República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0621581-5 A2**

BRPI0621581A2

(22) Data de Depósito: 19/04/2006
(43) Data da Publicação: 13/12/2011
(RPI 2136)

(51) Int.Cl.:
A61K 38/16
A61K 38/17
C07K 14/335
C07K 14/195
C12N 1/20

(54) Título: CEPAS DE ENTEROCOCCUS E STREPTOCOCCUS E BACTERIOCINAS

(73) Titular(es): State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, The UNited States Of America, As Represented By The Secretary Of Agriculture

(72) Inventor(es): Boris Eruslanov, Edward Svetoch, Eugeni Mitsevich, Irina Mitsevich, John Line, Norman Stern, Vladimir Levchuk, Vladimir Perelygin

(74) Procurador(es): Nellie Anne Daniel Shores

(86) Pedido Internacional: PCT US2006014938 de 19/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/120151de 25/10/2007

(57) Resumo: CEPAS DE ENTEROCOCCUS E STREPTOCOCCUS E BACTERIOCINAS. Esta invenção refere-se a bacteriocinas de Enterococcus e Streptococcus inusitadas produzidas por cepas de Enterococcus e Streptococcus inusitadas que são usadas para pelo menos reduzir os níveis de colonização em pelo menos uma bactéria-alvo em animais, especialmente aves.

PI0621581-5

"CEPAS DE ENTEROCOCCUS E STREPTOCOCCUS E BACTERIOCINAS"

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se ao controle de doenças em animais, especialmente aves, através do uso de cepas inusitadas de *Enterococcus* ou *Streptococcus* produtoras de bacteriocinas e/ou bacteriocinas inusitadas produzidas por estas cepas. Ela se refere também a inusitadas bacteriocinas, seqüências de aminoácidos das bacteriocinas inusitadas, cepas de *Enterococcus* ou *Streptococcus* produtoras das bacteriocinas inusitadas, e cepas indutoras de *Lactococcus*. Além disso, a invenção refere-se a composições terapêuticas que contêm as bacteriocinas inusitadas e/ou as cepas de *Enterococcus* ou *Streptococcus* que as produzem, e usos das composições terapêuticas.

DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS ANTERIORES

O consumo de produtos avícolas inadequadamente preparados resultou em doenças intestinais humanas. Há muito tempo foi reconhecido que *Salmonella* spp. são agentes causadores dessas doenças, e mais recentemente, *Campylobacter* spp., especialmente *Campylobacter jejuni*, também foi implicada. Ambos microorganismos podem colonizar tratos gastrointestinais de aves sem efeitos prejudiciais sobre as aves, e embora algumas aves colonizadas possam ser detectadas, os portadores assintomáticos podem disseminar livremente os microorganismos durante a produção e processamento, resultando em contaminação adicional de aves vivas e também carcaças. As aves servem como reservatório primário para *Salmonella* e *Campylobacter* no fornecimento de alimentos (Jones *et al., Jornal of Food Protection* 54(7):502-507 (julho de 1991)). A prevenção de colonização em aves vivas durante a produção em crescimento pode diminuir o problema da contaminação das aves.

Inúmeros fatores contribuem para a colonização e presença continuada de bactérias dentro do trato digestivo de animais. Estes fatores foram revisados extensivamente por Savage ("Progress in Food and Nitrition Science", volume 7, 65-74, 1983). Estão incluídos entre estes fatores: (1) acidez gástrica (Gilliland, *Journal of Food Production* 42:164-167 (1979); (2) sais biliares (Sharpe e Mattick, *Milchwissenschaft*, 12:348-349 (1967); Floch *et al., American Journal of Clinical Nutrition* 25:1418-1426 (1972); Lewis e Gorbach, *Archives of Internal Medicine* 130:545-549 (1972); Gilliand e Speck, *Journal of Food Protection* 40:820-823 (1977); Hugdahl *et al., Infection and Immunity* 56:1560-1566 (1988); (3) peristaltismo; (4) enzimas digestivas (Marmur, *Journal of Molecular Biology* 3:208-218 (1961); (5) resposta imune; e (6) microrganismos indígenas e os compostos antibacterianos que eles produzem. Os quatro primeiros fatores são dependentes do fenótipo do hospedeiro e podem não ser praticamente variáveis controláveis. A resposta imune no trato gastrointestinal é não modulada facilmente. Os fatores que envolvem microorganismos indígenas e seus metabólitos são dependentes da flora normal do trato gastrointestinal.

Uma abordagem potencial para controlar a colonização de *Campylobacter* e/ou *Salmonella* é através do uso de exclusão competitiva. Nurmi e Rantala (*Nature* 241:210-211 (1973)) demonstraram o controle eficaz de infecção por *Salmonella* por bactérias de gavagem de materiais intestinais de aves sadias para dentro de frangos jovens cuja microflora não foi estabelecida, contra a colonização de *Samonella*. A administração de preparações indefinidas de exclusão competitiva a frangos acelera a maturação da flora intestinal em aves recém-chocadas e proporciona um substituto para o processo natural de transmissão de microflora da galinha adulta pra sua prole. Os resultados de investigações de laboratório e campo comprovam os benefícios no controle de *Campylobacter* através da administração de microflora normal a frangos; freqüência diminuída de bandos infectados com *Campylobacter* (Mulder e Bolder (editores), Academic Press, San Diego, CA, 359-363 (1991) e níveis reduzidos de *Campylobacter jejuni* nas fezes de aves colonizadas foram relatados (Stern, *Poultry Science* 73:402-407 (1994)).

Schoeni e Wong (*Applied Environ. Microbiol.* 60:1191-1197 (1997)) relataram uma redução significativa na colonização de frangos de corte por *C. jejuni* através da aplicação de suplementos de carboidratos junto com três antagonistas identificados: *Citrobacter diversus* 22, *Klebsiella pneumoniae* 23, e *Escherichia coli* 25. Há evidência também de um decréscimo significativo de *C. jejuni* em amostras intestinais de frangos de corte infectados depois do tratamento com culturas de aves isoladas de *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus faecium* (Morishita *et al., Avian Diseases* 41:850:855 (1997)).

Snoeyenbos *et al.* (patente nº US 4.335.107, junho de 1982) desenvolveram uma técnica de microflora de exclusão competitiva para prevenir a colonização de *Salmonella* liofilizando gotejamentos fecais e cultivando esta preparação de forma anaeróbica. Mikola *et al.* (patente nº US 4.657.762, abril de 1987) usaram os conteúdos fecais e cecais intestinais como uma fonte de microflora de exclusão competitiva para impedir a colonização de *Salmonella*. Stern *et al.* (patente nº US 5.451.400, setembro de 1995, e patente nº US 6.241.335, abril de 2001) descrevem uma composição de exclusão competitiva de mucosa para proteção de aves e animais de criação contra colonizações por *Salmonella* e *Campylobacter*, onde a camada de mucina dos cecos pré-lavados é raspada e as raspagens são mantidas em um ambiente sem oxigênio, são cultivadas de forma anaeróbica. Nisbet *et al.* (patente nº US 5.478.557, dezembro de 1996) descrevem um probiótico definido que pode ser obtido a partir de uma série de animais domésticos, que é obtido por cultura contínua de uma cultura em lote produzida diretamente a partir de gotejamentos fecais, conteúdos do ceco e/ou do intestino grosso do animal-alvo adulto.

Os microorganismos produzem uma série de compostos que demonstram propriedades antibacterianas. Um grupo destes compostos, as bacteriocinas, consiste em proteínas bactericidas com um mecanismo de ação similar a antibióticos ionóforos. As bacteriocinas

são freqüentemente ativas contra espécies que estão intimamente relacionadas ao produtor. Sua ocorrência disseminada em espécies bacterianas isoladas a partir de comunidades microbianas complexas pode ter um papel regulador em termos de dinâmica populacional dentro de ecossistemas bacterianos. As bacteriocinas são definidas como compostos produzidos por bactérias que têm um grupamento protéico biologicamente ativo e ação bactericida (Tagg *et al., Bacteriological Reviews* 40:722-256 (1976)). Outras características podem incluir: (1) um espectro inibitório estreito de atividade centrada ao redor de espécies intimamente relacionadas; (2) anexação a receptores celulares específicos; e (3) determinantes genéticos carreados por plasmídeos da produção de bacteriocinas e de imunidade de bacteriocinas em células hospedeiras. Substâncias antagonísticas incompletamente definidas foram denominadas "substâncias semelhantes a bacteriocinas". Algumas bacteriocinas eficazes contra bactérias gram-positivas, em contraste com bactérias gram-negativas, têm espectro de atividade mais amplo. Foi sugerido que o termo bacteriocina, quando utilizado para descrever agentes inibidores produzidos por bactérias gram-positivas, devem atender aos critérios mínimos de (1) serem um peptídeo,, e (2) possuírem atividade antibacteriana (Tagg *et al.*, supra).

As bactérias do ácido lático estão entre os microorganismos probióticos mais importantes. Elas são organismos gram-positivos, catalase negativos e não-formadores de esporos isentos de citocromos. Elas são anaeróbicas, mas são tolerantes ao ar, fastidiosas, tolerantes a ácidos, estritamente fermentativas, sendo o ácido lático o subproduto mais importante da fermentação do açúcar. As bactérias produtoras de ácido lático incluem as espécies *Lactobacillus*, espécies *Bifidobacterium, Enterococcus faecalis, enterococcus faecium, lactococcus lactic, Srtreptococcus cricetus, Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus acidilactici, Sporolactobacillus inulinus, streptococcus thermophilus*, etc. Estas espécies são de particular interesse em termos de ocorrência disseminada de bacteriocinas dentro do grupo e estão também em amplo uso em todas indústrias processadoras de laticínios fermentados, alimentos e carnes. Seu papel na conservação e características de sabor dos alimentos foi bem documentado. A maioria das bacteriocinas produzidas por este grupo são ativas apenas contra outras bactérias do ácido lático, mas várias apresentam atividade antibacteriana contra mais bactérias gram-positivas filogeneticamente distantes, e sob certas condições, bactérias gram-negativas.

