



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 263 598**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/04** (2006.01)  
**G01N 33/569** (2006.01)  
**C07K 14/01** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01913568 .0**  
86 Fecha de presentación : **01.02.2001**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1356080**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **29.10.2003**

54 Título: **Detección e identificación de grupos de bacterias.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.12.2006**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.12.2006**

73 Titular/es: **Profos AG.**  
**Josef-Engert-Strasse 9**  
**93053 Regensburg, DE**

72 Inventor/es: **Miller, Stefan**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 263 598 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Detección e identificación de grupos de bacterias.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección simultánea de diferentes bacterias, que comprende los pasos siguientes: acoplamiento de una o varias clases de proteínas de la cola de bacteriófagos a un soporte, incubación del soporte acoplado con las proteínas de la cola de bacteriófagos con una muestra, dado el caso eliminación de la muestra y de las bacterias de la muestra que no se han unido a la proteína de la cola de bacteriófagos, puesta en contacto de las bacterias unidas a la proteína de la cola de bacteriófagos con los bacteriófagos y/o proteínas de bacteriófagos unidos específicamente a las bacterias que se tienen que detectar, eliminación de los bacteriófagos y/o proteínas de bacteriófagos que no se han unido a bacterias, realización de la reacción de detección mediante un enzima acoplado a los bacteriófagos y/o proteínas de bacteriófagos de unión específica o mediante detección inmunológica.

15 La detección rápida y exacta de bacterias es imprescindible para los controles de higiene y calidad de materias primas y productos alimentarios procesados, así como para el control de la higiene y calidad del agua doméstica e industrial y de la calidad del agua de los lugares de baño públicos. Además, la detección sirve para el seguimiento y optimización de procesos, así como los controles de calidad en análisis medioambiental.

20 A pesar del enorme interés económico, hasta el momento los procedimientos de análisis usados, como los métodos "BAM" (Bacteriological Analytical Manual) requieren de mucho tiempo, personal y equipamiento. Los gérmenes potencialmente patógenos se enriquecen secuencialmente en medios selectivos y no selectivos y se detectan en medios de cultivo apropiados. Por regla general incluye controles bioquímicos y serológicos, de modo que el procedimiento completo requiere de 3 a 4 días. Para determinados estudios, por ejemplo, en el seguimiento de la higiene, puede ser necesario detectar grupos enteros de bacterias en lugar de especies particulares de bacterias. Aunque también puede ser importante que, por ejemplo, la proporción de bacterias patógenas en un grupo sea muy grande. Los ensayos sólo pueden ser realizados por personal entrenado en microbiología, en laboratorios equipados correspondientemente. Esto tiene como consecuencia que actualmente las grandes empresas sólo analizan bacterias coliformes en sus instalaciones, aunque envían fuera todos los ensayos necesarios, entre otros la detección de gérmenes patógenos. La detección de coliformes se emplea esencialmente como seguimiento de la higiene, y por regla general se realiza mediante procedimientos clásicos de cultivo y por tanto dura al menos dos días.

35 La detección de bacterias se realiza a partir de muestras biológicas, la mayoría de veces con ayuda de una combinación de métodos de cultivo. Especialmente para una caracterización precisa se recurre además a la técnica de la tipificación con fagos (en inglés: "phage-typing"). De este modo se combinan los métodos de cultivo con la sensibilidad de las bacterias frente a los bacteriófagos de tipificación. Los bacteriófagos se emplean desde hace unos 80 años en la tipificación con fagos, pudiéndose determinar con ayuda de fagos de clasificación especiales cepas de bacterias según esquemas estandarizados. Sobre una placa de agar una capa gruesa de bacterias de la muestra a investigar, que se obtuvo mediante el aislamiento de colonias individuales y a continuación el crecimiento de las mismas, se cubre con suspensión de bacteriófagos en agar blando. El resultado se obtiene tras incubación durante la noche a la temperatura de crecimiento óptima para las bacterias, que normalmente asciende a 37°C en la mayoría de casos, mediante recuento de las placas y los controles de la morfología de las placas.

45 Los métodos alternativos más nuevos, sin utilizar medios de cultivo, se basan sobretudo en tecnologías de ADN y anticuerpos. En el enfoque mencionado en primer lugar las bacterias se unen a filtros y se hibrida el ADN de las bacterias con sondas de ADN apropiadas que emiten una señal de medida o bien el ADN bacteriano amplificado se secuencia directamente por PCR. Por ejemplo, la publicación de Bennet y col., Journal of Applied Microbiology 1977, 83 259-265, trata sobre las salmonelas, que mediante bacteriófagos específicos de las salmonelas, que se inmovilizaron sobre un soporte, se pueden enriquecer a partir de una muestra y detectarse por PCR.

50 En la patente WO 93/17129 se da a conocer un procedimiento, con el que se detectan bacterias en una muestra, uniéndose un bacteriófago a la bacteria que se tiene que detectar. Los bacteriófagos se unen con una primera mitad de un par específico de unión. La segunda mitad del par de unión está unido a un soporte. La detección de las bacterias específicas se realiza entonces a través de la unión de la primera y la segunda mitad del par de unión, de manera que entonces las bacterias se detectan mediante un marcador, que a su vez está acoplado al bacteriófago o al soporte.

60 En la tecnología ELISA se unen bacterias o partes de bacterias con ayuda de anticuerpos monoclonales y se detectan mediante sondas enzimáticas que se acoplan a un anticuerpo secundario. Ambos métodos requieren asimismo gastos técnicos elevados y se debe realizar previamente un paso de enriquecimiento para conseguir las  $10^4$  a  $10^6$  células por ml necesarias. Con ello, el ahorro de tiempo en comparación con los métodos convencionales es tan pequeño que los métodos mencionados apenas se aplican.

65 El uso de bacteriófagos como "bio-sorbentes" para la unión de las bacterias que se tienen que detectar tiene algunas ventajas decisivas frente al nuevo procedimiento. Los sistemas fagos-bacterias han evolucionado en la naturaleza durante largos periodos de tiempo, de manera que los fagos reconocen sus bacterias huésped de forma altamente específica y con elevada afinidad de unión, incluso en entornos complejos como los que existen en la naturaleza, e incluso en productos alimenticios. Mediante el nuevo procedimiento descrito aquí, resultan innecesarios los cultivos de enriquecimiento costosos en tiempo en los que frecuentemente también se enriquecen gérmenes no deseados para la

detección, como por ejemplo cultivos vacuna. Sin embargo, en los sistemas descritos hasta ahora para la detección de bacterias basados en fagos, es desventajoso que la mayor parte de veces reconozcan especies particulares de bacterias de forma altamente específica y por tanto no se puedan utilizar para una detección de grupos, familias o varias especies de bacterias.

5

Por eso, la invención se basa en el objetivo de proporcionar un procedimiento de detección para bacterias con el que se puedan detectar simultáneamente diferentes especies de bacterias. Otro objetivo de la invención consiste en la preparación de proteínas de la cola de bacteriófagos, que presentan una unión de bacterias más ventajosa para el procedimiento de detección.

10

El objetivo se alcanza mediante el objeto definido en las reivindicaciones de la patente.

La invención se explica mediante las siguientes figuras.

15

La Fig. 1A y B muestra esquemáticamente una detección específica para grupos. (1A): La proteína de la cola de bacteriófagos (1) se une mediante la biotina (2) a la estreptavidina (3) en una unión covalente con la matriz (4). Las bacterias de los grupos que se tiene que reconocer (5) se unen específicamente a las proteínas de la cola de bacteriófagos (1). (1B): Tras un paso de lavado se detectan las bacterias unidas (5) mediante la misma proteína de la cola de bacteriófagos (1), aunque esta vez se acopla a un enzima (6), por ejemplo peroxidasa. hv significa la emisión de señal que se puede seguir, por ejemplo, por absorción.

20

La Fig. 2A y B muestra esquemáticamente una detección específica para grupos. (2A): La proteína de la cola de bacteriófagos (1) se une mediante la biotina (2) a la estreptavidina (3) en una unión covalente con la matriz (4). Las bacterias de los grupos que se tiene que reconocer (5) se unen específicamente a las proteínas de la cola de bacteriófagos (1). (2B): Tras un paso de lavado se detectan las bacterias unidas (5) mediante bacteriófagos específicos de cada cepa (7, 8, 9), que se acoplan con un enzima (6), por ejemplo peroxidasa. hv significa la emisión de señal que se puede seguir, por ejemplo, por absorción.

