gen *dsrLS* y su  
15 producto de MN1 presentaron también elevada homología con el gen *gtfkg15* (Kralj, van Geel-Schutten, Dondorff, Kirsanovs, van der Maarel y Dijkhuizen (2004) Microbiology 150:3681-3690;) y el enzima codificado por él, sintetizado por *L. sakei* Kg15 productora de dextrano. La divergencia entre las moléculas de estas dos cepas fue de 525 nucleótidos y de 176 aminoácidos, de los  
20 cuáles, 26 se encontraron en la región N-terminal, 4 en la región central y 146 en la región C-terminal de la dextranasa. En consecuencia, la mayor divergencia de *dsrLS* con otras dextranasas estuvo localizada en el dominio C-terminal compuesto por regiones repetidas. Esta región parece estar implicada en la procesividad del enzima, al ser responsable de la unión de la  
25 proteína al dextrano sintetizado por ella.

### EJEMPLO 3: Identificación de los plásmidos portadores de los genes *dsr*

Con el objeto de determinar la localización de los genes *dsr* en los genomas de  
30 *L. sakei* MN1, *L. plantarum* MMB2 y *L. mesenteroides* RTF10, se procedió a realizar un análisis mediante la técnica de hibridación de Southern utilizando

preparaciones de ADN plasmídico (ver Figura 2) procedente de las tres bacterias lácticas.

El ADN plasmídico fue preparado a partir de cultivos crecidos a una densidad  
5 óptica de 1 medida a 600 nm. Las bacterias sedimentadas por centrifugación  
fueron concentradas 5 veces por resuspensión en una solución de sacarosa al  
25% conteniendo 30 mg mL<sup>-1</sup> de lisozima, 120 U mL<sup>-1</sup> de mutanolisina y 40 µg  
mL<sup>-1</sup> RNasa A. La lisis celular se obtuvo mediante una incubación de 15  
minutos a 37 °C. La desnaturalización del ADN cromosómico se realizó  
10 mediante un tratamiento de 7 minutos a temperatura ambiente con dodecil  
sulfato sódico al 2% y 0,13 N de hidróxido sódico. La eliminación del ADN  
cromosómico y de restos celulares se realizó por precipitación con acetato  
sódico 1 M a pH 4,8 y centrifugación a 15.700 x g durante 15 minutos a 4 °C. El  
ADN plasmídico, contenido en los sobrenadantes, fue concentrado por  
15 tratamiento con isopropanol al 42% y centrifugación a 15.700 x g durante 15  
minutos a 4 °C. Las formas circulares, y superenrolladas de los plásmidos  
presentes en los precipitados fueron purificadas y desproteínizadas por  
resuspensión en agua, adición de 1,8 M de acetato amónico, 0,12 mg mL<sup>-1</sup> de  
bromuro de etidio y una mezcla 1:1 de fenol:cloroformo/alcohol isoamílico  
20 (24/1) al 40% y centrifugación a 15.700 x g durante 10 minutos a temperatura  
ambiente. Los plásmidos contenidos en las fases acuosas fueron precipitados  
con etanol absoluto durante 12 horas a -20 °C y centrifugación a 11.269 x g  
durante 45 minutos a -10 °C, desecados y finalmente resuspendidos en 10 mM  
Tris pH 8,0, 1 mM EDTA.

25

Las preparaciones plasmídicas fueron fraccionadas en gel de agarosa al 0,7%.  
El método empleado para realizar la hibridación de Southern fue el previamente  
descrito para la detección de genes implicados en la síntesis de β-glucanos  
(Werning, Ibarburu, Dueñas, Irastorza, Navas, López, (2006) Journal of Food  
30 Protection 69:161-169), pero utilizando una temperatura de hibridación de 45  
°C. Como sonda para la hibridación se utilizó el amplicón obtenido con el ADN  
de *L. sakei* MN1 y los oligonucleótidos dsrF y dsrR. Se detectó hibridación con

las tres preparaciones plasmídicas, siendo crítica para la detección la temperatura de hibridación. En cada caso la banda detectada apareció localizada en una posición distinta (ver Figura 2B). La migración de las bandas de hibridación mostró correspondencia con plásmidos detectados por tinción del gel con bromuro de etidio (ver Figura 2A). La masa molecular de dichos plásmidos fue inferida por su migración y utilizando como referencia la de los plásmidos de la estirpe V517 de *Escherichia coli* (ver Figura 2A, carril C). Así, se detectaron plásmidos de 15 kb, 19 kb y 22 kb portadores del gen *dsr* en los genomas de *L. sakei* MN1, *L. plantarum* MMB2 y *L. mesenteroides* RTF10, respectivamente.

El plásmido de *L. sakei* MN1 fue denominado pMN1 y posteriormente caracterizado por la determinación de la secuencia de nucleótidos localizada corriente arriba del gen *dsrLS*. El análisis de la secuencia de una región de ADN de 1172 nt frente a aquellas depositadas en los bancos de datos del NCBI (USA) con el programa BLAST reveló homologías con los replicones de la familia del plásmido plásmido pUCL287 (Benachour, Frère, Flahaut, Novel y Auffray (1997) Mol. Gen. Genet. 255: 504-513), que replican por el mecanismo de tipo theta. Dicha región contiene el origen de replicación y los genes *repA* y *repB*, que codifican las proteínas RepA y RepB implicadas en la iniciación de la replicación del plásmido y en los mecanismos de partición, que son responsables de su estabilidad segregacional.

#### **EJEMPLO 4: Producción de EPS por *L. sakei* MN1.**

Para determinar la producción de EPS por *L. sakei* MN1, se cultivó la bacteria a 30 °C en medio Man Rogosa Sharpe (MRS, Pronadisa) con sacarosa al 2% hasta una densidad óptica de 1 medida a 600 nm y se realizó una dilución 1/100 de dicho cultivo en medio definido CDM suplementado con 0,8% de sacarosa. Se tomaron muestras cada hora, durante 8 horas, y se determinaron el crecimiento bacteriano y la producción de EPS (ver Figura 3). Para determinar la producción de EPS se eliminaron las células por centrifugación a

9.300 x g durante 10 minutos a 4 °C y a los sobrenadantes se les añadieron tres volúmenes de etanol absoluto para precipitar el EPS durante 12 horas a -20 °C. Posteriormente los sobrenadantes fueron centrifugados a 9.300 x g durante 20 minutos a 4 °C y lavados dos veces con etanol absoluto al 80 %.