Os lactobacilos foram estudados extensivamente para a produção de antagonistas. Eles incluem as bacteriocinas bem caracterizadas (DeKlerk, *Nature* 214:609 (1967); Upreti e Hinsdill, *Antimicrob. Agents Chemother.* 7:139-145 (1975); Barefoot e Klaenhammer, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1808-1815 (1983); Joerger e Klaenhammer, *Journal of Bacteriology* 167:439-446 (1986)), substâncias semelhantes a bacteriocinas potenciais (Vincent *et al. Journal of Bacteriology* 78:479 (1959)), e outros antagonistas não necessariamente relacio-

nados a bacteriocinas (Vakil e Shahani, *Bacteriology*, Proc. 9, 1965; Hamdan e Mikolajcik, *Journal of Antibiotics* 78:631-636. Mikolajcik e Hamdan, *Cultured Diary Products* página 10, 1975; e Shahani *et al., Culturede Dairy Products*, 11:14-17 (1976)).

Klaenhammer (*FEMS, Microbiol. Rev.* 12:39-86 (1993)) classificou as bacteriocinas de bactérias do ácido lático conhecidas até hoje em quatro grupos principais:

Grupo I - Lantibióticos que são peptídeos pequenos de < 5 kDa, contendo os aminoácidos incomuns lantionina e β-metil-lantionina. Eles são de particular interesse pelo fato de que têm espectros de atividade muito amplos em relação a outras bacteriocinas. Os exemplos incluem nisina, nizina Z, carnocina U 149, lacticina 481, e lactocina 5.

Grupo II – Peptídeos pequenos que não contêm lantionina: um grupo heterogêneo de peptídeos pequenos de < 10 kDa. Este grupo inclui peptídeos ativos contra *Listeria* spp.

Grupo III – Proteínas grandes de > 30 kDa lábeis ao calor. Um exemplo é helveticina.

Grupo IV – Proteínas complexas bacteriocinas/proteínas contendo grupamentos adicionais tais como lipídeos e carboidratos.

Raczek (pedido de patente nº US 2002/0176910, publicado em 28 de novembro de 2002) descreve o uso de uma composição que contém microrganismos vivos ou mortos que secretam bacteriocinas, ou as bacteriocinas em si ou em combinação delas, para uso com rações para animais de criação agrícolas.

Várias espécies de *Enterococcus* e *Streptococcus* produtoras de bacteriocinas e suas bacteriocinas foram descritas nas técnicas afins. Entretanto, a presente invenção fornece composições inusitadas que contêm pelo menos uma cepa inusitada de uma *Enterococcus* ou *Streptococcus* e/ou pelo menos uma bacteriocina inusitada produzida pelas cepas inusitadas; um método para usar a cepa e/ou a bacteriocina, as cepas inusitadas, seqüências de aminoácidos para as bacteriocinas inusitadas, e métodos de uso, tudo diferente das cepas, bacteriocinas e métodos de uso das técnicas anteriores

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

É, portanto, um objeto da presente invenção fornecer pelo menos uma cepa inusitada de *Enterococcus* ou *Streptococcus* que produzem bacteriocinas inusitadas.

Um outro objeto da presente invenção é fornecer uma cepa inusitada de *Streptococcus cricetus* que tem as características identificadoras de NRRL B-30745.

Ainda outro objeto da presente invenção é fornecer uma cepa inusitada de *Enterococcus faecium* que tem as características identificadoras de NRRL B-30746.

Outro objeto da presente invenção é fornecer bacteriocinas inusitadas produzidas por cepas inusitadas de *Enterococcus* ou *Streptococcus*.

Ainda outro objeto da presente invenção é fornecer uma bacteriocina inusitada 50-52 que tem uma seqüência de aminoácidos como enunciada em SEQ ID NO: 1.

Ainda outro objeto da presente invenção é fornecer uma bacteriocina inusitada 760 que tem uma seqüência de aminoácidos como enunciada em SEQ ID NO: 2.

Um outro objeto da presente invenção é fornecer um método para pelo menos reduzir os níveis de colonização em pelo menos uma bactéria-alvo em animais, administrando ao animal uma composição terapêutica que inclui pelo menos uma cepa inusitada de *Enterococcus* ou *Streptococcus* que produz uma bacteriocina inusitada, pelo menos uma bacteriocina inusitada produzida por uma cepa inusitada de *Enterococcus* ou *Streptococcus*, ou uma combinação das cepas inusitada e/ou bacteriocinas inusitadas.

Ainda outro objeto da presente invenção é fornecer um método para pelo menos reduzir os níveis de colonização em pelo menos uma bactéria-alvo em animais, administrando ao animal uma composição terapêutica que inclui uma cepa inusitada de *Enterococcus* que tem as características identificadoras de NRRL Depósito nº B-30746, uma cepa inusitada de *Streptococcus* que tem as características identificadoras de NRRL Depósito nº B-307456, e misturas delas.

Ainda outro objeto da presente invenção é fornecer um método para pelo menos reduzir os níveis de colonização em pelo menos uma bactéria-alvo em animais, administrando ao animal uma composição terapêutica que inclui uma bacteriocina 50-52 inusitada que tem uma seqüência de aminoácidos como enunciada em SEQ ID NO: 1.

Ainda outro objeto da presente invenção é fornecer um método para pelo menos reduzir os níveis de colonização em pelo menos uma bactéria-alvo em animais, administrando ao animal uma composição terapêutica que inclui uma bacteriocina 760 inusitada que tem uma seqüência de aminoácidos como enunciada em SEQ ID NO: 2.

Outro objeto da presente invenção é fornecer um método para pelo menos reduzir os níveis de colonização em pelo menos uma bactéria-alvo em animais, administrando ao animal uma composição terapêutica que inclui uma bacteriocina produzida por uma cepa inusitada de *Enterococcus* que tem as características identificadoras de NRRL B-30746, uma cepa inusitada de *Streptococcus* que tem as características identificadoras de NRRL B-30745, e misturas delas.

Outro objeto da presente invenção é fornecer uma cepa indutora de *Lactococcus* que aumenta a produção de bacteriocinas por cepas produtoras.

Um outro objeto da presente invenção é fornecer uma cepa indutora de *Lactococcus lactis* que tem as características identificadoras de NRRL B-30744.

Ainda outro objeto da presente invenção é fornecer um método para aumentar a produção de bacteriocinas por cepas produtoras, onde as cepas produtoras são co-cultivadas com uma cepa indutora de *Lactococcus*.

Um outro objeto da presente invenção é fornecer um método para aumentar a produção de bacteriocinas por cepas produtoras, onde as ditas cepas produtoras são co-

cultivadas com uma cepa de *Lactococcus* que tem as características identificadoras de NRRL B-30744.

Ainda outro objeto da presente invenção é fornecer um método para purificar bacteriocinas, incluindo colher o fluido de cultura e as células como amostras separadas, isolar a bacteriocina que foi adsorvida sobre a superfície celular das cepas produtora e indutora por eluição com tampão de fosfato contendo cloreto de sódio, e em seguida, uma etapa de isolamento por cromatografia de troca iônica da bacteriocina em fluido de cultura por cromatografia de interação hidrofóbica.

Outros objetos e vantagens da invenção tornar-se-ão evidentes a partir da descrição que se segue.

Depósito de Microorganismos

Streptococcus cricetus, designada NRRL B-30745 (Cepa 760); *Enterococcus faecium*, designada NRRL B-30746 (Cepa 50-52); e *Lactococcus lactis*, designada NRRL B-30744 (Cepa 320) foram identificadas conforme as disposições do Tratado de Budapeste em 3 de maio de 2004 junto a Agricultural Research Service Patent Culture Collection (National Center for Agricultural Utilization Research, 1815 N. University Street, Peoria, Illinois 61604).

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As Figuras 1A-1B são fotografias que ilustram a detecção direta da bacteriocina 760 depois de SDS-PAGE (1A) e focagem isoelétrica (1B).

As Figuras 2A-2B são fotografias que ilustram a detecção direta da bacteriocina 50-52 depois de SDS-PAGE (2A) e focagem isoelétrica (2B).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A importância de infecções entéricas em humanos tem sido crescentemente bem reconhecida. A relação de contaminação de aves e infecção humana está bem documentada. A capacidade de diminuir este risco à saúde por intervenções em fábricas de processamento de aves também é bem conhecida. Durante a produção e processamento de frangos de corte, os materiais fecais que contêm patógenos são transferidos para cima da carne e persistem em cozinhas de processamento de alimentos.

Os metabólitos de organismos competidores podem contribuir para o controle de patógenos tais como *Campylobacter jejuni* e *Samonella*. As cepas antagonísticas inusitadas foram isoladas a partir das superfícies da mucosa do ceco e do papo de frangos de corte. Os componentes nativos dos antagonistas caracterizados são peptídeos de baixo peso molecular, bacteriocinas, que têm um amplo espectro de atividade antagonística.

A presente invenção fornece uma cepa inusitada de *Enterococcus*, uma cepa inusitada de *Streptococcus*, uma cepa inusitada de *Lactococcus*, bacteriocinas inusitadas, seqüências de aminoácidos das ditas bacteriocinas, composições terapêuticas que contêm as bacteriocinas e/ou cepas inusitadas que as produzem, e métodos para usar as composições

terapêuticas inusitadas. A presente invenção fornece também um método para a produção e purificação das bacteriocinas inusitadas.