25

La Fig. 3A muestra la secuencia de ADN de las fibras cortas de la cola (p12) de la cepa de fagos T4D (ID. SEC. N°: 2). La Fig. 3 B muestra la secuencia de aminoácidos de esta variante (ID. SEC. N°: 1). La secuencia de ácidos nucleicos según ID. SEC. N°: 4 y la secuencia de aminoácidos según ID. SEC. N°: 3 están subrayadas. En la secuencia de ácidos nucleicos las mayúsculas representan cambios de bases frente a la secuencia salvaje T4 p12 número de acceso Swiss-Prot. P10930).

30

La expresión “coliforme” usada aquí designa un subgrupo de entero-bacterias que se caracterizan por utilizar lactosa o expresar el enzima  $\beta$ -galactosidasa.

35

La expresión “grupo de bacterias” usada aquí designa una agrupación de determinadas bacterias que pueden estar dentro de una familia, o un género o una especie, etc. aunque también se pueden superponer.

40

La expresión “derivado” usada aquí designa secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, que frente a la secuencia de comparación presentan modificaciones en forma de una o varias deleciones, sustituciones, adiciones, inserciones y/o inversiones.

45

La expresión “fragmentos” usada aquí designa partes de secuencias de aminoácidos así como las secuencias de ácidos nucleicos que codifican para estas secuencias de aminoácidos, mientras presenten la función biológica de las secuencias de aminoácidos según la invención.

50

Por eso un aspecto de la presente invención consiste en la preparación de un procedimiento para la detección simultánea de diferentes bacterias, que comprende los pasos siguientes: acoplamiento de una o varias clases de proteínas de la cola de bacteriófagos a un soporte, incubación del soporte acoplado con las proteínas de la cola de bacteriófagos con una muestra, dado el caso eliminación de la muestra y de las bacterias de la muestra que no se han unido a la proteína de la cola del bacteriófago, puesta en contacto de las bacterias unidas a la proteína de la cola del bacteriófago con los bacteriófagos y/o proteínas de bacteriófagos unidos específicamente a las bacterias que se tienen que detectar, eliminación de los bacteriófagos y/o proteínas de bacteriófagos que no se han unido a bacterias, realización de la reacción de detección mediante un enzima acoplado a los bacteriófagos y/o proteínas de bacteriófagos de unión específica o mediante detección inmunológica.

55

Para el procedimiento según la invención se usan proteínas de la cola de bacteriófagos, que son específicas para las bacterias deseadas que se tienen que detectar. Las proteínas de la cola de bacteriófagos son específicas para varias especies de bacterias. Las bacterias que se tienen que detectar pueden ser familias enteras de bacterias, uno o varios géneros completos de bacterias, especies determinadas de bacterias de un género bacteriano, especies determinadas de bacterias de varios géneros bacterianos o similares. Las bacterias que se pueden detectar con el procedimiento según la invención pueden proceder, por ejemplo, de la familia de las Enterobacteriaceae. Con preferencia se detectan bacterias del género *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Morganella*, *Providencia*, *Yersinia*, *Hafnia* y/o *Edwardstiella*, con especial preferencia *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y/o *Citrobacter*. Con preferencia las bacterias que se tienen que detectar son de las especies, *Escherichia spec.*, *Salmonella spec.*, *Shigella spec.*, *Klebsiella spec.*, *Enterobacter spec.*, *Citrobacter spec.*,

65

## ES 2 263 598 T3

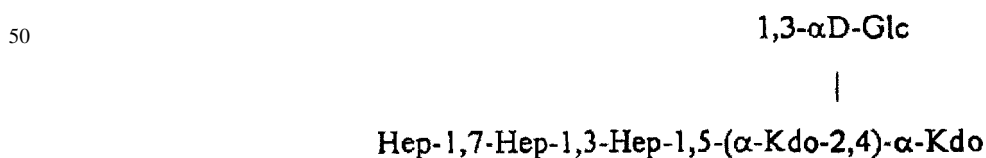
*Proteus spec., Serratia spec., Morganella spec., Providencia spec., Yersinia spec., Hafnia spec., Edwardsiella spec.*  
y/o *Pseudomonas spec.*

5 A modo de ejemplo, para el usuario, por ejemplo, de la industria lechera o de bebidas, es irrelevante caracterizar las contaminaciones bacterianas serológicamente y por cepas específicas. Sólo es importante la información general, por ejemplo, si en el transcurso de la producción aparecen gérmenes extraños en la instalación o si los procesos de eliminación de gérmenes han tenido éxito. Las bacterias coliformes sirven por regla general como indicador de la higiene. Así, una forma de realización especial del procedimiento según la invención es la detección de bacterias coliformes, especialmente de los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*,  
10 *Proteus*, *Serratia*, *Morganella*, *Providencia*, *Yersinia*, y/o *Hafnia Edwardsiella*.

Las proteínas de la cola de bacteriófagos que se usan dependen de qué especies, grupos o familias de bacterias se deban detectar. Para la detección específica de grupos según la invención se emplean proteínas de la cola de bacteriófagos que reconocen y se unen a receptores específicos de grupos. Así se puede usar cualquier proteína de la cola del fago que presenta un espectro de reconocimiento correspondiente. Son preferibles proteínas de la cola de bacteriófagos de la familia Myoviridae, Podoviridae y Siphoviridae, especialmente las proteínas cortas de la cola de fagos de “fagos T pares”, por ejemplo, T4, T2 o K3, especialmente las proteínas cortas de la cola de fagos p12 de T4, p12 de T2 (número de acceso GenBank X56555), p12 de K3 (véase Burda y col., 2000, Biol. Chem., Vol. 381, pág. 255 - 258,) o las proteínas de la cola de bacteriófagos del fago Felix 01, P1 o PB1. Se unen por ejemplo las proteínas cortas de la cola de bacteriófagos de los fagos T4 (p12) y P1 a coliforme, la proteína corta de la cola de fagos de Felix 01 a salmonelas y la proteína corta de la cola de fagos de PB1 a pseudomonas. Por ejemplo, *el fago de salmonelas Felix 01* (F01) reconoce hasta el 99% de todas las salmonelas y se puede usar para la detección de salmonelas de un grupo específico. Las proteínas de la cola de bacteriófagos del PB1 se pueden usar para una detección de pseudomonas de un grupo específico.

25 Cómo se deben unir las proteínas de la cola de bacteriófagos con las bacterias individuales se explica aquí a modo de ejemplo en los “fagos T pares”, por ejemplo, T4, T2, K3. En este grupo, en el lado del huésped hay dos componentes que son reconocidos por los fagos: en primer lugar una proteína de superficie específica para fagos individuales, en segundo lugar el lipopolisacárido (LPS) que poseen todas las bacterias gram negativas en forma modificada. Las fibras largas de la cola de los “fagos T pares” juegan un papel en el reconocimiento específico de las bacterias huésped, mientras el LPS sirve de receptor para las fibras cortas de la cola. En los fagos T4 de *E. coli* se sabe que la interacción específica con la bacteria huésped a través de las fibras largas de la cola es irreversible, en cuanto las fibras cortas de la cola también se hayan unido a la superficie de las bacterias. La fibra corta de la cola no es responsable de la especificidad precisa dentro del grupo de bacterias huésped y por eso se puede intercambiar entre los diferentes “fagos T pares”.