5 Una vez secos, fueron resuspendidos en agua destilada estéril, calentados durante 10 minutos a 30 °C y cuantificados mediante el método del fenol-sulfúrico descrito por Dubois y colaboradores (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers y Smith (1956) Analytical Chemistry, 28:350-356). Los resultados pusieron de manifiesto que después de 8 horas *L. sakei* MN1 fue capaz de producir

10 cantidades de EPS superiores a 2 g L<sup>-1</sup>.

Para llevar a cabo una producción del compuesto, a gran escala y con un grado de pureza alto, se cultivó la bacteria a 30 °C en medio MRS con sacarosa al 2% hasta una densidad óptica de 1 medida a 600 nm y se realizó una dilución

15 1/100 de dicho cultivo en medio definido CDM con 0,8% de sacarosa. Cuando la densidad óptica fue de 1, se eliminaron las células por centrifugación a 16.000 x g durante 30 minutos a 4 °C y a los sobrenadantes se les añadió un volumen de etanol absoluto para precipitar el EPS durante 24 horas a 4 °C. Posteriormente, se centrifugaron a 10.651 x g durante 60 minutos a 4 °C para

20 eliminar el sobrenadante, y el EPS precipitado fue re-suspendido con agua ultrapura. Se realizó una diálisis de los EPS, durante 2 días, con varios cambios de agua usando membranas de 12-14 kDa. Se congelaron a -80 °C y se liofilizaron. En estas condiciones, la producción de exopolisacárido puro es de aproximadamente 0,7 g L<sup>-1</sup>.

25

**EJEMPLO 5: Caracterización fisicoquímica del EPS sintetizado por *L. sakei* MN1.**

Para llevar a cabo una caracterización del EPS sintetizado por *L. sakei* MN1,

30 según el ejemplo anterior se realizaron: (i) determinación de su espectro de infrarrojos, (ii) análisis de metilación del biopolímero y (iii) análisis de su

composición de monosacáridos tal y como se describe en Notararigo et al. (Notararigo et al. (2013) Carbohydr. Polym. 93:57–64).

Para obtener el espectro de infrarrojos, las muestras se analizaron mediante la técnica del KBr en un instrumento FTIR (espectrofotómetro de infrarrojos por transformada de Fourier) 4200 tipo A (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) en el rango de 400–4000  $\text{cm}^{-1}$ . El detector empleado fue del tipo sulfato de triglicocola con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ . En el espectro del EPS de MN1 (Fig. 4A), se observaron entre otras bandas de absorción, una a 849  $\text{cm}^{-1}$  y otra a 916  $\text{cm}^{-1}$ , ambas características de  $\alpha$ -anómeros.

10

Con el fin de determinar la composición de monosacáridos del biopolímero, se hidrolizó el EPS con ácido trifluoroacético (TFA) 3M durante 1 h a 121 °C. Los monosacáridos liberados se redujeron con  $\text{NaBH}_4$  y se acetilaron (Laine, Esselman y Sweeley (1972), Methods in Enzymology, 28:159-167). Los azúcares neutros fueron identificados y cuantificados mediante cromatografía de gases. El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un instrumento CG-EM 7980A-5975C de la casa Agilent, equipado con una columna HP-5MS (30m x 0,25 mm, 0,2  $\mu\text{m}$  espesor de la película), un inyector *split/splitless* y con helio como gas portador. Inyector y detector se programaron a una temperatura de 250 °C. El pico de cada azúcar en el cromatograma se identificó comparando su tiempo de retención con los de patrones analizados en idénticas condiciones. La cuantificación se realizó atendiendo al área de los picos y a los factores de respuesta obtenidos con diferentes monosacáridos patrón. Los resultados obtenidos mostraron que los dextranos producidos, tanto por *L. sakei* MN1 como por las otras dos bacterias lácticas, estaban compuestos exclusivamente por moléculas de glucosa.

15

20

25

30

El EPS producido por *L. sakei* MN1 fue metilado mediante el método de Ciucanu y Kerek (Ciucanu y Kerek (1984), Carbohydr. Res. 131:209-217, modificado por Needs y Selvendran (1993), Carbohydr. Res. 245:1-10). El EPS metilado se hidrolizó para obtener monosacáridos parcialmente metilados que se derivatizaron para dar lugar a sus correspondientes acetatos de alditol

parcialmente metilados. La reducción y acetilación se realizó según el método de Laine et al. (Laine, Esselman y Sweeley (1972), Meth. Enzymol. 28:159-167) con una única modificación que consiste en reducir con NaBD<sub>4</sub>. Los acetatos de alditol parcialmente metilados se analizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas en un instrumento Agilent 7980A-5975C 5 equipado con una columna HP-5MS (30m x 0,25mm, 0,2 μm espesor de la película), con helio. El inyector y la línea de transferencia se mantuvieron a 250 °C durante el análisis. La relación de split durante la inyección fue de 50:1. Cada uno de los picos del cromatograma se identificó mediante su tiempo de retención y su espectro de masas. La cuantificación se realizó atendiendo al 10 área de los picos (ver Figura 4B). El EPS producido por *L. sakei* MN1 generó derivados parcialmente metilados y acetilados de un (1→6)-glucano con aproximadamente 10% de sustituciones en la posición O-3 con cadenas laterales compuestas por un residuo único de glucosa. Ya que la banda correspondiente a los anómeros fue observada en el espectro de infrarrojo, 15 este polímero puede ser descrito como un polisacárido de tipo dextrano (ver Figura 4C).

Los resultados de los análisis indicados mostraron un polisacárido extracelular 20 constituido por cadenas prácticamente lineales de α-(1,6)-glucopiranososa (90%) con ramificaciones α-(1,3) (10%) denominado por sus características como dextrano.