Enterococcus faecium, NRRL B-30746, é um aeróbio facultativo com cocus gram-positivos, e é capaz de crescer a cerca de 37 °C. A cepa se desenvolve em nutriente ou ágar de contagem de placas, produzindo bordas com formato irregular. As colônias têm um diâmetro de cerca de 2 mm depois do cultivo microaerofílico por cerca de 24 horas a cerca de 37 °C.

Streptococcus cricetus, NRRL B-30745, é um aeróbio facultativo com cocus gram-positivos, e é capaz de crescer a cerca de 37 °C. A cepa se desenvolve em nutriente ou ágar de contagem de placas, produzindo bordas com formato regular. As colônias têm um diâmetro de cerca de 1 mm depois do cultivo microaerofílico por cerca de 24 horas a cerca de 37 °C.

A triagem de cepas de *Enterococcus* e *Streptococcus* isoladas para a produção de atividade de bacteriocinas é realizada sobre ágar nutriente semeado com diferentes bactérias-alvo de interesse. Outras cepas em teste são cultivadas sob condições aeróbicas a cerca de 37 °C por cerca de 18-14 horas. *Yersinia enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* são cultivadas a cerca de 28 °C sob condições aeróbicas por cerca de 18-24 horas. Os testes quanto à atividade contra *Campylobacter jejuni* são realizados em ágar de *Campylobacter* semeada com *C. jejuni*, contendo cerca de 5% de sangue lisado. O uso de sangue está dentro do conhecimento dos versados nessas técnicas, e inclui, por exemplo, ovinos, eqüinos, etc. Os testes quanto à atividade contra *Campylobacter jejuni* são conduzidos sob condições microaeróbicas de cerca de 5% de O_2, cerca de 10% de CO_2, e cerca de 85% de N_2 por cerca de 24-48 horas a cerca de 42 °C. Aproximadamente 0,1 mL da bactéria antagonística em suspensão em solução salina normal é plaqueado sobre ágar MRS e incubado por cerca de 24-48 horas. Os cubos de ágar MRS de cerca de 0,5 cm^3 são cortados e transferidos para cima de ágar de *Brucella* ou *Campylobacter* suplementado com sangue lisado, cerca de 10 microgramas/mL de rifampicina, cerca de 2,4 U/mL de polimixina, e semeado com cerca de 10^7 células de *Campylobacter jejuni*. As placas são incubadas a cerca de 42 °C por aproximadamente 24-48 horas sob condições microaeróbicas. A atividade é avaliada medindo as zonas de inibição do crescimento.

Os isolados descobertos como sendo antagonísticos são avaliados quanto à produção de bacteriocinas. As preparações antimicrobianas brutas (CAPs) são preparadas por precipitação com sulfato de amônio a partir de culturas de cepas antagonísticas desenvolvidas em cerca de 10% de caldo de brucela junto com uma quantidade intensificadora de bacteriocina de *Lactobacillus lactis* (Cepa 320; NRRL B-30744) usada como um indutor, a aproximadamente 37 °C por cerca de 14 horas sob condições aeróbicas. Uma quantidade intensificadora de bacteriocina do indutor é definida como uma quantidade de bactéria indutora

necessária para pelo menos aumentar a produção de bacteriocinas de uma cepa produtora em comparação com a cepa produtora cultivada sem a cepa indutora. Um exemplo de concentração de indutor para produtor em co-cultura é de cerca de 10:1 (indutor:produtor). As culturas são então centrifugadas a cerca de 2.500 x g por cerca de 10 min. Os peptídeos antagonísticos são isolados do sobrenadante por uma combinação de precipitação com sulfato de amônio, filtração em gel usando Superose 12 HR, cromatografia de troca catiônica usando Sepharose SP FF. Com co-culturas, as bacteriocinas secretadas podem ser adsorvidas sobre a superfície celular das células produtoras e indutoras. Para colher estas bacteriocinas, o pélete celular da etapa de centrifugação é misturado com um tampão de eluição que é feito de tampão de fosfato com aproximadamente 0,7% de NaCl, pH cerca de 8,0. A suspensão é misturada e incubada por cerca de 20 min, e em seguida, centrifugada a cerca de 10.000 x g por cerca de 15 min. A bacteriocina é isolada do sobrenadante por cromatografia de troca iônica sobre Superose SP FF. Os pesos moleculares dos peptídeos são determinados por eletroforese SDS-PAGE. As pI's dos peptídeos são determinadas por focagem isoelétrica. As seqüências de aminoácidos são determinadas por degradação de Edman, usando, por exemplo, um Seqüenciador Automático 491 cLC (Applied Biosystems, Inc.).

Para os propósitos da presente invenção, o termo "peptídeo" significa um composto de pelo menos dois ou mais aminoácidos ou análogos de aminoácidos. Os aminoácidos ou análogos de aminoácidos podem ser ligados por ligações peptídicas. Em outra modalidade, os aminoácidos podem ser ligados por outras ligações, por exemplo, éster, éter, etc. Os peptídeos podem ser em qualquer configuração estrutural, incluindo configurações lineares, ramificadas ou cíclicas. Como aqui utilizado, o termo "aminoácidos" refere-se a aminoácidos naturais ou sintéticos, incluindo os isômeros ópticos D ou L, e análogos de aminoácidos.

Os derivados e análogos de peptídeos da presente invenção incluem, porém sem limitações, aqueles que contêm, como uma seqüência de aminoácidos primária, a totalidade ou parte da seqüência de aminoácidos do peptídeo que inclui seqüências alteradas nas quais os resíduos de aminoácidos funcionalmente equivalentes são substituídos por resíduos dentro da seqüência que resulta em substituição de aminoácido conservativa.

Por exemplo, um ou mais resíduos de aminoácidos dentro da seqüência podem ser substituídos por outro aminoácido com uma polaridade similar, que atua como equivalente funcional, resultando em uma alteração silenciosa. Os substitutos para um aminoácido dentro da seqüência podem ser selecionados entre outros membros da classe à qual o aminoácido pertence. Por exemplo, os aminoácidos apolares (hidrofóbicos) incluem alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano e metionina. Os aminoácidos que contêm estruturas anelares aromáticas são fenilalanina, triptofano e tirosina. Os aminoácidos neutros polares incluem glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina e histidina.

Os aminoácidos negativamente carregados (ácidos) incluem ácido aspártico e ácido glutâmico. Não se espera que tais alterações afetem significativamente o peso molecular aparente, determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida ou ponto isoelétrico. As substituições não-conservativas de aminoácidos também podem ser introduzidas para substituir um aminoácido com uma propriedade particularmente preferível. Por exemplo, Cys pode ser introduzida em um sítio potencial para ligações dissulfeto com outra Cys. Pro pode ser introduzida por causa da sua estrutura particularmente plana.

Os peptídeos da presente invenção podem ser sintetizados quimicamente. Os peptídeos sintéticos podem ser preparados usando as técnicas bem conhecidas de condensação de peptídeos em fase sólida ou fase líquida, ou qualquer combinação delas, e podem incluir aminoácidos naturais e/ou sintéticos. Os aminoácidos usados para a síntese de peptídeos podem ser resina-padrão N^{α}-t-butilóxi-carbonil-aminoácido protegido com Boc(N^{α}-aminoácido) com os protocolos padronizados de desproteção, neutralização, acoplamento e lavagem do procedimento em fase sólida original de Merrifield (*J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154 (1963)), ou o 9-fluorenil-metóxi-carbonil (Fmoc) aminoácido lábil a bases (Carpino e Han, . *J. Org. Chem.* 37:3403-3409 (1972)). Além disso, o método da presente invenção pode ser usado com outros grupos protetores de N^{α} que são conhecidos pelos versados nessas técnicas. A síntese de peptídeos em fase sólida pode ser realizada por técnicas que estão dentro dos conhecimentos dos versados nessas técnicas (vide, por exemplo, Stewart e Young, "Solid Phase Synthesis", Segunda Edição, Pierce Chemical Co., Rockword, IL, 1984; Fields e Noble, *Int. J. Peptides Rotein Res.* 35:161-214 (1990)), ou usando sintetizadores automatizados.

De acordo com a presente invenção, os peptídeos e/ou cepas bacterianas inusitadas podem ser administrados em um carreador terapeuticamente aceitável, por via tópica, parenteral, transmucosa, tal como, por exemplo, por via oral, nasal, retal ou transdérmica. Os peptídeos da presente invenção podem ser modificados, caso necessário, para aumentar a capacidade de opeptídeo cruzar as membranas celulares, tal como aumentando a natureza hidrofóbica do peptídeo, introduzindo o peptídeo como um conjugado a um carreador, tal como um ligante a um receptor específico, etc.

A presente invenção fornece também a conjugação de uma molécula-alvo a um peptídeo da invenção. As moléculas-alvo para os propósitos da presente invenção significam uma molécula que, quando administrada *in vivo*, fica localizada em um local ou locais desejados. Em várias modalidades da presente invenção, a molécula-alvo pode ser um ligante peptídico de um receptor na célula-alvo ou um anticorpo, tal como um anticorpo monoclonal. Para facilitar a reticulação, o anticorpo pode ser reduzido a dois heterodímeros com cadeia pesada e leve, ou o fragmento $F(ab')_2$ pode ser reduzido, e reticulado ao peptídeo por intermédio de sulfidrila reduzida.