Las fibras cortas de la cola, junto con los “Tail Pins” toman parte en el llamado paso de “Pinning”, en el que tiene lugar la unión irreversible del fago en LPS sobre la superficie del huésped. Para la unión al LPS, p12 requiere una estructura de heptoazúcares con al menos una glucosa  $\alpha$  unida, como la que se encuentra en la zona del núcleo interno de la pared celular de enterobacterias. Las diferentes fosforilaciones de los azúcares que aparecen frecuentemente, la disponibilidad de sustituciones con pirofosfatidiletanolamina o también las ramificaciones de la región heptosa no parecen jugar ningún papel. Aunque los liposacáridos de las cepas individuales de bacterias se diferencian mucho en las cadenas laterales O-específicas -lo que se utiliza para la tipificación serológica- pero también en las regiones externas del núcleo, la variancia en la zona interna del núcleo es mucho menos acentuada. Todas las regiones del núcleo enterobacteriano presentan a modo de ejemplo los dos siguientes azúcares: ácido 3-desoxi-D-mano-octurónico (Kdo) y L-glicero-D-mano-heptopiranososa (Hep), que constituyen el siguiente oligosacárido característico en la zona interna del núcleo:



La heptosa central está sustituida por regla general en O3 y lleva entre otros en *Escherichia coli*, así como en *Salmonella entérica*, *Shigella spp.*, *Hafnia spp.*, *Citrobacter spp.* y *Erwinia spp.* Una  $\alpha$ D-glucosa unida en 1,3. En esa posición *Klebsiella*, *Proteus* y *Yersinia* presentan o bien galactosa o una N-acetilfucosamina y no son reconocidas por p12. Sin embargo, *Klebsiella* es reconocida, por ejemplo, por la proteína corta de la cola de bacteriófago del fago P1.

Las proteínas de la cola de bacteriófagos, sus derivados, variantes o fragmentos se pueden producir y aislar fácilmente en grandes cantidades por recombinación. Sin embargo, para el procedimiento según la invención no sólo pueden usarse las proteínas de la cola de bacteriófagos que se encuentran en la naturaleza, sino también sus variantes. La expresión “variantes” en el sentido de la presente invención significa que las proteínas de la cola de bacteriófagos presentan una secuencia de aminoácidos cambiada frente a la secuencia salvaje. Las variantes existentes en la naturaleza se pueden encontrar mediante los procedimientos de screening habituales. Entre las variantes se cuentan además proteínas de la cola de bacteriófagos preparadas sintéticamente. Los polipéptidos preparadas sintéticamente se pueden

## ES 2 263 598 T3

preparar por ejemplo mediante mutagénesis dirigida o aleatoria. Mediante la mutagénesis se pueden introducir modificaciones, que pueden ser adiciones, deleciones, sustituciones, inversiones o inserciones de aminoácidos. Las proteínas de la cola de bacteriófagos pueden presentar además modificación química, como por ejemplo mutilaciones o acetilaciones. Las modificaciones pueden tener como resultado una especificidad por el huésped modificada, especialmente mejorada, y también una propiedad de unión con la matriz mejorada, por ejemplo, incrementar o hacer irreversible la unión de las bacterias a las proteínas de fagos aisladas, para mejorar las posibilidades de lavado.

Además, en un procedimiento de detección se pueden emplear una o varias proteínas de la cola de bacteriófagos, si las bacterias que se tienen que detectar no se pueden detectar mediante una única proteína de la cola del bacteriófago. Por ejemplo, las proteínas cortas de la cola de bacteriófagos del fago T4 (p12) y P1 que poseen un espectro de huésped insignificamente distinto se pueden usar para detectar simultáneamente, además de los géneros de bacterias *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter* y *Erwinia* reconocidos por ambas proteínas de la cola de bacteriófagos, el género *Hafnia* reconocido solamente por T4 p12, y los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter* sólo reconocidos por la proteína corta de la cola de bacteriófagos del fago P1. Además, puede ser ventajoso para la detección de salmonelas utilizar la proteína corta de la cola de fagos de Felix 01 con otras proteínas de la cola de bacteriófagos, ya que hasta ahora se han descrito 2500 serovares de salmonelas (subtipos de bacterias que pueden ser diferentes según las características serológicas, por ejemplo, variaciones de LPS en el antígeno O). Las proteínas de la cola de bacteriófagos que se usan para la detección dependen finalmente de qué especies, grupos o familias de bacterias se deban detectar.

Con preferencia, la proteína de la cola de bacteriófagos es una variante de la proteína salvaje p12 según ID. SEC. N°: 1, con especial preferencia según ID. SEC. N°: 3. La invención describe además las secuencias de ácidos nucleicos según ID. SEC. N°: 2 y 4.

ID. SEC. N°: 1 representa la secuencia de aminoácidos de la variante de p12 que existe en la naturaleza, llamada T4D p12. Esta proteína de la cola de bacteriófagos presenta una estabilidad muy elevada frente al calor (Punto medio de desnaturalización: 78°C) y los medios desnaturalizantes químicos (Burda y col., 2000, Biol. Chem., Vol. 381, pág. 255 - 258).

Sorprendentemente se ha encontrado que un fragmento resistente a la proteasa de esta variante p12, se une aproximadamente 10 veces más rápido a las células bacterianas en comparación con las proteínas p12 completas. Además, la variante p12 completa se descompone mediante la digestión de la proteasa del extremo N sensible a la temperatura, de manera que el fragmento resistente a la proteasa presenta, entre otras cosas, una gran estabilidad a largo plazo. La secuencia de aminoácidos del fragmento resistente a la proteasa se indica en ID. SEC. N°: 3, la secuencia de ácidos nucleicos en ID. SEC. N°: 4. Un aspecto de la presente invención describe la secuencia de aminoácidos según ID. SEC. N°: 3 o sus derivados, y la secuencia de ácidos nucleicos según ID. SEC. N°: 4 o sus derivados. Otro aspecto de la presente invención describe además fragmentos y sus derivados de ID. SEC. N°: 1, con preferencia con la secuencia de residuos de aminoácidos 1-500, 1-450, 40-500, 40-450, 270-400, 270-390, 280-400 y 280-390, con especial preferencia el fragmento según la ID. SEC. N°: 3, así como las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los respectivos fragmentos y derivados.

Otro aspecto de la presente invención describe anticuerpos poli- y monoclonales frente a la secuencia de aminoácidos según ID. SEC. N°: 3.

Para la detección según la invención, las proteínas de la cola de bacteriófagos se inmovilizan sobre estructuras de soporte apropiadas, por ejemplo, placas de microtitulación, aros de ensayo, portaobjetos, obleas, materiales de filtro o cámaras de células de infiltración. Las estructuras de soporte pueden consistir, por ejemplo, en poliestireno, polipropileno, policarbonato, PMMA, acetato de celulosa, nitrocelulosa, vidrio, obleas de silicio. La inmovilización se puede conseguir, por ejemplo, por adsorción o enlace covalente. Es importante una inmovilización funcional, es decir, pese a la unión con el material de soporte, las proteínas de la cola de bacteriófagos disponen de estructuras accesibles para las bacterias.

Para la supresión de una reacción inespecífica de las bacterias que se tienen que investigar con los materiales de soporte se puede realizar un bloqueo con albúmina sérica bovina o Tween 20 o similares de las sustancias, por ejemplo Milch en polvo, conocidos en la técnica ELISA. Además, para aumentar la eficiencia de la adsorción, los sistemas de soporte se pueden recubrir previamente con proteínas apropiadas (por ejemplo, anticuerpos específicos frente a proteínas de fagos o proteínas inespecíficas, como por ejemplo albúmina sérica bovina), péptidos, sacáridos (por ejemplo, mono-, oligo-, o polisacáridos) o detergentes (por ejemplo, Tween 20 u octilglucósido). Estos recubrimientos se pueden realizar por ejemplo o bien durante la noche a una temperatura en el intervalo de 4-20°C o en 2-4 h a 30-65°C. A continuación se extrae el líquido sobrante y la estructura de soporte se seca a aproximadamente 60-70°C. Por un lado, el recubrimiento base debe garantizar una adsorción de las proteínas de la cola de bacteriófagos y por otro lado debe impedir una adsorción inespecífica de las bacterias estudiadas en la estructura de soporte, para aumentar la eficiencia del ensayo.

Las proteínas de la cola de bacteriófagos se disponen junto al recubrimiento base. Para ello se aplica una disolución acuosa tamponada de las proteínas de la cola de bacteriófagos sobre la estructura de soporte pre-tratada. Tras la adsorción, por ejemplo a 4-20°C durante la noche o a 30-65°C durante 2-4 h, se extrae la disolución de recubrimiento y se seca la estructura de soporte como se describe arriba. Para aumentar la eficiencia del recubrimiento se puede

## ES 2 263 598 T3

realizar posteriormente una fijación covalente de las proteínas de la cola de bacteriófagos con crosslinkers como por ejemplo glutaraldehído.