**EJEMPLO 6: Comparación del dextrano producido por *L. sakei* MN1 y un 25 dextrano comercial a través de análisis de resonancia magnética nuclear.**

El tamaño molecular del dextrano producido por *L. sakei* MN1 y el dextrano comercial T2000 (Pharmacia fine chemicals AB Uppsala, Suecia) fue analizado por RMN mediante la técnica de DOSY (Espectroscopía de Difusión 30 Ordenada). Para ello, se disolvieron 15 mg de los polisacáridos en 0,5 mL de D<sub>2</sub>O. Los análisis de DOSY se realizaron con el protocolo estándar Bruker DOSY a 298 K con el programa de pulsos ledbpg2s en un espectrómetro

Bruker Avance 500 MHz. Treinta y dos espectros de protón (1H) monodimensionales (1D) fueron recogidos con un gradiente de duración de  $\delta=4$  ms y con un tiempo de eco de  $\Delta=400$  ms. En la Figura 5 puede observarse que existe una gran diferencia de tamaño entre el dextrano comercial T2000 y el dextrano de *L. sakei* MN1, ya que estos presentan unos logaritmos del coeficiente de difusión de -10,9 y -12,3, respectivamente. En consecuencia la masa molecular del dextrano producido por *L. sakei* MN1 es superior a  $2 \times 10^6$  kDa.

#### 10 **EJEMPLO 7: Evaluación *in vitro* de los dextranos como antivirales frente a virus de salmónidos.**

Se realizó una evaluación *in vitro* frente a virus de salmónidos sobre cultivos celulares infectado utilizando varios dextranos purificados a partir de sobrenadantes de cultivos de *L. sakei* MN1 (MN1), *L. plantarum* MMB2 (MMB2) y *L. mesenteroides* RTF10 (RTF10), así como del dextrano comercial T2000 (Farmacia fine chemicals AB Uppsala, Suecia). Asimismo, se eligieron las líneas celulares BF-2 (ATCC CRL 1681) obtenida de *Lepomis macrochirus* y EPC (ATCC CRL-2872) obtenida de epiteloma papuloso de ciprínidos *Pimephales promelas*. Las células se cultivaron en medio de crecimiento Leibovitz (L15, Gibco, Invitrogen, Barcelona) a 25°C suplementado con 100 UI mL<sup>-1</sup> de penicilina, 100 µg mL<sup>-1</sup> de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina y 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco). Para el mantenimiento de la monocapa celular, se utilizó el mismo medio pero disminuyendo el porcentaje de suero fetal al 2%.

##### **7.1. Evaluación de la toxicidad de los dextranos utilizados**

Se determinó la viabilidad celular de las líneas celulares BF-2 y EPC, tratadas y sin tratar, por ensayos colorimétricos según el método de Renault y cols. (Renault, Torchy y Kinkelin (1991) Dis. Aquat. Org. 10:23–29). A monocapas confluentes de células BF-2 y EPC, creciendo en placas de plástico desechable

de 96 pocillos, se les retiró el medio de crecimiento y se reemplazó por diferentes concentraciones (desde  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  hasta  $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de los dextranos diluidos en medio de mantenimiento. A los controles de células se les añadió el mismo volumen de medio de mantenimiento sin compuesto. Las  
5 placas se incubaron a  $20^\circ\text{C}$  durante 3 días (células BF-2) ó 7 días (células EPC). Posteriormente, se eliminó el medio de cultivo y se tiñeron las monocapas con una solución de cristal violeta al 1% (w/v) en etanol durante 10 min. Tras lavado y secado al aire se midió la absorbancia en un lector de  
10 microplacas (Bio-Rad®) a 590 nm. Los resultados se presentan como porcentajes de células supervivientes, donde el 100% representa la absorbancia de las células control. A la concentración citotóxica del compuesto que ocasionó un 50% de inhibición del crecimiento celular se le denomina  $\text{CT}_{50}$ . Los resultados obtenidos revelaron que la  $\text{CT}_{50}$  para todos los dextranos  
15 ensayados era mayor que  $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

15

## **7.2. Estudio de la Inhibición de efectos citopáticos de los virus y determinación de dosis inhibitoria 50**

Para evaluar la capacidad antiviral de los dextranos se utilizaron dos virus  
20 procedentes de la colección Norteamericana ATCC. Estos virus fueron un Birnavirus (Virus de la necrosis pancreática infecciosa, VNPI, ATCC VR1318) y un Rhabdovirus (virus de la necrosis hematopoyética infecciosa, VNHI, ATCC VR714). Para el cultivo y la propagación de los virus a ensayar las células, a las 24 horas de su siembra y con una monocapa semiconfluente, fueron  
25 infectadas con una dosis infectiva viral 50% ( $\text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ ) de 1000. Con esta dosis una infección de 3 días a  $15^\circ\text{C}$  con VNPI y de 7 días a  $20^\circ\text{C}$  con VNHI conllevó unos efectos citopáticos (ECP) producidos por los virus que afectaron a toda la monocapa celular y provocaron una lisis total (control virus, CV). Después de las incubaciones de las células en presencia de los virus, se  
30 recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron a baja velocidad ( $900 \times g$ ) durante 5 minutos para eliminar los restos celulares y se repartieron alícuotas de la suspensión de virus en criotubos que se conservaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su

utilización. El título infectivo del pase de virus se determinó calculando la TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>.

La actividad antiviral de los dextranos ensayados se determinó por la capacidad de estos para inhibir los ECP de los virus y proteger la monocapa celular y se calculó mediante la determinación del porcentaje de células viables. Brevemente, se infectaron células BF-2 y EPC (aproximadamente 10<sup>5</sup> mL<sup>-1</sup>) cultivadas en placas de 48 pocillos con una TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup> de virus de 1000 y diferentes concentraciones (de 10 a 5000 µg mL<sup>-1</sup>) de los dextranos diluidos en el medio de mantenimiento de las líneas celulares. Los cultivos se incubaron a las temperaturas óptimas para cada virus. Las monocapas se observaron diariamente al microscopio y, cuando los efectos citopáticos (ECP) en las células infectadas y no tratadas fueron totales (4+ ó un 100 % de afectación de la monocapa celular), se determinó el porcentaje de células supervivientes mediante tinción con cristal violeta. Los resultados obtenidos respecto a los ECP y a los porcentajes de células supervivientes (% inhibición) se muestran en las Tablas 1 y 2. Todos los dextranos ensayados mostraron una actividad antiviral similar frente al virus VNPI, requiriéndose una concentración de 1000 (MN1 y RTF10), 2000 (MMB2) o 3000 (T2000) µg mL<sup>-1</sup> para obtener un 50% de inhibición (Tabla 1). Sin embargo, frente al virus VNHI el dextrano producido por *L. sakei* MN1 mostró la mayor actividad antiviral obteniéndose una inhibición del 50% con una concentración de tan sólo 500 µg mL<sup>-1</sup> (Ver Tabla 2). Esta potente inhibición no se detectó con el dextrano T2000, ya que se requirió una concentración 10 veces superior (5000 µg mL<sup>-1</sup>) para obtener el mismo efecto. Este hecho podría ser debido a la elevada masa molecular del dextrano purificado a partir de los sobrenadantes de MN1.