Outro aspecto da presente invenção é fornecer composições terapêuticas. A composição pode ser para administração oral, nasal, pulmonar, por injeção, etc. As composições terapêuticas incluem quantidades eficazes de pelo menos uma bacteriocina da presente invenção e seus derivados e/ou pelo menos uma cepa inusitada para pelo menos reduzir os níveis de colonização em pelo menos uma bactéria-alvo, junto com diluentes, conservantes, auxiliares de solubilização, emulsificantes, adjuvantes e/ou carreadores. Os diluentes podem incluir tampões tais como Tris-HCl, acetato, fosfato, por exemplo; os antioxidantes incluem, por exemplo, ácido ascórbico, metabissulfito de sódio, etc.; os conservantes podem incluir, por exemplo, Thimersol, álcool benzílico, etc.; e as substâncias encorpantes tais como lactose, manitol, etc.

A composição terapêutica da presente invenção pode ser incorporada em uma preparação particulada de compostos poliméricos tais como poli(vinil-pirrolidona), ácido polilático, ácido poliglicólico, etc., ou dentro de lipossomas. A encapsulação em lipossomas inclui encapsulação por vários polímeros. Uma ampla série de carreadores poliméricos pode ser utilizada para conter e/ou distribuir um ou mais agentes terapêuticos discutidos acima, incluindo, por exemplo, composições biodegradáveis e não-biodegradáveis. Os exemplos representativos de composições biodegradáveis incluem albumina, colágeno, gelatina, ácido hialurônico, amido, celulose (metil-celulose, hidróxi-propil-celulose, hidróxi-propil-metil-celulose, carbóxi-metil-celulose, ftalato de acetato de celulose, succinato de acetato de celulose, ftalato de hidróxi-propil-metil-celulose), caseína, dextranos, polissacarídeos, fibrinogênio, poli(D,L-lactídeo), poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo), poliglicolídeo, poli(hidróxi-butirato), poli(alquil-carbonato), e poli(orto-ésteres), poliésteres, poli(ácido hidróxi-valérico), polidioxanona, poli(tereftalato de etileno), poli(ácido málico), poli(ácido tartrônico), polianidridos, polifosfazenos, poli(aminoácidos) e seus copolímeros (vide genericamente Illum, L., Davids, S.S. (editores), "Polymers in Controlled Drug Delivery", Wright Bristol, 1987; Arshady, *J. Controlled Release* 17:1-22 (1991); Pitt, *Int. J. Pharm.* 59:173-196 (1990); Holland *et al., J. Controlled Release* 4:155-0180 (1986).

Os exemplos representativos de polímeros não-biodegradáveis incluem copolímeros de poli(etileno/acetato de vinila) ("EVA"), borracha de silicone, polímeros acrílicos (ácido poliacrílico, ácido poli(metil-acrílico), poli(metacrilato de metila), poli(alquil-cianoacrilato), polietileno, polipropileno, poliamidas (*nylon* 6,6), poliuretana, poli(éster-uretanas), poli(éter-uretanas), poli(éster-uréia), poliéteres (poli(óxido de etileno)), poli(óxido de propileno), Pluronics e poli(tetrametilenoglicol), borrachas de silicone e polímeros vinílicos tais como poli(vinil-pirrolidona), poli(álcool vinílico) poli(ftalato de acetato de vinila). Podem ser desenvolvidos também polímeros que são aniônicos (por exemplo, alginato, carragenina, carbóxi-metil-celulose e poli(ácido acrílico), ou catiônicos (por exemplo, quitosano, poli-L-lisina, poli-etilenoimina, e poli(alil-amina)) (vide genericamente Dunn *et al., J. Applied Polymer Sci.*

50:353-365 (1993); Cascone *et al., J. Materials Sci.: Materials in Medicine* 5:770-774 (1994); Shiraishi *et al., Biol. Pharm. Bull.* 16(11):1164-1168 (1993); Thacharodi e Rao, *Int'l. J. Pharm.* 120:115-118 (1995); Miyazaki *et al., Int'l. J. Pharm.* 118:257-263 (1995)).

Os carreadores poliméricos podem ser modelados em uma série de formas, com as características desejadas de liberação e/ou com propriedades específicas desejadas. Por exemplo, os carreadores poliméricos podem ser modelados para liberar um agente terapêutico após exposição a um evento disparador específico, tal como o pH (vide, por exemplo, Heller *et al.*, "Chemically Self-Regulated Drug Delivery Systems", in "Polymers in Medicine III", Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1988, páginas 175-188; Kang *et al., J. Applied Polymer Sci.* 48:343-354 (1993); Dong *et al., J. Controlled Release* 19:171-178 (1992); Dong e Hoffman, *J. Controlled Release* 15:141-152 (1991); Kim *et al., J. Controlled Release* 28:143-152 (1994); Cornejo-Bravo *et al., J. Controlled Release* 33:223-229 (1995); Wu e Lee, *Pharm. Res.* 10(10):1544-1547 (1993); Serres *et al., Pharm. Res.* 13(2):196-201 (1996); Peppas, "Fundamentals of pH- and Temperature-Sensitive Delivery systems", in Gurny *et al.* (editores), "Pulsatile Drug Delivery", Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH, Stuttgart, 1993, páginas 41-55; Doelker, "Cellulose Derivatives", 1993, in Peppas e Langer (editores), *Biopolymers I*, Springer-Verlag, Berlim). Os exemplos representativos de polímeros sensíveis ao pH incluem poli(ácido acrílico) e seus derivados (incluindo, por exemplo, homopolímeros tais como poli(ácido amino-carboxílico); poli(ácido acrílico); poli(ácido metil-acrílico) e monômeros acrílicos tais como aqueles discutidos acima. Outros polímeros ensíveis ao pH incluem polissacarídeos tais como ftalato de acetato de celulose; ftalato de hidróxi-propil-metil-celulose; succinato de acetato de hidróxi-propil-metil-celulose; trimelilato de acetato de celulose; e quitosano. Ainda outros polímeros sensíveis ao pH incluem qualquer mistura de um polímero sensível ao pH e um polímero solúvel em água.

Similarmente, podem ser modelados os carreadores poliméricos que são sensíveis à temperatura (vide, por exemplo, Chen *et al.*, "Novel Hydrogels of a Temperature-Sensitive Pluronic Grafted to a Bioadhesive Polyacrylic Acid Backbone for Vaginal Drug Delivery", in *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 22:167-168, Controlled Release Society, Inc., 1995; Okano, "Molecular Design of Stimuli-Responsive Hydrogels for Temporal controlled Drug Delivery" in Proceed. Intern. Symp. Control. Rela. Bioact. Mater. 22:111-112, Controlled Relase Society, Inc, 1995; Johnston *et al., Pharm. Res.* 9(3):425-433 (1992); Tung, *Int'l J. Pharm.* 107:85-90 (1994); Harsh e Gehrke, *J. Controlled Release* 17:175-186 (1991); Bae *et al., Pharm. Res.* 8(4):531-537 (1991); Dinarvand e D'Emanuele, *J. Controlled Release* 36:221-227 (1995); Yu e Grainger, "Novel Thermo-sensitive Amphiphilic Gels: Poly N-isopropylacrylamide-co-sodium acrylate-co-N-alkylacrylamide Network Synthesis and Physicochemical Characterization", Dept. of Chemical and Biological Sci., Oregon Graduate Institute of Science & Technology, Beaverton, OR, páginas 820-821; Kim *et al., Pharm. Res.*

9(3):283-290 (1990); Bae *et al., Pharm. Res.* 8(5):624-628 (1991); Kono *et al., J. Controlled Release* 30:69-75 (1994); Yoshida *et al., J. Controlled Release* 32:97-102 (1994); Okano *et al., J. Controlled Release* 36:125-133 (1995); Chun e Kim, *J. Controlled Release* 38:39-47 (1996); Dinarvand e D´Emanuele, *Int´l J. Pharm.* 118:237-242 (1995); Katono *et al., J. Controlled Release* 16:215-228 (1991); Hoffman, "Thermally Reversible Hudrogels Containing Biologically Active Species", in Migliaresi *et al.* (editores), "Polymers in Medicine III", Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1998, páginas 161-167; Hoffman, "Applications of Thermally Reversible Polymers and Hydrogels in Therapeutics and Diagnostics", in Third International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, Salt Lake City, Utah, 24-27 de fevereiro de 1987, páginas 297-305; Gutowska *et al., J. Controlled Release* 22:95-104 (1992); Palasis e Gehrke, *J. Controlled Release* 18:1-12 (1992); Paavola *et al., Pharm. Res.* 12(12):1997-2002 (1995).

Os exemplos representativos de polímeros termogeleificantes, e sua temperatura de gelatinização (LCST (°C)) incluem homopolímeros tais como poli(N-metil-N-n-propil-acrilamida), 19,8; poli(N-n-propil-acrilamida), 21,5; poli(N-metil-N-isopropil-acrilamida), 22,3; poli(N-n-propil-metacrilamida), 28,0; poli(N-isopropil-acrilamida), 30,9; poli(N-n-dietil-acrilamida), 32,0; poli(N-isopropil-metacrilamida), 44,0; poli(N-etil-ciclo-propil-acrilamida), 45,5; poli(N-etil-metil-acrilamida), 50,0; poli(N-metil-N-etil-acrilamida), 56,0; poli(N-ciclo-propil-metil-acrilamida), 59,0; poli(n-etil-acrilamida), 72,0. Além disso, os polímeros termogeleificantes podem ser fabricados preparando copolímeros entre (dentre) monômeros acima, ou combinando tais homopolímeros com outros polímeros solúveis em água tais como monômeros acrílicos (por exemplo, ácido acrílico e seus derivados, tais como ácido metacrílico, acrilato e seus derivados, tais como metacrilato de butila, acrilamida, e N-n-butil-acrilamida). Outros exemplos representativos de polímeros termogeleificantes incluem derivados de éteres de celulose, tais como hidróxi-propil-celulose, 41 °C; metil-celulose, 55 °C; hidróxi-propil-metil-celulose, 66 °C; e etil-hidróxi-etil-celulose, e Pluronics tais como F-127, 10-15 °C; L-122, 19 °C; L-92, 26 °C; L-81, 20 °C; e L-61, 24 °C.