5 La inmovilización de proteínas de la cola de bacteriófagos en el material de soporte mediante adsorción se puede realizar por incubación de una disolución de fagos en tampón acuoso, por ejemplo Tris 100 mM pH 7.3 o fosfato sódico 100 mM pH 7.5, durante varias horas o durante la noche a 5°C hasta 45°C, con preferencia a 15°C hasta 37°C, con especial preferencia a 20°C hasta 37°C, en el mejor de los casos a temperatura ambiente.

10 Además, las proteínas de la cola de bacteriófagos no se tienen que inmovilizar directamente sobre el soporte, sino que se pueden unir a polipéptidos que se inmovilizan por su parte sobre el soporte. Estos polipéptidos pueden ser anticuerpos, lectinas, receptores o anticalinos específicos para las proteínas de la cola de bacteriófagos. Además, las proteínas de la cola de bacteriófagos pueden estar unidas a sustancias de bajo peso molecular, por ejemplo biotina, para unirse a polipéptidos, por ejemplo estreptavidina, a través de estas sustancias de bajo peso molecular, que por su parte se han inmovilizado sobre el soporte. De este modo los otros polipéptidos se pueden unir al soporte, como se describe anteriormente para las proteínas de la cola de bacteriófagos.

15 Mediante el acoplamiento covalente las proteínas de la cola de bacteriófagos se pueden acoplar, por ejemplo, mediante grupos amino o grupos carboxilo primarios en materiales de soporte ya activados por el fabricante, por ejemplo placas de microtitración de Nunc, Xenobind o Costar, mediante condiciones estándar, por ejemplo -NH<sub>2</sub>, mediante cloruro de cianurilo (Russian Chemical Rev., 1964, 33: 92-103), o -COO<sup>-</sup> mediante EDC (1-etil-3-[3'dimetilamino-propil]carbodiimida (Anal. Biochem. 1990, 185: 131-135). Además, los materiales de soporte se pueden activar con procedimientos apropiados. Una posibilidad, que es preferible a causa de la aplicabilidad para un amplio espectro de materiales de soporte, es la silanización del material de soporte. Por ejemplo, se puede realizar la silanización en poliestireno mediante pirólisis de llama. A continuación se aplican adhesivos apropiados que permiten un acoplamiento a través de, por ejemplo, grupos amino o carboxilo primarios.

20 Para la unión de las bacterias que se investigan sobre las proteínas de la cola de bacteriófagos inmovilizadas, la muestra de estudio en forma acuosa se pone en contacto y se incuba con las proteínas de la cola de bacteriófagos. La incubación se realiza en un intervalo de temperatura de 4 a 90°C, con preferencia a una temperatura en el intervalo de 4 a 45°C, con especial preferencia a una temperatura en el intervalo de 15 a 37°C, en el mejor de los casos a una temperatura en el intervalo de 20 a 37°C, especialmente a temperatura ambiente, durante 6 horas, con preferencia hasta 4 horas, con especial preferencia 2 horas, en especial 1 hora, en el mejor de los casos 1 a 20 minutos. Por ejemplo, la incubación se puede realizar en 2 a 120 min a 4°C hasta 37°C, con preferencia durante 20 a 30 minutos a 25°C o 37°C, con especial preferencia durante 35 minutos a 37°C. Tras el reconocimiento específico y la unión estable de las bacterias, el material no unido se puede eliminar por lavado con agua tampón, por ejemplo, con PSB p PBS-Tween, con preferencia a valor de pH neutro, por ejemplo en fosfato sódico 50 mM pH 7,0. Al tampón usado se pueden añadir, dado el caso para el aumento de la eficiencia de lavado, detergentes, por ejemplo Tween 20, Tritón X 100 o agentes caotrópicos, por ejemplo, clorhidrato de guanidinio o urea. Este paso de lavado se puede realizar varias veces, dependiendo del material de ensayo.

30 Para la detección de las bacterias unidas a las proteínas de la cola de bacteriófagos se usan bacteriófagos o proteínas de la cola de bacteriófagos. Para la detección se pueden usar bacteriófagos específicos o una combinación de diferentes bacteriófagos, cuando se deben detectar específicamente una o varias especies de bacterias. Por ejemplo, las bacterias coliformes existentes en una muestra se unen mediante las proteínas de la cola de bacteriófagos inmovilizadas. Mediante bacteriófagos específicos se pueden detectar especies particulares de bacterias o mediante una combinación de diferentes bacteriófagos se pueden detectar varias especies de bacterias. Con especial preferencia se usan que se han inmovilizado en la matriz para unir las bacterias que se tiene que detectar. Para la detección al anticuerpo, bacteriófago o proteína de la cola de bacteriófagos se le acopla un marcador, por ejemplo FITC, peroxidasa o fosfatasa alcalina, pudiéndose seguir el desarrollo de la señal del marcador tras añadir un sustrato fotométrico. Los genes para la proteína de la cola de bacteriófagos se pueden clonar en vectores de expresión apropiados y de este modo se pueden modificar adicionalmente según la aplicación, por ejemplo, mediante la fusión con un enzima de detección.

35 Según sea necesario, se detecta por ejemplo por fluorescencia, luminiscencia, absorción o dicroísmo circular, conductividad o variaciones de capacidad de las muestras respectivas en los correspondientes aparatos de medida estándar. Para una determinación exacta de la concentración de bacterias se puede realizar una recta de calibración con las correspondientes moléculas estándar.

40 La detección de las bacterias unidas a las proteínas de la cola de bacteriófagos se puede realizar además usando un ensayo colorimétrico. Así se detecta, por ejemplo, el NADH, la actividad  $\beta$ -galactosidasa o el fosfato inorgánico. Estos ensayos permiten la detección de al menos 10<sup>4</sup> células por ml, mediante el uso de colorantes de fluorescencia la sensibilidad se puede mejorar hasta 10<sup>2</sup> a 10<sup>3</sup> células por ml.

45 Los ensayos colorimétricos pueden ser iguales para todas las bacterias que se estudian, aunque también pueden ser específicos para determinadas combinaciones de bacterias/ proteínas de la cola de bacteriófagos. La selección del marcador, por ejemplo, del enzima empleado o el marcador de fluorescencia se puede ajustar a los respectivos géneros o especies de bacterias estudiados.

## ES 2 263 598 T3

Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un kit para la detección de bacterias, que comprende un soporte con proteínas de la cola de bacteriófagos inmovilizadas y las disoluciones necesarias con los reactivos de ensayo para la detección de las bacterias unidas. Los soportes pueden ser todos los descritos anteriormente, en los que se inmovilizan las proteínas de la cola de bacteriófagos como se describe anteriormente. Las disoluciones con los reactivos de ensayo se corresponden asimismo con las que se han descrito para la detección de bacterias en el procedimiento según la invención. El kit puede contener además, dado el caso, disoluciones de lavado, así como los enzimas o detergentes necesarios para la apertura de la membrana bacteriana.

Los ejemplos siguientes explican la invención y no se deben considerar limitantes. Mientras no se indique lo contrario, se usan métodos estándar de biología molecular, como por ejemplo, los descritos por von Sambrook y col., 1989, *Molecular cloning: A Laboratory Manual* 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

### Ejemplo 1

#### *Aislamiento y clonación de T4D p12, K3 p12 y T2 p12*

T4D p12, K3 p12 y T2 p12 se aislaron y clonaron como se describe en Burda y col., 2000, *Biol. Chem.*, Vol. 381, pág. 255-258. T4D p12 se limpió correspondientemente y se empleó con adyuvante de Freud para la inmunización de conejos. El antisuero policlonal obtenido reconoció tanto T4D p12 como dominios resistentes a la proteasa.