**Tabla 1. Actividad antivírica de dextranos frente a VNPI en células BF-2.**

$\mu\text{g mL}^{-1}$	MN1		MMB2		RTF10		T 2000	
	ECP <sup>1</sup>	% Inhibición <sup>2</sup>						
5000	0	100	+ -	75	0	100	+ -	75
4000	0	100	+ -	75	0	100	+ -	75
3000	0	100	+ -	75	+ -	75	2+	<b>50</b>
2000	+ -	75	2+	<b>50</b>	+	75	3+	25
1000	2+	<b>50</b>	3+	25	2+	<b>50</b>	3+	25
750	3+	25	3+	25	3+	25	4+	0
500	3+	25	4+	25	3+	25	DT	0
250	4+	0	DT	0	4+	0	DT	0
100	DT	0	DT	0	DT	0	DT	0
50	DT	0	DT	0	DT	0	DT	0
10	DT	0	DT	0	DT	0	DT	0
0	DT	0	DT	0	DT	0	DT	0

<sup>1</sup>ECP: DT, destrucción total de la monocapa. Los valores desde 4+ hasta 0 indican una gradación desde todas las células infectadas hasta la falta de infección.

<sup>2</sup>El efecto inhibitorio de los dextranos (% de inhibición) representa el porcentaje de células supervivientes a la infección con el virus VNHI. El 100% representa la absorbancia de las células control no infectadas y tratadas del mismo modo que las células infectadas (control células) y el 0% corresponde a las células infectadas con virus y sin tratamiento.

15

20

**Tabla 2. Actividad antivírica de dextranos frente a VNHI en células EPC.**

$\mu\text{g mL}^{-1}$	MN1		MMB2		RTF10		T2000	
	ECP <sup>1</sup>	% Inhibición <sup>2</sup>						
5000	0	100	+ -	75	0	100	2+	<b>50</b>
4000	0	100	+ -	75	0	100	3+	25
3000	0	100	+ -	75	0	100	3+	25
2000	+ -	75	+	75	0	100	4+	25
1000	+	75	2+	<b>50</b>	+ -	100	4+	25
750	+	75	3+	25	2+	<b>50</b>	4+	0
500	2+	<b>50</b>	3+	25	3+	25	DT	0
250	3+	25	4+	25	3+	25	DT	0
100	3+	25	DT	0	4+	25	DT	0
50	4+	25	DT	0	DT	0	DT	0
10	DT	0	DT	0	DT	0	DT	0
0	DT	0	DT	0	DT	0	DT	0

<sup>1</sup>ECP: DT, destrucción total de la monocapa. Los valores desde 4+ hasta 0 indican una gradación desde todas las células infectados hasta la falta de infección.

<sup>2</sup>El efecto inhibitorio de los dextranos (% de inhibición) representa el porcentaje de células supervivientes a la infección con el virus VNHI. El 100% representa la absorbancia de las células control no infectadas y tratadas del mismo modo que las células infectadas (control células) y el 0% corresponde a las células infectadas con virus y sin tratamiento.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Una secuencia de nucleótidos caracterizada por que se corresponde con la secuencia SEQ ID NO: 4.
- 5
- 2.- Una secuencia de nucleótidos caracterizada por que presenta una identidad del 80% con la secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1 y por que codifica una enzima dextransacarasa útil para la obtención de exopolisacáridos.
- 10
- 3.- Vector de expresión tipo procariota o eucariota caracterizado por que comprende una secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2.
- 4.- Vector de expresión según la reivindicación 3 caracterizada por que comprende la secuencia SEQ ID NO: 6.
- 15
- 5.- Una enzima con actividad dextransacarasa útil para la obtención de un exopolisacárido, caracterizada por que está codificada por una secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2.
- 20
- 6.- Una enzima con actividad dextransacarasa según la reivindicación 5 caracterizada por que está constituida por la SEQ ID NO: 5.
- 7.- Una célula caracterizada por que comprende una secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 2 o un vector de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4.
- 25
- 8.- Una célula según la reivindicación 7 caracterizada por que se corresponde con una cepa *Lactobacillus sakei* con capacidad para producir un exopolisacárido.
- 30

- 9.- Una célula según la reivindicación 8, caracterizada por que la cepa bacteriana *Lactobacillus sakei* se aísla de fiambre de magro de cerdo.
- 10.- Una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a la 9  
5 caracterizada por que se corresponde con la cepa *Lactobacillus sakei* MN1 con CECT 8329.
- 11.- Uso de una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a la 10 para la obtención de una enzima con actividad dextransacarasa según una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6.
- 10
- 12.- Uso de una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a la 10 en un procedimiento útil para la obtención de un exopolisacárido.
- 13.- Procedimiento de obtención de un exopolisacárido según la reivindicación  
15 12 caracterizado por que la célula es una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a la 10 y por que comprende las siguientes etapas:
- a) cultivar una bacteria *L. sakei* en medio de cultivo suplementado con al menos un azúcar, seleccionado de entre sacarosa y maltosa, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento del exopolisacárido;
  - 20 b) eliminar las bacterias por centrifugación y separar el sobrenadante;
  - c) añadir un alcohol o una cetona para obtener un precipitado del exopolisacárido; y
  - d) centrifugar el precipitado del paso (c) para eliminar el sobrenadante, y obtener un exopolisacárido precipitado.
- 25
- 14.- Procedimiento de obtención de un exopolisacárido según la reivindicación 13, caracterizada por que incluye una fase de purificación posterior a la etapa (d) que comprende las siguientes etapas:
- i.- resuspender el exopolisacárido precipitado según la etapa (d) en agua  
30 ultrapura;
  - ii.- someter al exopolisacárido a una diálisis utilizando membranas de 12-13 kDa, con cambios de agua; y

iii.- congelar a una temperatura entre -60 y -80 °C y liofilizar.

15.- Procedimiento de obtención de un exopolisacárido según una cualquiera de las reivindicaciones 13 y 14 caracterizado por que la cepa *L. sakei* de la etapa (a) es la cepa *Lactobacillus sakei* MN1 con CECT 8329.