Uma ampla série de formas pode ser modelada pelos carreadores poliméricos da presente invenção, incluindo, por exemplo, dispositivos com formato de bastão, péletes, chapas ou cápsulas (vide, por exemplo, Goodell *et al., Am. J. Hosp. Pharm.* 43:1454-1461 (1986); Langer *et al.,* "Controlled Release of Macromolecules froam Polymers", in "Biomedical Polymers, Polymeric Marerials and Pharmaceuticals for Biomedical Use", Goldberg, E.P., Nakagim, A. (editores), Academic Press, páginas 113-137, 1980; Rhine *et al., J. Pharm. Sci.* 69:265-2170, 1980; Brown *et al., J. Pharm. Sci.* 72:1181-1185 (1983); e Bawa *et al., J. Controlled Release* 1:259-267 (1985)).

Os agentes terapêuticos podem ser ligados por oclusão nas matrizes do polímero, ligados por ligações covalentes, ou encapsulados em microcápsulas. Dentro de certas mo-

dalidades preferidas da invenção, as composições terapêuticas são fornecidas em formulações não-capsulares tais como microsferas (tamanho na faixa entre nanômetros e micrômetros), pastas e filamentos de vários tamanhos, filmes e *sprays*.

Outro aspecto da presente invenção é fornecer uma composição terapêutica e ração animal. A composição terapêutica da presente invenção pode ser encapsulada usando um carreador polimérico como descrito acima, e depois adicionada a uma ração por qualquer método conhecido de aplicá-la à ração, tal como, por exemplo, por misturação mecânica, aspersão, etc. A composição terapêutica inclui, por exemplo, uma quantidade de pelo menos uma bacteriocina eficaz para pelo menos reduzir os níveis de colonização em pelo menos uma bactéria-alvo em um animal, tal como, por exemplo, aproximadamente 0,5 grama de bacteriocina(s)/100 gramas, aproximadamente 1,25 gramas de um carreador polimérico tal como poli(vinil-pirrolidona)/100 gramas, e cerca de 8,6% de um diluente tal como água/100 gramas, misturado com qualquer componente granular que é digerível, tal como, por exemplo, grão de milho moído; grãos moídos tais como aveia, trigo, trigo-sarraceno, frutas moídas tais como, por exemplo, peras, etc. A composição terapêutica é então adicionada a qualquer tipo de ração animal em quantidades eficazes para pelo menos reduzir os níveis de colonização de pelo menos uma bactéria-alvo, tal como, por exemplo, em razões de bacteriocina para ração de cerca de 1:10 para cerca de 1:100. Para os propósitos da presente invenção, os exemplos de ração animal incluem forragem verde, forragem verde seca, raízes, tubérculos, frutos polpudos, grãos, sementes, grãos de cervejeiro, polpa, levedura de cervejeiro, resíduos de destilação, subprodutos de moagem, subprodutos da produção de açúcar, amido ou da produção de óleos, e vários rejeitos de alimentos. O produto pode ser adicionado a rações animais para gado bovino, aves, coelhos, porcos ou ovinos, etc. O produto pode ser misturado com outros aditivos de rações para estes animais de criação.

Os exemplos que se seguem pretendem apenas ilustrar ainda mais a invenção e não pretendem limitar o âmbito da invenção como definido pelas reivindicações.

EXEMPLO 1

Duas cepas antagonísticas inusitadas, Cepa de *Enterococcus faecium* 50-52 (NRRL B-30746), e a Cepa de *Streptococcus cricetus* 760 (NRRL B-30745) foram isoladas das superfície da mucosa de cerca de 1,0 grama de cecos de frangos de corte, que foi colocado em suspensão em cerca de 10 mL de solução salina estéril a 0,85% p/v (solução salina normal) e aquecido a cerca de 80 °C por cerca de 15 min. Aproximadamente 0,10 mL de suspensões a cerca de 1:50 e 1:2.500 foi espalhado sobre placas de ágar de contagem de placas ou ágar MRS. As placas foram incubadas a cerca de 37 °C por cerca de 24 horas sob condições microaeróbicas. As colônias com morfologia diferente foram riscadas sobre ágar MRS. Estas culturas foram incubadas sob condições microaeróbicas por cerca de 24

horas a cerca de 37 °C.

A cepa 760 foi desenvolvida a aproximadamente 37 °C por cerca de 24 horas sobre ágar MRS. A cepa é um aeróbio facultativo com cocos gram-positivos, é capaz de se desenvolver entre aproximadamente 37 °C e 45 °C. A cepa se desenvolve sobre ágar nutriente ou ágar de contagem de placas, produzindo colônias acinzentadas circulares com formato regular convexo baixo com margens ondulosas que têm cerca de 2 mm de diâmetro depois da incubação aeróbica a cerca de 37 °C por cerca de 24 horas. As propriedades bioquímicas da cepa 760 foram determinadas com o sistema APJ 50 CLH (Bio-Merieux, França). A cepa degrada lactose, manitol, ribose, salicina, sorbitol, tralose, arabinose, e melibiose. Ela hidrolisa ligeiramente rafinose e inulina, e não hidrolisa arginina e esculina. Ela não é capaz de α- e β-hemólise. Ela não se desenvolve na presença de cloreto de sódio a cerca de 6,5%. A cepa é catalase-negativa.

A cepa 50-52 foi desenvolvida a aproximadamente 37 °C por cerca de 24 horas sobre ágar MRS. A cepa é um aeróbio facultativo com cocos gram-positivos, é capaz de se desenvolver entre aproximadamente 37 °C e 45 °C. A cepa se desenvolve sobre ágar nutriente ou ágar de contagem de placas, produzindo colônias acinzentadas circulares com formato regular convexo baixo com margens ondulosas que têm cerca de 1 mm de diâmetro depois da incubação aeróbica a cerca de 37 °C por cerca de 24 horas. As propriedades bioquímicas da cepa 50-52 foram determinadas com o sistema teste EN-Coccus. A cepa degrada arginina, arabinose e manitol; e não hidrolisa sorbose, sorbitol, melibiose, rafinose e meticitose. Ela se desenvolve na presença de cloreto de sódio a cerca de 6,5%.

As bactérias-alvo, para avaliar a atividade antagonística das cepas 50-52 e 760, incluíram isolados de *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) NCTC 11168, *S. enteritidis*, e *E. coli* 0157:H7. As culturas de *C. jejuni* foram desenvolvidas sobre ágar de brucela ou ágar de *Campylobacter*, contendo cerca de 5% de sangue parcialmente lisado a cerca de 42 °C por aproximadamente 24-48 horas sob condições microaeróbicas de cerca de 5% de O_2, cerca de 10% de CO_2, e cerca de 85% de N_2. As outras cepas foram cultivadas sobre ágar nutriente a cerca de 37 °C, por cerca de 24 horas. A atividade antagonística dos isolados contra *Campylobacter* foi avaliada. Aproximadamente 0,2 mL das suspensões em solução salina normal foi plaqueado sobre ágar MRS e incubado a cerca de 37 °C por cerca de 24 horas. Os cubos de ágar MRS de cerca de 0,5 cm^3 foram cortados e transferidos para cima de ágar de *Brucella* ou *Campylobacter* suplementado com cerca de 5%-10% de sangue parcialmente lisado, cerca de 10 microgramas/mL de rifampicina, cerca de 2,5 U/mL de polimixina, e inoculado com aproximadamente 10^7 células de *Campylobacter jejuni* por placa. As placas foram incubadas a cerca de 42 °C por aproximadamente 24 a 48 horas sob condições microaeróbicas. A atividade foi avaliada medindo o tamanho do diâmetro das zonas de inibição de *C. jejuni*.

EXEMPLO 2

Preparações antimicrobianas brutas foram extraídas das culturas de duas cepas antagonísticas: *Enterococcus* 50-52 e *Streptococcus* 760. Os antagonistas foram desenvolvidos em cerca de 250 mL de caldo de brucela a 10% junto com a cepa indutora de *Lactobacillus lacti* 320 (NRRL B-30744 supra) a cerca de 37 °C por cerca de 14 horas sob condições aeróbicas. A concentração da cepa produtora foi de cerca de 10^6 CFU/mL e da cepa indutora foi de cerca de 10^7 CFU/mL. As culturas resultantes foram centrifugadas a aproximadamente 2.500 x g por cerca de 10 min, removendo a maioria das células viáveis. O sobrenadante decantado foi misturado com sulfato de amônio saturado a cerca de 60%, e incubado a cerca de 4 °C por cerca de 24 horas, para precipitar os compostos de bacteriocinas. Depois da centrifugação a aproximadamente 10.000 x g por cerca de 20 min, o sedimento foi recolocado em suspensão em aproximadamente 1,5 mL de tampão de fosfato de sódio a cerca de 10 mM, pH cerca de 7,0, e dialisado de um dia para o outro contra aproximadamente 2,5 L do mesmo tampão. A solução foi designada uma preparação antimicrobiana bruta (CAP). Cada amostra da preparação foi esterilizada passando através de um filtro com poros de de 0,22 mícron (Millipore, Bedford, MA, USDA). A Tabela 1 indica a produção de bacteriocinas com e sem o uso da cepa indutora.