### Ejemplo 2

#### *Digestión con proteasa de T4D p12 y preparación recombinante*

Mediante digestión con proteasa a diferentes temperaturas (véase Chen & King, 1991, Danner y col., 1993) se obtuvieron los dominios de p12 resistentes a la proteasa y a continuación se purificaron mediante una cromatografía de gel filtración normal. La terminación N se determinó por degradación de Edman y se analizó la terminación C por espectroscopia de masas. Para la secuencia de ADN de los dominios obtenidos se proyectaron los primers discontinuos con un codón de inicio y uno de parada. En un PCR normal con ADNc de la variante T4D p12 se amplificó ADNc de los dominios resistentes a la proteasa y a continuación se clonó en un vector. Este mutante se expresó a continuación en *E. coli* BL21 DE3 como trímero nativo y se aisló de la fracción de membrana por extracción con EDTA (véase Burda & Miller, 1999, *Eur. J. Biochem.* 265, 771-778), realizándose las extracciones en presencia de al menos EDTA 100 mM.

### Ejemplo 3

#### *Detección específica de grupos mediante la propia $\beta$ -galactosidasa bacteriana*

Para ello se inmoviliza p12 (300 ng/pocillo en 150  $\mu$ l de PBS 100 mM ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 mM,  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  16 mM, NaCl 115 mM); placa de 96 pocillos) sobre un sistema de soporte, una placa de microtitración de poliestireno por adsorción a 37°C en diferentes periodos de tiempo (1 h, 2 h, 4 h, 16 h, 48 h) y a continuación el portador se bloquea con BSA 1%, Tween 20 0,5% en PBS 100 mM durante 60 min. Con ello, se incubaron (60 min, 37°) diferentes sustancias de muestra con bacterias (*E. coli* spec., *Citrobacter* spec., en medio LB, Milch o Gülle), a continuación se eliminó la muestra mediante lavado con PBS (3-4x con PBS 100 mM, Tween 20 0,5%, cada 250  $\mu$ l para medio LB, Milch, para Gülle 4-6x) y las bacterias unidas se detectaron mediante la propia  $\beta$ -galactosidasa bacteriana con  $\beta$ -gal-luminol (Tropix, Applied Biosystems) según las indicaciones del fabricante. El ensayo permite, según la selección del sustrato, una sensibilidad por debajo de 100 células/ml en total en menos de 4 horas.

### Ejemplo 4

#### *Detección específica de grupos mediante marcador*

Para ello se inmoviliza p12 (300 ng/pocillo en 150  $\mu$ l de PBS 100 mM ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 mM,  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  16 mM, NaCl 115 mM); placa de 96 pocillos) sobre un sistema de soporte, una placa de microtitración de poliestireno por adsorción a 37°C en diferentes periodos de tiempo (1 h, 2 h, 4 h, 16 h, 48 h) y a continuación el portador se bloquea con BSA 1%, Tween 20 0,5% en PBS 100 mM durante 60 min. Con ello, se incubaron (60 min, 37°) diferentes sustancias de muestra con bacterias (*E. coli* spec., *Citrobacter* spec., en medio LB, Milch o Gülle), a continuación se eliminó la muestra mediante lavado con PBS (3-4x con PBS 100 mM, Tween 20 0,5%, cada 250  $\mu$ l para medio LB, Milch, para Gülle 4-6x). A continuación se acopló la proteína de la cola de fagos biotinilada con peroxidasa acoplada con estreptavidina. Este complejo se introdujo en las bacterias unidas y se incubó durante periodos de tiempo diferentes (10 min, 20 min, 30 min, 60 min). Tras lavar, 3-4x con PBS 100 mM, Tween 20 0,5%, cada 250  $\mu$ l, se detectaron las bacterias unidas usando el kit ECL de Amersham según las indicaciones del fabricante. De esta manera se detectaron por debajo de 1000 células por ml.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la detección simultánea de diferentes bacterias, que comprende los pasos siguientes:

- a. acoplamiento de una o varias clases de proteínas de la cola de bacteriófagos a un soporte,
- b. incubación del soporte acoplado con las proteínas de la cola de bacteriófagos con una muestra,
- c. dado el caso eliminación de la muestra y de las bacterias de la muestra que no se han unido a la proteína de la cola de bacteriófagos,
- d. puesta en contacto de las bacterias unidas a la proteína de la cola de bacteriófagos con los bacteriófagos y/o proteínas de bacteriófagos unidos específicamente a las bacterias que se tienen que detectar,
- e. eliminación de los bacteriófagos y/o proteínas de bacteriófagos que no se han unido a bacterias,
- f. realización de la reacción de detección mediante un enzima acoplado a los bacteriófagos y/o proteínas de bacteriófagos de unión específica o mediante detección inmunológica.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, acoplándose las proteínas de la cola de bacteriófagos al soporte mediante adsorción, enlace químico o mediante otras proteínas.

3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, uniéndose las proteínas de la cola de bacteriófagos biotinizadas y mediante estreptavidina o variantes estreptavidina/avidina.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, siendo las proteínas de la cola de bacteriófagos T4 p12, T2 p12, K3 p12 o las proteínas cortas de la cola de bacteriófagos de los fagos Felix 01, P1 o PB1 o sus derivados o fragmentos.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, presentando las proteínas de la cola de bacteriófagos la secuencia de aminoácidos según ID. SEC. N°:1 ó 3.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, presentando modificaciones las proteínas de la cola de bacteriófagos.

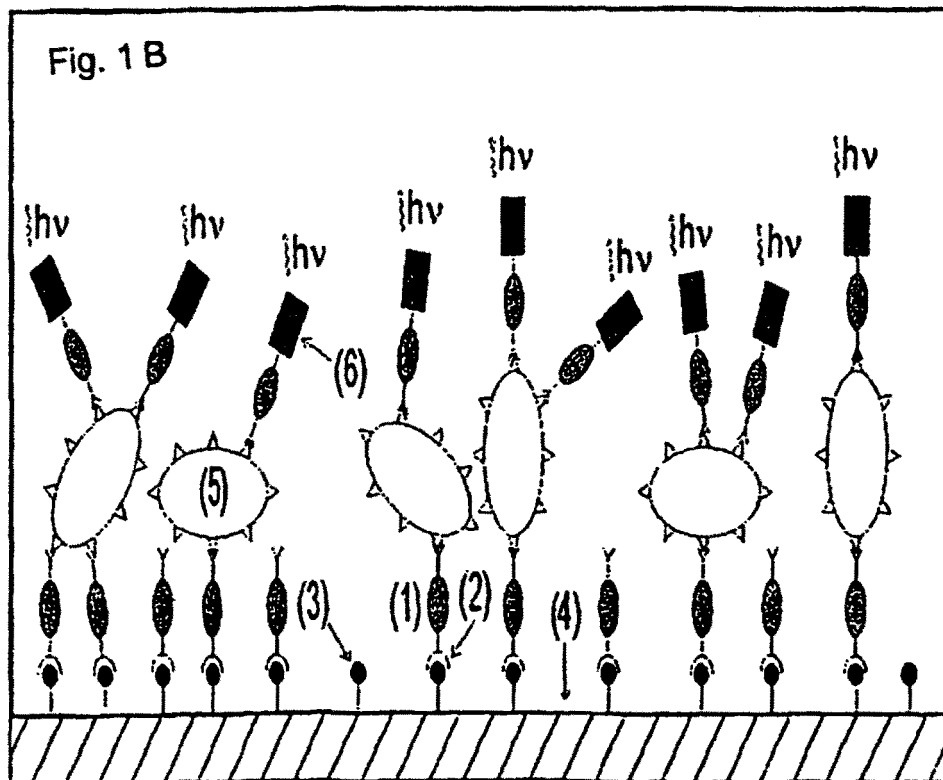
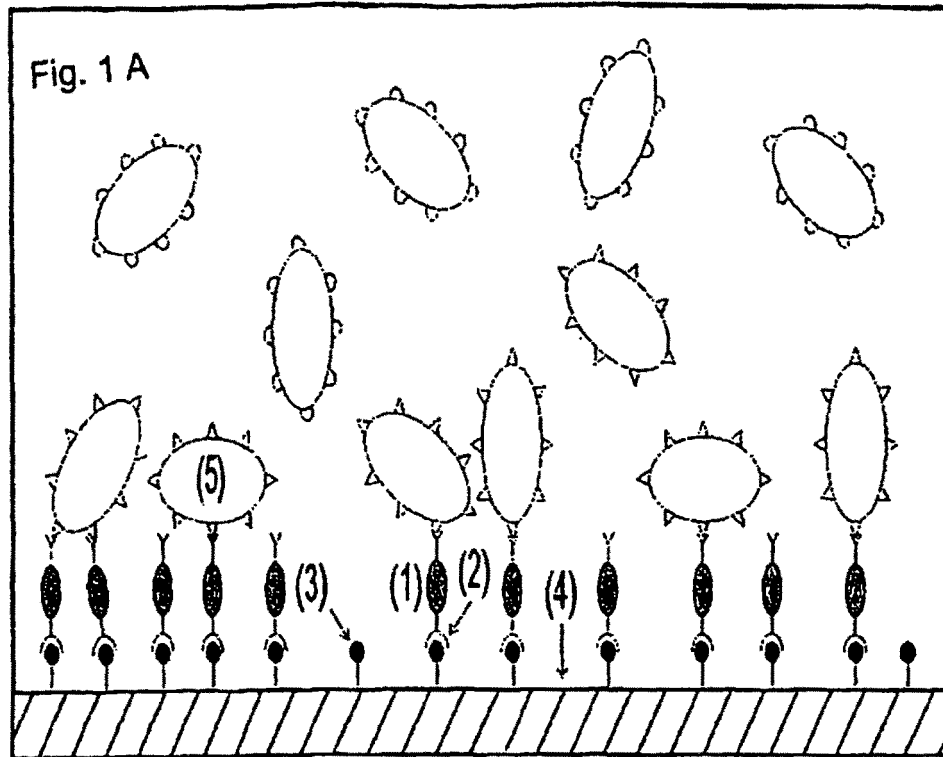
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, reconociendo las proteínas de la cola de bacteriófagos de una única especie o varias especies de fagos, al menos dos especies y/o géneros de bacterias diferentes.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, siendo el soporte una placa de microtitración, un aro de ensayo, portaobjetos, obleas, material de filtro o una cámara de células de infiltración y componiéndose de poliestireno, polipropileno, policarbonato, PMMA, acetato de celulosa, nitrocelulosa, vidrio, obleas de silicio.