16.- Procedimiento de obtención de un exopolisacárido según una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6 caracterizado por que utiliza una enzima de actividad dextransacarasa.

17.- Un exopolisacárido obtenido a través del procedimiento de obtención según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a la 16.

18. Un exopolisacárido según la reivindicación 17, caracterizado por que es un dextrano.

19.- Uso de un exopolisacárido según una cualquiera de las reivindicaciones 17 y 18 para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención o tratamiento de infecciones virales de especies piscícolas, preferiblemente salmónidos.

20.- Uso según la reivindicación 19 caracterizado por que el virus pertenece a los géneros Birnavirus o Rhabdovirus, y preferentemente es el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) o el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI).

21.- Composición farmacéutica veterinaria o alimentaria útil para la prevención o tratamiento de infecciones virales de especies piscícolas caracterizada por que comprende un exopolisacárido según una cualquiera de las reivindicaciones 17 y 18.

30

22.- Composición según la reivindicación 21 caracterizada por que el virus pertenece a los géneros Birnavirus o Rhabdovirus, y preferentemente es el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) o el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI).

FIGURA 1

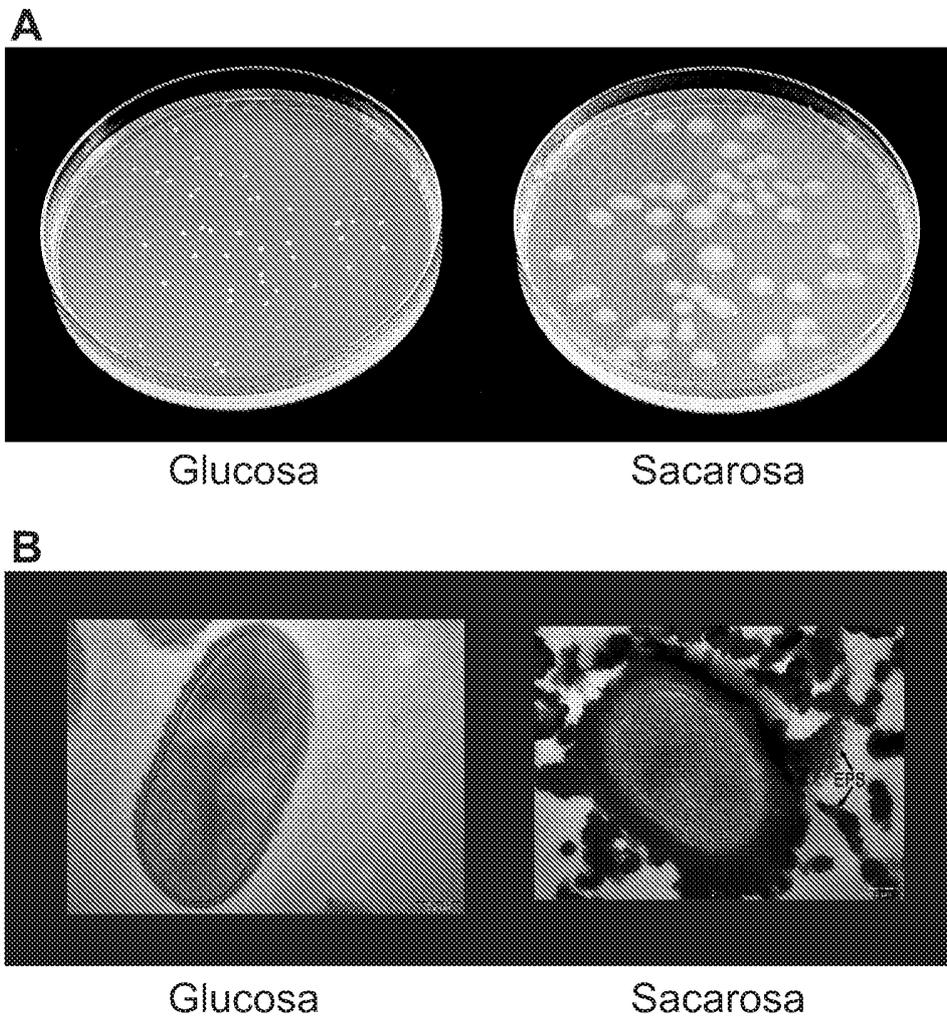


FIGURA 2

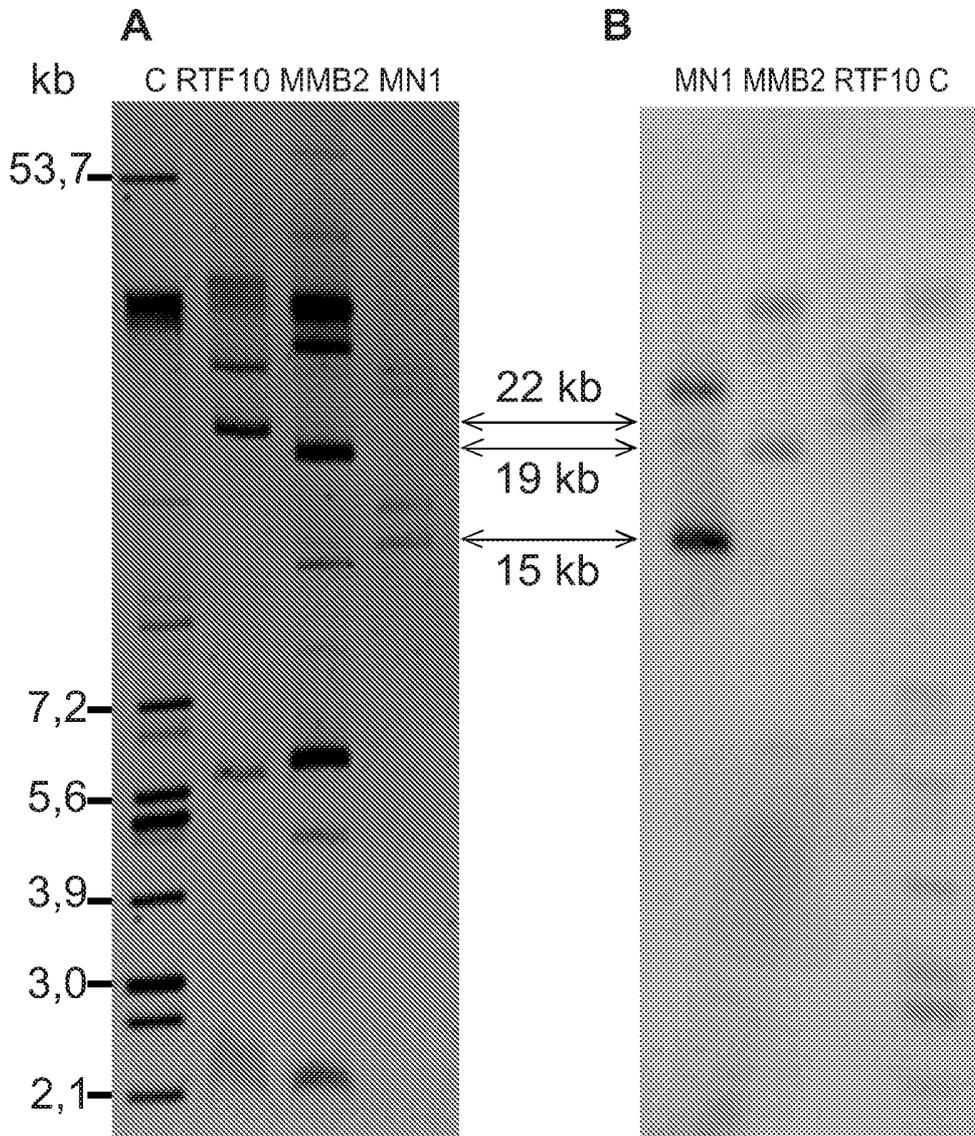


FIGURA 3

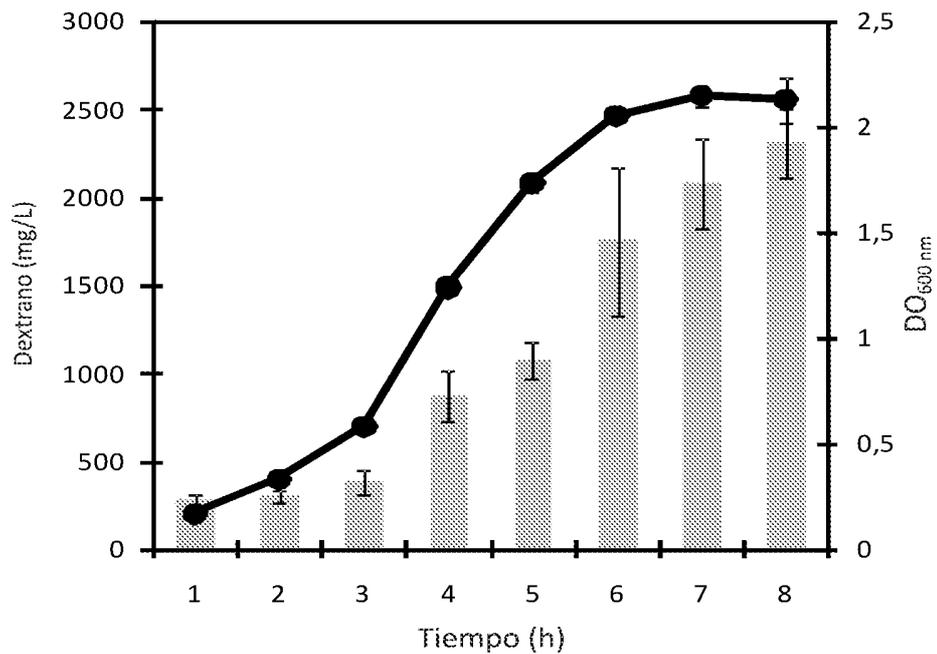
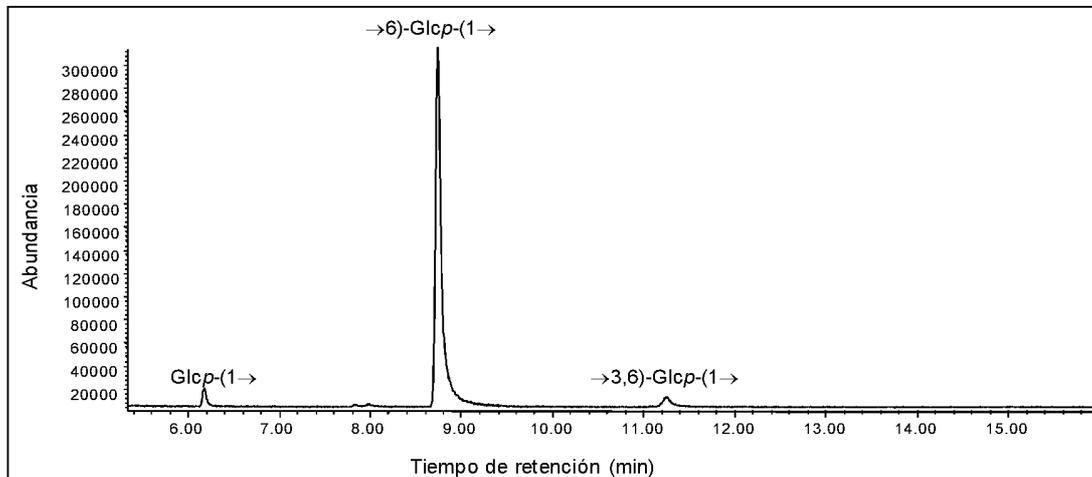
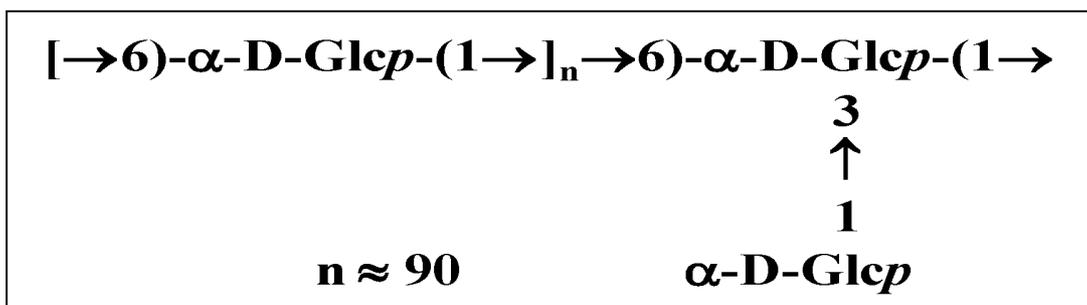