Tabela 1

Produção de Bacteriocinas com e sem o Uso da cepa Indutora *Lactococcus lactis*

Método de Cultivo	Bacteriocina 760						Bacteriocina 50-52			
	Quantidade de Proteína, mg	Atividade, AU/mL	Atividade Específica, AU/mg	SDS-PAGE	IEF	Quantidade de Proteína, mg	Atividade, AU/mL	Atividade Específica, AU/mg	SDS-PAGE	IEF
Com Cepa Indutora	0,18	51.200	284.444	5,5 kD	9,5	0,04	12.800	320.000	3,9 kD	8,4
Sem Cepa Indutora	0,04	6.400	160.000	5,5 kD	9,5	0,015	3.200	213.333	3,9 kD	8,4

EXEMPLO 3

O espectro da atividade antimicrobiana das CAPs foi determinada usando um teste de mancha. Aproximadamente 1 mL de preparações antimicrobianas brutas (CAP), obtidas como descrito no Exemplo 2 acima, foi diluído com aproximadamente 1 mL de tampão de fosfato de sódio (pH cerca de 7,0) e esterilizado como descrito acima no Exemplo 2. Aproximadamente 10 μL de cada amostra foram plaqueados sobre ágar de *Campylobacter* ou

ágar nutriente (MPA ou Ágar de Meta-Peptona) suplementado com sangue, semeadas previamente com células da bactéria-alvo. As placas que contêm as culturas de *C. jejuni* foram desenvolvidas a cerca de 42 °C sob condições microaeróbicas; *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* foram cultivadas de forma aeróbica a cerca de 28 °C, e as outras cepas bacterianas foram incubadas de forma aeróbica a cerca de 37 °C por cerca de 24 ou 48 horas. A identificação baseou-se nas áreas de inibição produzidas pela bactéria-alvo. A atividade da CPA foi expressa em unidades arbitrárias (AU) por um mililitro da preparação na qual uma zona visível de inibição do crescimento da cultura aparece (Henderson *et al., Archives of Biochemistry and Biophysics* 295:5-12 (1992); aqui incorporado como referência). Todos experimentos foram conduzidos em duplicata. Vide Tabela 2 no Exemplo 4 abaixo.

EXEMPLO 3

As CAPs e as bacteriocinas passaram por eletroforese em cerca de gel de agarose a 15% em peso, cerca de 1% de SDS (9 x 12 cm) em Tampão de Tri-glicina. Depois da eletroforese a cerca de 100 mA, por aproximadamente 4 horas, os géis foram fixados com uma solução contendo aproximadamente 15% de etanol e aproximadamente 1% de ácido acético. Os géis foram então lavados com agia destilada por aproximadamente 4 horas. Para determinar is pesos moleculares das frações protéicas, o gel foi corado com uma solução aque contém aproximadamente 0,21% de Azul de Coomassie G-250, cerca de 40% de etanol, e cerca de 7% de ácido acético. Os géis lavados foram testados contra três bactérias-alvo, *C. jejuni* NCTC 11168, *E. coli* O157:H7, e *S. enteritidis* 204 pelo método de Bhunia *et al.* (*Journal of Industrial Microbiology* 2:319-322 (1987); aqui incorporado como referência). Os géis foram colocados em placas de Petri cobertas com ágar de *Campylobacter* semi-sólido com 5% de sangue (cerca de 0,75%) ou MPA semi-sólido, e semeadas com células das cepas em teste. As placas que contêm *C. jejuni* foram incubadas a cerca de 42 °C por aproximadamente 48 horas sob condições microaeróbicas, *E. coli* O157:H7 e *S. enteritidis* 204 a cerca de 37 °C por aproximadamente 24 horas. A avaliação baseou-se na visualização de zonas de crescimento inibido da cepas em teste na presença de bacteriocinas.

A focagem isoelétrica identificou duas frações distintas que diferiam em pontos isoelétricos (pI: CAP 760, continha frações com pI = cerca de 9,2 e cerca de 9,5. CAP 50-52 continha frações com pI = cerca de 7,7 e 8,4. A atividade antagonística para *C. jejuni* foi observada na fração com pI = cerca de 9,5 na preparação 760, enquanto que na preparação 50-52 esta inibição foi observada na fração com pI = cerca de 8,4 (Figuras 1A-B e 2 A-B, Tabela 1 abaixo).

Os géis cobertos com *Campylobacter jejuni* foram usados para determinar qual ou quais bandas correspondem à atividade antimicrobiana, o peso molecular e o ponto isoelétrico. As Figuras 1A e 1 B para a bacteriocina 760 ilustram o peso molecular da fração ativa (1A) e o ponto isoelétrico da fração ativa (1B). Os géis foram cobertos com *Campylobacter*

jejuni para determinar a atividade antimicrobiana, o peso molecular, e o ponto isoelétrico. Na Figura 1A, fileira 1 a faixa LMW de marcadores do peso molecular de 14.400-94.000 (Amersham Pharmacia Biotech): 14.000. 20.100; 30.000; 43.000; 67.000; e 94.000 Da. Na fileira 2, estão os marcadores de peso molecular para insulina, cadeia β (Sigma, EUA): 3.500 Da. A fileira 3 ilustra a bacteriocina 760 pura que corresponde à atividade antimicrobiana, a zona de inibição do crescimento (seta) tem uma massa de cerca de 5.500 Da. A figura 1 B, fileira 1, ilustra os padrões de pI (Mistura de Teste de Proteína, Proteínas Marcadoras de pI, Serva). A fileira 2 ilustra a bacteriocina 760 pura que corresponde à atividade antimicrobiana, a zona de inibição do crescimento (seta) tinha um pI de cerca de 9,5. As outras bandas não apresentaram atividade antimicrobiana.

As Figuras 2A e 2B ilustram a detecção direta da bacteriocina 50-52 usando SDS-PAGE (2A) e a focalização isoelétrica (2B). O gel foi coberto com *Campylobacter jejuni* para determinar qual ou quais bandas correspondem à atividade antimicrobiana e peso molecular, como ilustrado na Figura 2A. A fileira 1 ilustra a faixa LMW de marcadores do peso molecular de 1.600-26.000 (Amersham Pharmacia Biotech): 1.600; 3.500; 6.500; 14.200; 17.000; e 26.000 Da. A banda na fileira 2 que contém a bacteriocina 50-52 pura corresponde à atividade antimicrobiana, a zona de inibição do crescimento e tinha uma massa de cerca de 3.900 Da. A Figura 2B, fileira 1 continha os padrões de pI (Mistura de Teste de Proteína, Proteínas Marcadoras de pI, Serva). A banda na fileira 2 (bacteriocina 50-52 pura), que corresponde à atividade antimicrobiana, a zona de inibição do crescimento (seta) tinha um pI de cerca de 8,4. As outras bandas não apresentaram atividade antimicrobiana.

Os espécimes de bacteriocinas foram colocados sobre géis de IEF (pH aproximadamente 4,4-10,0) (Novex, San Diego, CA). Os géis foram operados a cerca de 100 V por cerca de 1 hora, 200 V por cerca de 2 horas, e 500 V por cerca de 30 min em XCM II™ Mini-Cell (Novex). Os géis foram lavados co água destilada por cerca de 4 horas com fixação em em seguida coloração com Azul de Coomassie G-250, para determinar os pontos isoelétricos (pI) das bacteriocinas e sua capacidade para inibir o crescimento das cepas em teste apresentadas nas Figuras 1 e 2 e na Tabela 2.

Tabela 2

Atividade Antimicrobiana de Preparações Antimicrobianas Brutas (CAP) de Bacteriocinas Avaliadas por Métodos de um Teste de Mancha, SDS-PAGE e Focalização Isoelétrica (IEF)

Bacteriocina	Cepas do Teste	Atividade Inibidora no Teste de Mancha (AU/mL)	Atividade Inibidora Medida por SDS-PAGE	Atividade Inibidora Medida por IEF
760	*C. jejuni* NCTC 11168 *S. enteritidis* 204, *E. coli*	51.200	PM 5,5 kDa PM 5,5 kDa	Banda 1 pI = 9,5

	O157:H7 904	12.800 12.800	PM 5,5 kDa	Banda 1 pI = 9,5 Banda 1 pI = 9,5
50-52	*C. jejuni* NCTC 11168 *S. enteritidis* 204, *E. coli* O157:H7 904	12.800 12.800 3.200	PM 3,9 kDa PM 3,9 kDa PM 3,9 kDa	Banda 1 pI = 8,4 Banda 1 pI = 8,4 Banda 1 pI = 8,4

EXEMPLO 5

A cepa de *Enterococcus* produtora 50-52 e a cepa de *Streptococcus* 760 foram cultivadas simultaneamente com uma cepa indutora de bactérias, *Lactococcus lactis* (Cepa 320; supra) em caldo de brucela (difco). Aproximadamente 1,32 x 10^7 células de *Enterococcus faecium* ou *Streptococcus cricetus* foram colocadas juntas com aproximadamente 3,9 x 10^6 células de *Lactococcus lactis* em frascos de 250 mL e cultivadas por cerca de 24 horas. As concentrações de cepas produtoras e indutoras foram determinadas a cada duas horas junto com a atividade específica da bacteriocina para determinar o tempo ótimo para obter quantidades utilizáveis da bacteriocina. As bacteriocinas foram isoladas e purificadas por dois métodos. O primeiro foi sedimentação da bacteriocina, usando sulfato de amônio, e em seguida, cromatografia em três estágios; filtração em gel de Superose 12 HR, cromatografia de troca iônica em Superose SPFF, e cromatografia por interação hidrofóbica em Octil Sepharose 4 FF. Este é o Método A.