9. Uso del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8 para la detección de bacterias en medicina, industria alimentaria y análisis alimentario, alimentación animal, análisis de agua potable o medio ambiental.

10. Kit para la realización del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende un soporte con proteínas de la cola de bacteriófagos inmovilizadas, además los bacteriófagos y/o proteínas de bacteriófagos que se unen específicamente a las bacterias que se tienen que detectar y otros reactivos de ensayo para la detección de las bacterias unidas.





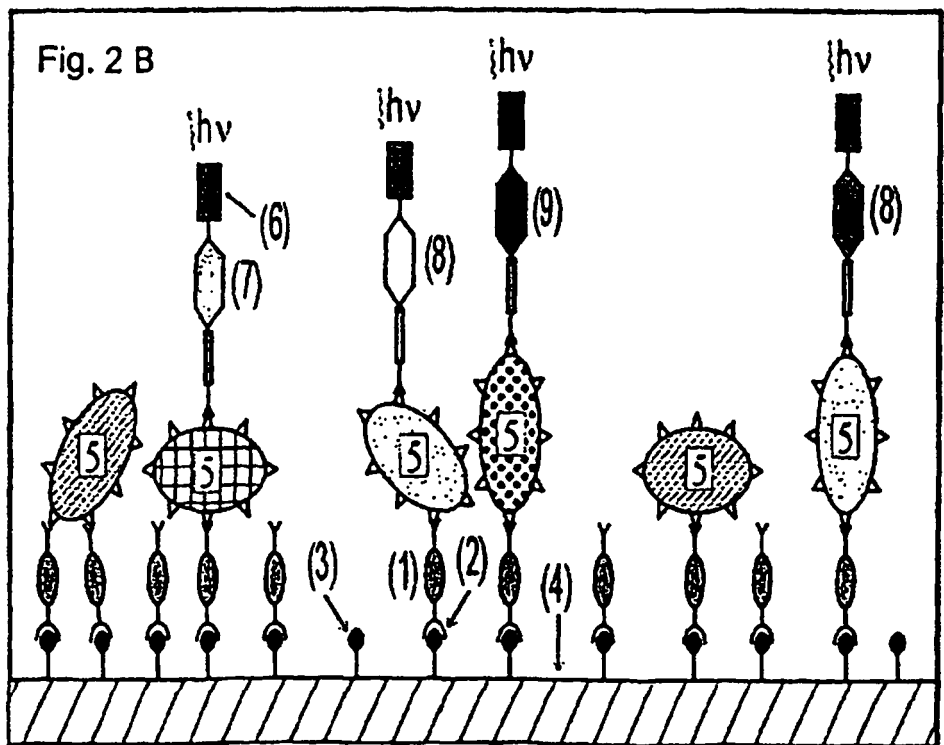
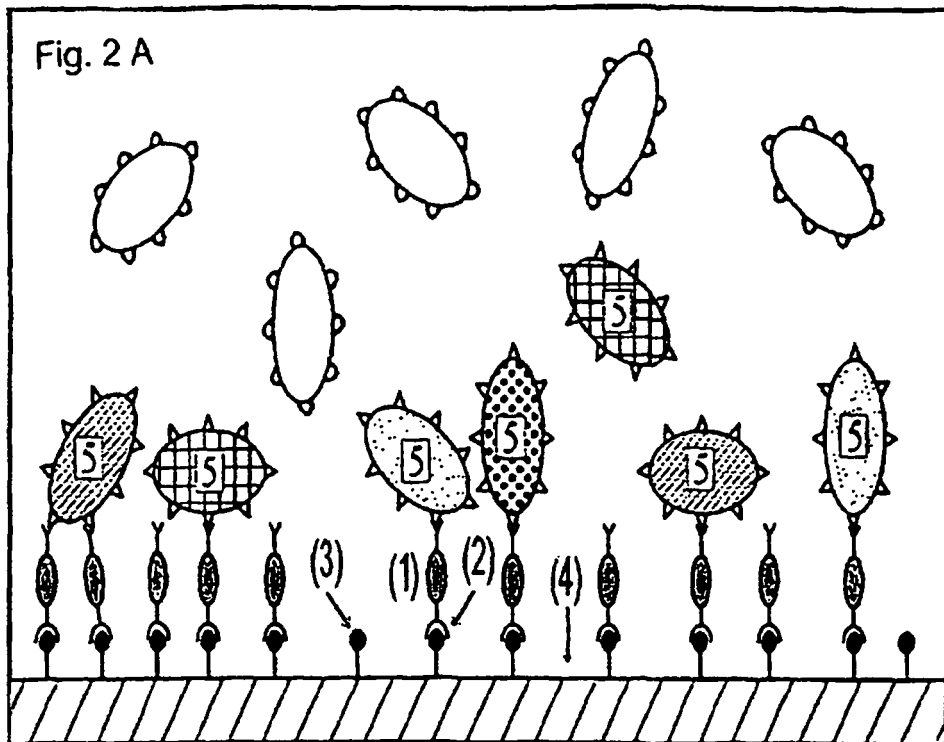