FIGURA 4

A



B



C

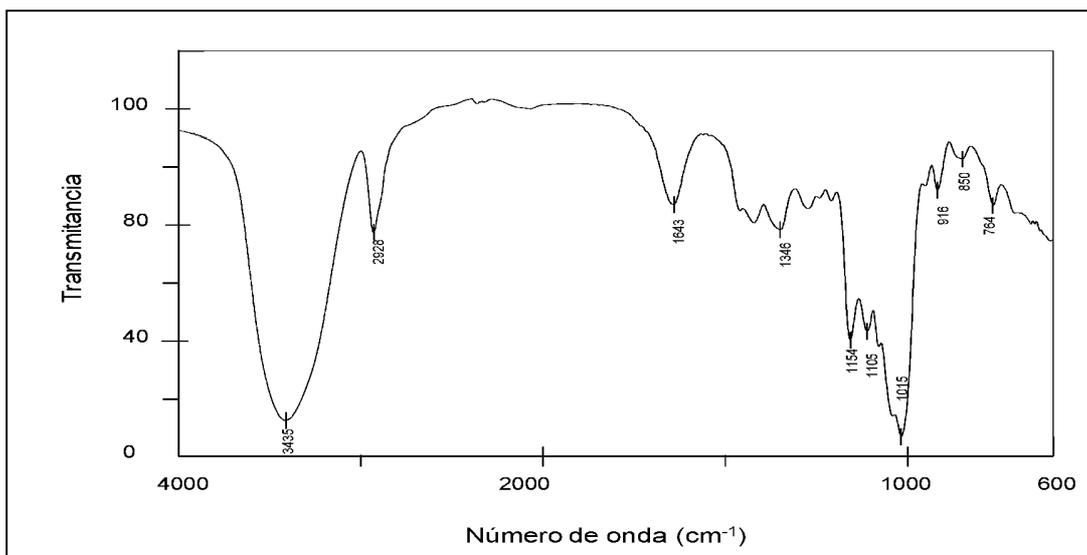
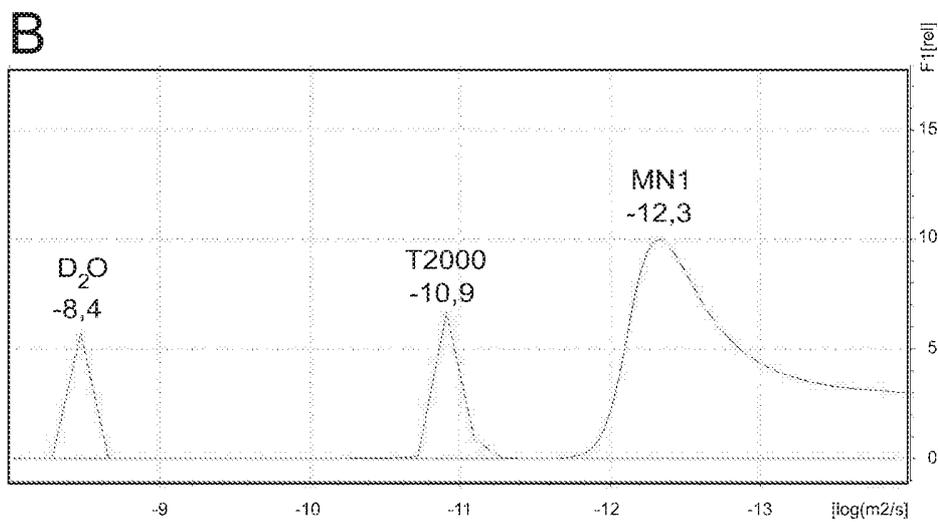
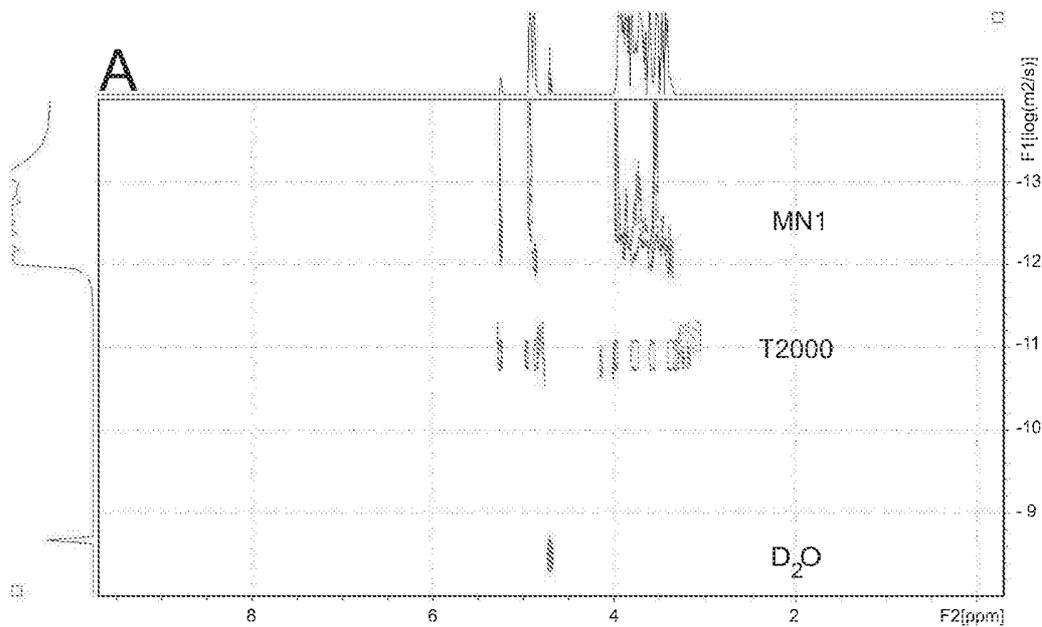


FIGURA 5



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070464

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**See extra sheet**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, C12P, A61K, A61P, C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, WPI, EBI SEQUENCE DATABASES, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03008618 A2 (TNO ET AL.) 30/01/2003, the whole document.	1-18
X	01/11/2004, KRALJ S ET AL. "Glucan synthesis in the genus Lactobacillus: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains". Microbiology, (2004), Vol: 150 No: Part 11, Pags: 3681 - 3690 , Doi: doi:10.1099/mic.0.27321-0, the whole document. Citado in the application.	1-18
X	CA 2079868 A1 08/08/1992, the whole document.	19-22
X	ES 2054622T T3 (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ET AL.) 16/08/1994, the whole document.	19-22