No caso do Método B, depois da cultura simultânea de cepas produtoras e indutoras, a maior parte da bacteriocina produzida é secretada para dentro do líquido de cultura. Uma parte da bacteriocina será adsorvida sobre as células de cepas indutoras e produtoras. Para evitar a perda da bacteriocina adsorvida, a bacteriocina é eluída das células. O Método B envolve duas etapas: (1) isolamento da bacteriocina do sobrenadante do líquido de cultura; e (2) isolamento da bacteriocina a partir do precipitado de células das cepas indutoras e produtoras. Na etapa 1, as culturas são colhidas e separadas por centrifugação a cerca de 10.000 x g por cerca de 15 min, para precipitar as células. O sobrenadante é aplicado a uma coluna de Octil Sepharose 4 FF, para recuperar a bacteriocina. O precipitado de células é usado na etapa 2. O precipitado foi colocado em suspensão em tampão de fosfato com cerca de 0,7% de NaCl, pH (tampão de eluição) e a suspensão foi misturada e incubada por cerca de 20 min. Depois da incubação, a suspensão foi centrifugada a cerca de 10.000 x g por cerca de 15 min. A bacteriocina foi isolada do sobrenadante usando cromatografia de troca iônica em Superose SP FF. Os produtos purificados de ambos métodos foram analisados quanto à sua atividade antagonística contra *Campylobacter jejuni*. SDS-PAGE e focagem isoelétrica (IEF) foram realizadas. Os resultados estão resumidos abaixo

nas Tabelas 3 e 4.

A atividade específica das preparações purificadas pelo Método B demonstrou ser 4 vezes mais alta do que a atividade do mesmo produto obtido pelo Método A. Levou aproximadamente 12,5 horas para produzir a preparação pelo Método B versus 52 horas usando o Método A. O Método B reduz o número de etapas necessárias para a purificação da bacteriocina a partir da CAP, eliminando a filtração em gel e a cromatografia por interação hidrofóbica e apenas aplicando cromatografia de troca iônica

Tabela 3

Dados Comparativos sobre a Atividade Específica das bacteriocinas 760 e 50-52 Isoladas Usando os Métodos A e B

Método de Isolamento	Bacteriocina 760						Bacteriocina 50-52			
	Quantidade de Proteína, mg	Atividade, UE/mL	Atividade Específica, UE/mL	SDS-PAGE	IEF	Quantidade de Proteína, mg	Atividade, UE/mL	Atividade Específica, UE/mL	SDS-PAGE	IEF
Com Cepa Indutora	0,08	12.800	71.111	5,5 kD	9,5	0,075	6.400	85.333	3,9 kD	8,4
Sem Cepa Indutora	0,18	51.200	284.444	5,5 kD	9,5	0,04	12.800	320.000	3,9 kD	8,4

Tabela 4

Atividade Antimicrobiana das Bacteriocinas 760 e 50-52 Purificadas Determinada pelo Teste de Mancha, SDS-PAGE e Focagem Isoelétrica (IEF)

Bacteriocina	Cepas do Teste	Atividade Inibidora no Teste de Mancha (AU/mL)	Atividade Inibidora Medida por SDS-PAGE (kDa)	Atividade Inibidora Medida por IEF
760	*C. jejuni* NCTC 11168	51.200	+Banda 1 PM 5,5	+Banda 1 pI = 9,5
			+Banda1 PM 5,5	
	S. enteritidis 204,	12.800		+Banda 1 pI = 9,5
	E. coli O157:H7 904	12.800	+Banda 1 PM 5,5	
				+Banda 1 pI = 9,5
50-52	*C. jejuni* NCTC 11168	12.800	+Banda 1 PM 3,9	+Banda 1 pI = 8,4
	S. enteritidis 204,	12.800	+Banda 1 PM 3,9	+Banda 1 pI = 8,4
	E. coli O157:H7 904	6.400	+Banda 1 PM 3,9	+Banda 1 pI = 8,4

As seqüências de aminoácidos das bacteriocinas purificadas foram determinadas

pela degradação de Edman, usando um seqüenciador automático 491 cLC (Applied Biosystems, EUA). As bacteriocinas foram hidrolisadas em HCl cerca de 6 M sob um vácuo a aproximadamente 110 °C por cerca de 72 horas. Os pesos moleculares das bacteriocinas 50-52 e 760 foram determinados por espectrometria de massas, usando um Voyager-DERP (Perkin-Elmer, EUA). O sistema MALDI-TOF, um tempo de ionização de dessorção a laser auxiliada com matriz de sistema de vôo, foi usado junto com a matriz, ácido 2-ciano-hidróxicinâmico. As seqüências de aminoácidos são:

50-52: TTKNYGNGVCNSVNWCQCGNVWASCNLATGCAAWLCKLA SEQ ID NO: 1

760: NRWYCNSAAGGVGGAAVCGLAGYVGEAKENIAGEVRKGWGMAGGFTHNKA SEQ ID NO: 2

Os pesos moleculares calculados dos peptídeos foram cerca de 3,9 kDa para a bacteriocina 50-52 e cerca de 5,5 kDa para a bacteriocina 760. A análise por MALDI-TFF revelou os seguintes pesos moleculares: cerca de 3.932 kDa para a bacteriocina 50-52 e cerca de 5.362 para a bacteriocina 760.

EXEMPLO 6

A influência de enzimas, temperatura, e pH sobre a atividade das bacteriocinas foi determinada. Cerca de 10 mL de uma das seguintes enzimas foram transferidos para dentro de tubos que contêm cerca de 20 mL de bacteriocinas: beta-quimiotripsina – cerca de 100 mg/mL, proteínas K – cerca de 200 mg/mL, papaína – cerca de 60 mg/mL, lisozima – cerca de 750 mg/mL, e lipase –cerca de 100 mg/mL (todas da Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). Depois de um período de incubação de cerca de 3 horas a cerca de 37 °C, a mistura de bacteriocina e enzima foi analisada quanto à atividade antimicrobiana usando o teste de mancha descrito no Exemplo 3. As bacteriocinas não tratadas serviram como controles positivos.

Para estudar a estabilidade térmica das bacteriocinas, uma amostra de cerca de 2 mg/mL foi fervida em um banho de água por cerca de 15 min, resfriada, e avaliada em termos de sua atividade antimicrobiana. Aproximadamente 2 mg/mL de bacteriocina foram usados para avaliar o efeito do pH. Cerca de 2 mL de soluções estéreis, NaOH cerca de 10 mM ou HCl cerca de 10 mM foram adicionados às amostras até o pH do teste entre cerca de 3 e cerca de 10. As amostras foram incubadas a cerca de 37 °C por cerca de 2 horas e 24 horas, e a cerca de 90 °C por cerca de20 min. As amostras tiveram seu pH ajustado até um pH de cerca de 7,2 pela adição de tampão de fosfato estéril cerca de 4 mM e analisadas quanto à sua atividade antimicrobiana, usando o teste de mancha descrito acima no Exemplo 3.

As bacteriocinas 50-52 e 760 perderam sua atividade antimicrobiana depois de serem tratadas com beta-quimiotripsina, proteinase K e papaína, mas retiveram-na quando tratadas com lisozima, lipase ou aquecimento até cerca de 90 °C (Tabela 5). Elas foram

estáveis em diferentes valores de pH na faixa entre cerca de 3.0 e cerca de 9,0, mas ficaram inativas em pH cerca de 10 (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5

Efeito de Enzimas e Temperatura sobre a Atividade Antimicrobiana de Bacteriocinas

Tratamento	Atividade*
Beta-quimiotripsina	-
Proteinase K	-
Papaína	-
Lisozima	+
Lipase	+
100 °C, 15 min	+

*atividade determinada pelo teste de mancha, com *C. jejuni* NCTC 11168 como cepa indicadora.

+ presença de atividade

- ausência de atividade depois do tratamento com enzimas ou exposição à temperatura

Tabela 6

Efeito do pH sobre a Atividade de Bacteriocinas

pH	Atividade Determinada pelo Teste de Mancha com *C. jejuni* NCTC 11168			
	20 min a 90 °C	2 h a 37 °C	24 h a 37 °C	
3,0	+	+	+	
5,0	+	+	+	
6,2	+	+	+	
7,0	+	+	+	
8,4	+	+	+	
9,1	-	-	-	
10,0				

EXEMPLO 7

A suscetibilidade de *Campylobacter* spp. às preparações purificadas das bacteriocinas 760 e 50-52 foi determinada usando cepas isoladas a partir de frangos de corte, como descrito acima no Exemplo 1. A atividade antagonística das bacteriocinas foi avaliada na base de concentrações inibitórias mínimas (MICs) que foram determinadas por difusão em ágar. A Tabela 7 abaixo indica as MICs de bacteriocinas para as cepas testadas. Todas as bacteriocinas testadas são altamente antagonísticas para as cepas de *Campylobacter* spp. A cepa 760 é mito mais ativa do que aquelas remanescentes com MICs entre cerca de 0,05 a cerca de 0,1 μg/mL.

Tabela 7

MICs de Bacteriocinas para as Cepas de *Campylobacter* spp.

Cepas	MICs (ug/mL)				
	OR7	B1580	B37	760	E 50-52
P-24	1,6	0,8	0,8	0,05	0,05
P-32	0,08	0,08	1,6	0,05	0,1
P-27	0,8	0,8	0,8	0,05	0,1
I/U-1	1,6	0,4	1,6	0,05	0,05
P-31	3,2	1,6	0,8	0,05	0,1
P-28	0,4	3,2	0,8	0,05	0,1
G-2	0,8	1,6	0,8	0,05	0,1
G-1	0,8	1,6	0,8	0,05	0,05
Ind18/2	0,4	1,6	3,2	0,05	0,05
Cez-4	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1
P-21	0,8	0,4	0,4	0,1	0,05
K-10	0,4	0,4	1,6	0,05	0,05
F-1	0,2	0,8	3,2	0,05	0,1
B-3	0,1	1,6	0,2	0,05	0,05
P-2	0,1	0,4	0,4	0,05	0,05

EXEMPLO 8

A suscetibilidade de bactérias gram-positivas e gram-negativas às bacteriocinas 760 e 50-52 foi determinada usando um teste de mancha descrito no Exemplo 3. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 8 e 9. Como se observa a partir da Tabela 8, a bacteriocina 760 tem um amplo espectro e alto nível de atividade antagonística. A bacteriocina inibe o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Sua MIC para as cepas do teste fica na faixa entre cerca de 0,1 μg/mL e cerca de 3,2 μg/mL. Como observado na Tabela 9, a bacteriocina 50-52 tem um amplo espectro e alto nível de atividade antagonística. A bacteriocina inibe o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Sua MIC para as cepas do teste fica na faixa entre cerca de 0,1 μg/mL e cerca de 3,2 μg/mL.