Fig. 3 A

agtaata atacatatca acacgtttct aatgaatctc gttatgtaaa  
 51 atttgatcct accgatacga atttccacc ggagattact gatgttcacg  
 101 ctgctatagc agccatttct cctgctggCg taaatggagt tcctgatgca  
 151 tcgtcaacaa caaagggaaat tTtatttCtt Gccactgaac aggaagttat  
 201 agatggaact aataatacca aagcagttac accagcaacg ttggcaacaa  
 251 gattatcAta tccaaaCgca actgaaaGtg tttacggatt aacaagatat  
 301 tcaaccGatg atgaagccat tgccggagtt aataatgaat cttctataac  
 351 tccagctaaa tttactgtTg cTcttaataa tgTTtttgaa acTcgTgttt  
 401 caactgaatc AtcaaatggG gttattaanaa tttcatctTt accgcaagca  
 451 ttGgcAggtg cagatgatac tactgcaatg actccattaa aacacaAca  
 501 AttagctGtt aaattGattg cgcaaattgc tccttctAaa aATGcTgcta  
 551 cAgaatcTga GcaaggtgtA AttcaGttag cTacagtagc AcaggCtcgt  
 601 cagggaaactt taagagaagg AtaCgcaatt tctccttata cgtttatgaa  
 651 ttcTActGct actgaagaat ataaaggcgt aattaaatta ggaacGcaat  
 701 cagaagttaa ctccaataat gttctgttg cggttactgg Agcaactctt  
 751 aatggctcgtg gttctacgac gtcaatgaga ggcgtagtta aattaaactac  
 801 aaccgccggt tcacagagtg gaggcgatgc ttcacagcc ttagcttggg  
 851 atgctgacgt tatccaCcaa agaggCggtc aaaCtatTAA tggaacactT  
 901 cgcattAaTA aTacGCttac aatagctTCA ggtggGgcaa atattacCgg  
 951 AacAgtTaAC atgactggcg gttatattca aggtaaAcgc Gtcgtaacac  
 1001 aaaatgaaat tgatagaact attcctgtcg gagctattat gatgtgggcc  
 1051 gctgatagtc ttcctagtga tgcttggcgT ttTtgccaCg gtggaactgt  
 1101 ttcagcgtca gattgtccat tatatgcttc tagaattgga acaagatatg  
 1151 gcggaAGcTc atcaaatcct ggattgcctg acatgcgCgg tctttttggt  
 1201 cgtggCtctg gCcggtggCtc tcaTttaaca aatccaaatg ttaatggtaa  
 1251 tgaccaattt ggtaaaccta gattaggtgt aggttgtacT ggtggatag  
 1301 ttggtgaagt acagaAacaa cagatgtctt atcataaaca tgctggtgga  
 1351 tttggtgagT atgatgatTC Tggggcattc ggtaatacTc gtagatcaaa  
 1401 ttttgttggg acacgtaaag gacttgactg ggataaccgt tcatacttca  
 1451 cTaatgacgg Gtatgaaatt gaccagCat cacaacgaaa ttccaGatat  
 1501 acattaaatc gtcctgaatt aattggaat gaaacacgtc catggaacat  
 1551 ttctttaaac tacataatta aggtaaaaga a

Fig. 3 B

MSNNTYQHVS NESRYVKFDP TDTNFPPEIT DVHAAIAAIS  
PAGVNGVPDA SSTTKGILFL ATEQEVIDGT NNTKAVTPAT  
LATRLSYPNA TESVYGLTRY STDDEAIAGV NNESSITPAK  
FTVALNNVFE TRVSTESSNG VIKISSLPQA LAGADDTTAM  
TPLKTOQLAV KLIAQIAPSK NAATESEQGV IQLATVAQAR  
QGTLREGYAI SPYTFMNSTA TEEYKGVIKL GTQSEVNSNN  
ASVAVTGATL NGRGSTTSMR GVVKLTTTAG SQSGGDASSA  
LAWNADVHQ RGGQTINGTL RINNTLTIAS GGANITGTVN  
MTGGYIQGKR VVTQNEIDRT IPVGAIMMWA ADSLPSDAWR  
FCHGGTVSAS DCPLYASRIG TRYGGSSSNP GLPDMRGLFV  
RGSGRGSHLT NPNVNGNDQF GKPRLGVGCT GGYVGEVQKQ  
QMSYHKHAGG FGEYDDSGAF GNTRRSNFVG TRKGLDWDNR  
SYFTNDGYEI DPASQRNSRY TLNRPELIGN ETRPWNISLN  
YIIKVKE

# ES 2 263 598 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> PROFOS GmbH

<120> Detección e identificación de grupos de bacterias

<130> PRO-002 PCT

<140> XX

<141> 2001-02-01

<160> 4

<170> Patent in ver. 2.1

<210> 1

<211> 527

<212> PRT

<213> Bacteriófago T4D

<400> 1

Met Ser Asn Asn Thr Tyr Gln His Val Ser Asn Glu Ser Arg Tyr Val  
1 5 10 15

Lys Phe Asp Pro Thr Asp Thr Asn Phe Pro Pro Glu Ile Thr Asp Val  
20 25 30

His Ala Ala Ile Ala Ala Ile Ser Pro Ala Gly Val Asn Gly Val Pro  
35 40 45

Asp Ala Ser Ser Thr Thr Lys Gly Ile Leu Phe Leu Ala Thr Glu Gln  
50 55 60

Glu Val Ile Asp Gly Thr Asn Asn Thr Lys Ala Val Thr Pro Ala Thr  
65 70 75 80

Leu Ala Thr Arg Leu Ser Tyr Pro Asn Ala Thr Glu Ser Val Tyr Gly  
85 90 95

Leu Thr Arg Tyr Ser Thr Asp Asp Glu Ala Ile Ala Gly Val Asn Asn  
100 105 110

# ES 2 263 598 T3

Glu Ser Ser Ile Thr Pro Ala Lys Phe Thr Val Ala Leu Asn Asn Val  
                   115                                  120                                  125

5

Phe Glu Thr Arg Val Ser Thr Glu Ser Ser Asn Gly Val Ile Lys Ile  
           130                                  135                                  140

10

Ser Ser Leu Pro Gln Ala Leu Ala Gly Ala Asp Asp Thr Thr Ala Met  
 145                                  150                                  155                                  160

15

Thr Pro Leu Lys Thr Gln Gln Leu Ala Val Lys Leu Ile Ala Gln Ile  
                                   165                                  170                                  175

20

Ala Pro Ser Lys Asn Ala Ala Thr Glu Ser Glu Gln Gly Val Ile Gln  
                                   180                                  185                                  190

25

Leu Ala Thr Val Ala Gln Ala Arg Gln Gly Thr Leu Arg Glu Gly Tyr  
           195                                  200                                  205

30

Ala Ile Ser Pro Tyr Thr Phe Met Asn Ser Thr Ala Thr Glu Glu Tyr  
           210                                  215                                  220

35

Lys Gly Val Ile Lys Leu Gly Thr Gln Ser Glu Val Asn Ser Asn Asn  
 225                                  230                                  235                                  240

40

Ala Ser Val Ala Val Thr Gly Ala Thr Leu Asn Gly Arg Gly Ser Thr  
                                   245                                  250                                  255

45

Thr Ser Met Arg Gly Val Val Lys Leu Thr Thr Thr Ala Gly Ser Gln  
                                   260                                  265                                  270

50

Ser Gly Gly Asp Ala Ser Ser Ala Leu Ala Trp Asn Ala Asp Val Ile  
                                   275                                  280                                  285

55

His Gln Arg Gly Gly Gln Thr Ile Asn Gly Thr Leu Arg Ile Asn Asn  
           290                                  295                                  300

60

Thr Leu Thr Ile Ala Ser Gly Gly Ala Asn Ile Thr Gly Thr Val Asn  
 305                                  310                                  315                                  320

65

Met Thr Gly Gly Tyr Ile Gln Gly Lys Arg Val Val Thr Gln Asn Glu

ES 2 263 598 T3

5 Ile Asp Arg Thr Ile Pro Val Gly Ala Ile Met Met Trp Ala Ala Asp  
 340 345 350  
 Ser Leu Pro Ser Asp Ala Trp Arg Phe Cys His Gly Gly Thr Val Ser  
 10 355 360 365  
 Ala Ser Asp Cys Pro Leu Tyr Ala Ser Arg Ile Gly Thr Arg Tyr Gly  
 15 370 375 380  
 Gly Ser Ser Ser Asn Pro Gly Leu Pro Asp Met Arg Gly Leu Phe Val  
 20 385 390 395 400  
 Arg Gly Ser Gly Arg Gly Ser His Leu Thr Asn Pro Asn Val Asn Gly  
 25 405 410 415  
 Asn Asp Gln Phe Gly Lys Pro Arg Leu Gly Val Gly Cys Thr Gly Gly  
 30 420 425 430  
 Tyr Val Gly Glu Val Gln Lys Gln Gln Met Ser Tyr His Lys His Ala  
 35 435 440 445  
 Gly Gly Phe Gly Glu Tyr Asp Asp Ser Gly Ala Phe Gly Asn Thr Arg  
 40 450 455 460  
 Arg Ser Asn Phe Val Gly Thr Arg Lys Gly Leu Asp Trp Asp Asn Arg  
 45 465 470 475 480  
 Ser Tyr Phe Thr Asn Asp Gly Tyr Glu Ile Asp Pro Ala Ser Gln Arg  
 50 485 490 495  
 Asn Ser Arg Tyr Thr Leu Asn Arg Pro Glu Leu Ile Gly Asn Glu Thr  
 55 500 505 510  
 Arg Pro Trp Asn Ile Ser Leu Asn Tyr Ile Ile Lys Val Lys Glu  
 60 515 520 525