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search  
04/09/2014

Date of mailing of the international search report  
**(08/09/2014)**

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer  
M. Hernandez Cuellar

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498409

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/ES2014/070464

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2005209189 A1 (HERSHLINE ROGER) 22/09/2005, the whole document.	19-22
X	07/09/1995, NEYTS J ET AL. "Differential antiviral activity of derivatized dextrans"..Biochemical pharmacology (1995) Vol: 50 No: 6 Pags: 743 - 751, the whole document.	19-22
A	01/12/1998, VAN GEEL-SCHUTTEN G H ET AL. "Screening and characterization of Lactobacillus strains producing large amounts of exopolysaccharides". Applied Microbiology and Biotechnology, ( 1998),Vol: 50 No: 6 Pags: 697 - 703 Doi: doi:10.1007/s002530051353 , the whole document.	1-18

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070464

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO03008618 A2	30.01.2003	US2005059633 A1 NZ530638 A JP2005500839 A ES2345877T T3 EP1409708 A2 EP1409708 B1 DK1409708T T3 CA2454563 A1 AT466950T T	17.03.2005 27.01.2006 13.01.2005 05.10.2010 21.04.2004 05.05.2010 16.08.2010 30.01.2003 15.05.2010
-----			
US2005209189 A1	22.09.2005	US2009286757 A1 US7902174 B2 MX2007005275 A WO2006050381 A2 WO2006050381 A3 EP1814592 A2 CN101056657 A CA2585114 A1 US6821958 B1	19.11.2009 08.03.2011 11.03.2008 11.05.2006 12.04.2007 08.08.2007 17.10.2007 11.05.2006 23.11.2004
-----			
CA2079868 A1	08.08.1992	IE920400 A1 JPH05506671 A EP0527979 A1 WO9213524 A1 DE4121389 A1	12.08.1992 30.09.1993 24.02.1993 20.08.1992 13.08.1992
-----			
ES2054622T T3	16.08.1994	US5153181 A JPS62215529 A JPH0234926B B2 EP0232744 A2 EP0232744 A3 DE3789561T T2 AT104148T T DE3601136 A1 DE3601136 C2	06.10.1992 22.09.1987 07.08.1990 19.08.1987 10.05.1989 21.07.1994 15.04.1994 23.07.1987 18.10.1990
-----			

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070464

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C12N1/20* (2006.01)  
*C12N9/10* (2006.01)  
*C12P19/08* (2006.01)  
*C12P19/18* (2006.01)  
*A61K31/721* (2006.01)  
*A61P31/14* (2006.01)  
*C12R1/225* (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070464

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**Ver Hoja Adicional**

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12N, C12P, A61K, A61P, C12R

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, WPI, EBI SEQUENCE DATABASES, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	WO 03008618 A2 (TNO ET AL.) 30/01/2003, todo el documento.	1-18
X	KRALJ S ET AL. "Glucan synthesis in the genus Lactobacillus: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains". Microbiology, (2004), Vol: 150 No: Part 11, Pags: 3681 - 3690 ,Doi: doi:10.1099/mic.0.27321-0, todo el documento. Citado en la solicitud.	1-18
X	CA 2079868 A1 08/08/1992, todo el documento.	19-22
X	ES 2054622T T3 (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ET AL.) 16/08/1994, todo el documento.	19-22

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&amp;" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
04/09/2014

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**08 de septiembre de 2014 (08/09/2014)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
M. Hernandez Cuellar

Nº de teléfono 91 3498409

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070464

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	US 2005209189 A1 (HERSHLINE ROGER) 22/09/2005, todo el documento.	19-22
X	NEYTS J ET AL. "Differential antiviral activity of derivatized dextrans" Biochemical Pharmacology (1995) Vol: 50 No: 6, Págs: 743- 751, todo el documento.	19-22
A	VAN GEEL-SCHUTTEN G H ET AL. "Screening and characterization of Lactobacillus strains producing large amounts of exopolysaccharides". Applied Microbiology and Biotechnology, 1998), Vol:50 No: 6, Págs: 697 - 703 Doi: doi:10.1007/s002530051353, todo el documento.	1-18

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2014/070464

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO03008618 A2	30.01.2003	US2005059633 A1	17.03.2005
		NZ530638 A	27.01.2006
		JP2005500839 A	13.01.2005
		ES2345877T T3	05.10.2010
		EP1409708 A2	21.04.2004
		EP1409708 B1	05.05.2010
		DK1409708T T3	16.08.2010
		CA2454563 A1	30.01.2003
		AT466950T T	15.05.2010
		-----	-----
US2005209189 A1	22.09.2005	US2009286757 A1	19.11.2009
		US7902174 B2	08.03.2011
		MX2007005275 A	11.03.2008
		WO2006050381 A2	11.05.2006
		WO2006050381 A3	12.04.2007
		EP1814592 A2	08.08.2007
		CN101056657 A	17.10.2007
		CA2585114 A1	11.05.2006
		US6821958 B1	23.11.2004
		-----	-----
CA2079868 A1	08.08.1992	IE920400 A1	12.08.1992
		JPH05506671 A	30.09.1993
		EP0527979 A1	24.02.1993
		WO9213524 A1	20.08.1992
		DE4121389 A1	13.08.1992
-----	-----	-----	-----
ES2054622T T3	16.08.1994	US5153181 A	06.10.1992
		JPS62215529 A	22.09.1987
		JPH0234926B B2	07.08.1990
		EP0232744 A2	19.08.1987
		EP0232744 A3	10.05.1989
		DE3789561T T2	21.07.1994
		AT104148T T	15.04.1994
		DE3601136 A1	23.07.1987
		DE3601136 C2	18.10.1990
-----	-----	-----	-----

**CLASIFICACIONES DE INVENCION**

*C12N1/20* (2006.01)  
*C12N9/10* (2006.01)  
*C12P19/08* (2006.01)  
*C12P19/18* (2006.01)  
*A61K31/721* (2006.01)  
*A61P31/14* (2006.01)  
*C12R1/225* (2006.01)