Tabela 8

Atividade Antibacteriana da Bacteriocina 760 Determinada pelo Teste de Mancha

*

(inserir tabela da pg. 34 do original)

Cepas do Teste

MIC, mg/mL

Tabela 8

Atividade Antibacteriana da Bacteriocina 50-52 Determinada pelo Teste de Mancha

*

(inserir tabela da pg. 35 do original)

Cepas

MIC, μg/mL

EXEMPLO 9

As concentrações inibitórias mínimas (MICs) das bacteriocinas 760 e 50-52 e meticilina foram determinadas pelo teste de mancha. Várias concentrações de bacteriocinas purificadas (μg/mL) em um volume de 10 μL foram adicionadas às culturas de *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa,* e *Helicobacter pylori.* As culturas foram incubadas por 24 horas a cerca de 37 °C sob condições aeróbicas para todas exceto *Helicobacter pylori* que foi incubada sob condições microaeróbicas. Os resultados estão indicados abaixo na Tabela 10.

Tabela 10

MIC de bacteriocinas para *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa,* e *Helicobacter pylori*

Bacteriocina ou Antibiótico	MIC de Bacteriocinas Purificadas e Antibiótico (μg/mL)			
	S. aureus	*S. epidermidis*	*P. aeruginosa*	*H. pylori*
760	1,6	1,6	0,4	0,2
50-52	0,1	0,4	0,8	0,8
Meticilina	52,5	64,8	78,4	93,8

A descrição detalhada precedente é com propósito ilustrativo. Tal detalhe é meramente com este propósito e os versados nessas técnicas podem fazer variações sem fugir do espírito e âmbito da invenção.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF AGRICULTURE
State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

<120> "CEPAS DE ENTEROCOCCUS E STREPTOCOCCUS E BACTERIOCINAS INUSITADAS"

<130> 800-245WO

<150> PCT/US06/014938
<151> 19/04/2006

<160> 2

<170> PatentIn versão 3.5

<210> 1
<211> 39
<212> PRT
<213> Enterococcus faecium

<400> 1

Thr Thr Lys Asn Tyr Gly Asn Gly Val Cys Asn Ser Val Asn Trp Cys
1 5 10 15

Gln Cys Gly Asn Val Trp Ala Ser Cys Asn Leu Ala Thr Gly Cys Ala
20 25 30

Ala Trp Leu Cys Lys Leu Ala
35

<210> 2
<211> 53
<212> PRT
<213> Streptococcus cricetus

<400> 2

Asn Arg Trp Tyr Cys Asn Ser Ala Ala Gly Gly Val Gly Gly Ala Ala
1 5 10 15

Val Cys Gly Leu Ala Gly Tyr Val Gly Glu Ala Lys Glu Asn Ile Ala
20 25 30

Gly Glu Val Arg Lys Gly Trp Gly Met Ala Gly Gly Phe Thr His Asn
35 40 45

Lys Ala Cys Lys Ser
50

PI 0621581-5

PCT. 0400500036492

REIVINDICAÇÕES

1. Bacteriocina isolada produzida por uma cepa de *Enterococcus* ou uma cepa de *Streptococcus*, **CARACTERIZADO** pelo fato de que tem as características identificadoras de uma cepa selecionada do grupo que consiste em NRRL B-30746 e NRRL B-30745.

2. Bacteriocina, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que tem uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

3. Bacteriocina, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que tem uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

5. Cepa de *Enterococcus faecium* isolada, **CARACTERIZADA** pelo fato de que tem as características identificadoras de NRRL B-30746.

6. Cepa de *Streptococcus cricetus* isolada, **CARACTERIZADA** pelo fato de que tem as características identificadoras de NRRL B-30745.

7. Composição terapêutica, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende:

(a) pelo menos uma bacteriocina isolada produzida por uma cepa de *Enterococcus* ou uma cepa de *Streptococcus* tendo as características identificadoras de uma cepa selecionada do grupo que consiste em NRRL B-30746, NRRL B-30745, e misturas delas, em uma quantidade eficaz para pelo menos reduzir os níveis de colonização em pelo menos uma bactéria-alvo; e

(b) um veículo terapêutico apropriado.

8. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a bacteriocina tem uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, ou misturas delas.

9. Ração terapêutica para animais, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende:

(a) pelo menos uma bacteriocina isolada produzida por uma cepa de *Enterococcus* ou uma cepa de *Streptococcus* tendo as características identificadoras de uma cepa selecionada no grupo que consiste em NRRL B-30746, NRRL B-30745, e misturas delas,

em quantidades eficazes para pelo menos reduzir os níveis de colonização em pelo menos uma bactéria-alvo;

(b) um veículo terapêutico, e

(c) uma ração animal.

10. Ração terapêutica, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita pelo menos uma bacteriocina tem uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 1, SEQ ID: 2, e misturas delas.

11. Método para pelo menos reduzir o nível de colonização em pelo menos uma bactéria alvo em um animal, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

administrar a um animal uma composição terapêutica que compreende pelo menos

uma bacteriocina isolada produzida por uma cepa de *Enterococcus* ou uma cepa de *Streptococcus,* que tendo as características identificadoras de uma cepa selecionada do grupo que consiste em NRRL B-30746, NRRL B-30745, e misturas delas, em quantidades eficazes para pelo menos reduzir os níveis de colonização em pelo menos uma bactéria-alvo; e um veículo terapêutico.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita pelo menos uma bacteriocina tem uma seqüência de aminoácidos selecionada no grupo que consiste em SEQ ID NO: 1, SEQ ID: 2, e misturas delas.

13. Cepa de *Lactococcus lactis* isolada, **CARACTERIZADA** pelo fato de que tem as características identificadoras de NRRL B-30744.

14. Método para aumentar a produção de bacteriocinas em bactérias, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) adicionar uma quantidade intensificadora de bacteriocina de *Lactococcus lactis* que tem as características identificadoras de NRRL B-30744 a uma cultura de uma bactéria produtora de bacteriocina, para formar uma co-cultura, e

(b) cultivar a dita co-cultura a cerca de 37 °C.

15. Método para isolar uma bacteriocina, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) co-cultivar uma bactéria produtora de bacteriocina com uma bactéria indutora para produzir bacteriocina em um meio de cultura,

(b) colher o dito meio de cultura e as células por centrifugação, para obter um sobrenadante e um pélete celular,

(c) aplicar o dito sobrenadante que contém bacteriocina a uma coluna de cromatografia por interação hidrofóbica, para obter uma preparação de bacteriocina isolada,

(d) incubar o dito pélete celular da etapa (b) em um tampão de eluição, para formar uma primeira mistura,

(e) separar as células do dito pélete celular e do tipo tampão por centrifugação,

(f) isolar a bacteriocina do dito tampão por cromatografia de troca iônica.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita cromatografia de troca iônica usa uma coluna de Superose SP FF.

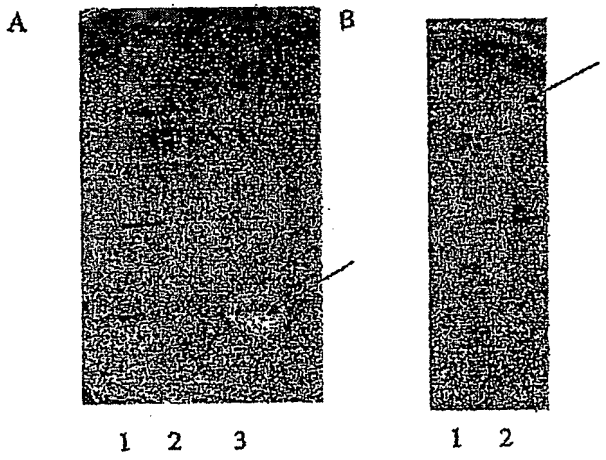

FIG. 1

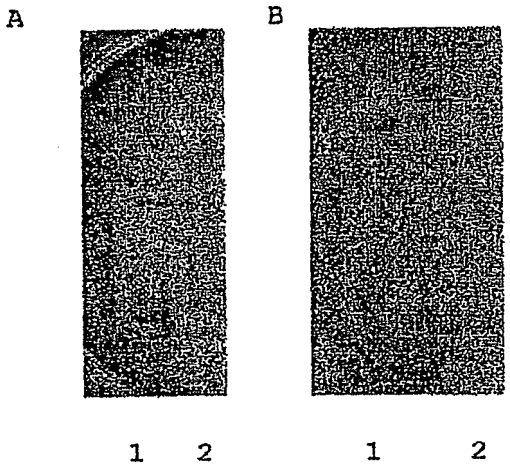

FIG. 2

PI0621581-5

RESUMO

"CEPAS DE ENTEROCOCCUS E STREPTOCOCCUS E BACTERIOCINAS"

Esta invenção refere-se a bacteriocinas de *Enterococcus* e *Streptococcus* inusitadas produzidas por cepas de *Enterococcus* e *Streptococcus* inusitadas que são usadas para pelo menos reduzir os níveis de colonização em pelo menos uma bactéria-alvo em animais, especialmente aves.