<210> 2

<211> 1578

<212> ADN

65 <213> Bacteriófago T4D

# ES 2 263 598 T3

<400> 2

```

5      agtaataata catatcaaca cgtttcta atgtaaaatt tgatccracc 60
      gatacgaatt ttccaccgga gattactgat gttcacgctg ctatagcagc catttctcct 120
      gctggcgtaa atggagttcc tgatgcatcg tcaacaacaa agggaatfff atttcttgcg 180
      actgaacagg aagttataga tggaaactaat aataccaaaag cagttacacc agcaacgctg 240
10     gcaacaagat tatcatatcc aaacgcaact gaaagtggtt acggattaac aagatattca 300
      accgatgatg aagocattgc cggagttaat aatgaatctt ctataactcc agctaaatff 360
      actgttgcgc ttaataatgt ttttgaaact cgtgttcaa ctgaatcacc aaatgggggt 420
15     attaaaatff catctttacc gcaagcattg gcaggtgcag atgatactac tgcaatgact 480
      ccattaaaaa cacacaatff agctgttaa ttgattgcgc aaattgctcc ttctaaaaat 540
      gctgctacag aatctgagca aggtgtaatt cagttagcta cagtagcaca ggctcgtcag 600
20     ggaactttaa gagaaggata cgaatttct cottatacgt ttatgaatfc tactgctact 660
      gaagaatata aaggcgtaat taaattagga acgcaatcag aagttaactc gaataatgct 720
      tctgttgccg ttactggagc aactcttaat gg-cgtgggt ctacgaagtc aatgagagcc 780
25     stagttaaat taactacaac cgcgggttca cagagtgagg gcgatgcttc atcagcetta 840
      gcttggaatg ctgacgttat ccaccaaaga ggcggtaaaa ctattaatgg aacacttcgc 900
      attaataata cgcttacaat agcttcaggt ggggcaaata ttaccggaac agttaacatg 960
30     actggcgggt atattcaagg taaacgcgtc gtaacacaaa atgaaattga tagaactatt 1020
      cctgtcggag ctattatgat gtgggccgct gatagtcttc ctagtgatgc ttggcgtttt 1080
      tgcacaggtg gaactgttcc agcgtcagat tgtccattat atgcttctag aattggaaca 1140
35     agatatggcg gaagctcacc aaatcctgga ttgcctgaca tgcgcgggtc tttgttccg 1200
      ggctctggcc gtggctctca tttacaacaa ccaaatgtta atggtaatga ccaatttgg 1260
      aaacctagat taggtgtagg ttgtactggg ggatatgttg gtgaagtaca gaaacaacag 1320
40     atgtcttacc ataaacatgc tgggtgattt ggtgagatg atgattctgg gccattcgg 1380
      aatactcgta gatcaaatff tgttggtaca cgtaaaggac ttgactggga taaccgttca 1440
      tacttcaact atgacgggta tgaattgac ccagcatcac aacgaaatfc cagatataca 1500
45     ttaaactgtc ctgaattaat tggaaatgaa acacgtccat ggaacatttc tttaaactac 1560
      ataattaagg taaaagaa                                     1578

```

50 <210> 3

<211> 317

<212> PRT

<213> Secuencia sintética

55

<220>

<223> Descripción de la secuencia sintética: fragmento de polipéptido

60

65



# ES 2 263 598 T3

<400> 3

5	Leu Ser Tyr Pro	Asn Ala Thr Glu Ser Val Tyr Gly Leu Thr Arg Tyr			
	1	5	10	15	
10	Ser Thr Asp Asp	Glu Ala Ile Ala Gly Val Asn Asn Glu Ser Ser Ile			
	20	25	30		
15	Thr Pro Ala Lys Phe Thr Val Ala Leu Asn Asn Val Phe Glu Thr Arg				
	35	40	45		
20	Val Ser Thr Glu Ser Ser Asn Gly Val Ile Lys Ile Ser Ser Leu Pro				
	50	55	60		
25	Gln Ala Leu Ala Gly Ala Asp Asp Thr Thr Ala Met Thr Pro Leu Lys				
	65	70	75	80	
30	Thr Gln Gln Leu Ala Val Lys Leu Ile Ala Gln Ile Ala Pro Ser Lys				
	85	90	95		
35	Asn Ala Ala Thr Glu Ser Glu Gln Gly Val Ile Gln Leu Ala Thr Val				
	100	105	110		
40	Ala Gln Ala Arg Gln Gly Thr Leu Arg Glu Gly Tyr Ala Ile Ser Pro				
	115	120	125		
45	Tyr Thr Phe Met Asn Ser Thr Ala Thr Glu Glu Tyr Lys Gly Val Ile				
	130	135	140		
50	Lys Leu Gly Thr Gln Ser Glu Val Asn Ser Asn Asn Ala Ser Val Ala				
	145	150	155	160	
55	Val Thr Gly Ala Thr Leu Asn Gly Arg Gly Ser Thr Thr Ser Met Arg				
	165	170	175		
60	Gly Val Val Lys Leu Thr Thr Thr Ala Gly Ser Gln Ser Gly Gly Asp				
	180	185	190		
65	Ala Ser Ser Ala Leu Ala Trp Asn Ala Asp Val Ile His Gln Arg Gly				
	195	200	205		

ES 2 263 598 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

Gly Gln Thr Ile Asn Gly Thr Leu Arg Ile Asn Asn Thr Leu Thr Ile  
210 215 220

Ala Ser Gly Gly Ala Asn Ile Thr Gly Thr Val Asn Met Thr Gly Gly  
225 230 235 240

Tyr Ile Gln Gly Lys Arg Val Val Thr Gln Asn Glu Ile Asp Arg Thr  
245 250 255

Ile Pro Val Gly Ala Ile Met Met Trp Ala Ala Asp Ser Leu Pro Ser  
260 265 270

Asp Ala Trp Arg Phe Cys His Gly Gly Thr Val Ser Ala Ser Asp Cys  
275 280 285

Pro Leu Tyr Ala Ser Arg Ile Gly Thr Arg Tyr Gly Gly Ser Ser Ser  
290 295 300

Asn Pro Gly Leu Pro Asp Met Arg Gly Leu Phe Val Arg  
305 310 315

<210> 4

<211> 951

<212> ADN

<213> Secuencia sintética

<220>

<223> Descripción de la secuencia sintética: ADN

# ES 2 263 598 T3

<400> 4

```

5      ttatcatatc caaacgcaac tgaagtggt tacggattaa caagatattc aaccgatgat 60
      gaagccattg cgggagttaa taatgaatct tctataactc cagctaaatt tactgttgc 120
      cttaataatg tttttgaaac tegtgttca actgaatcat caaatgggg  tattaaaatt 180
      tcactctttac cgcaagcatt ggcaggltca gatgatacta ctgcaatgac tccattaaaa 240
10     acacaacaac tagctgttaa attgattgcg caaattgctc cttctaaaaa tgctgctaca 300
      gaatctgagc aaggtgtaat tcagttagct acagttagcac aggctcgtca gggaaacttta 360
      agagaaggat acgcaatttc tctttatagc tttatgaatt ctactgctac tgaagaatat 420
15     aaaggcgtaa ttaattagg aacgcaatca gaagttaact cgaataatgc ttctgttgcg 480
      gttactggag caactcttaa tggtcgtggt tctacgacgt caatgagagg cgtagctaaa 540
      ttaactacaa ccgccggttc acagagtgga ggcgatgctt catcagcctt agcttggaa 600

20
      gctgacgta tccaccaaa aggcgggtcaa actatbaatg gaacacttcc catttaaat 660
      acgcttacia tagcttcagg tggggcaaat attaccgaa cagttaacat gactggcggt 720
25     tataattcaag gtaaacgcgt cgtaacacaa aatgaaattg atagaactat tctgtctgga 780
      gctattatga tgtgggccc tgatagtctt cctagtgatg cttggcgttt ttgccacggg 840
      ggaactgttt cagcgtcaga ttgtccatta tatgcttcta gaattggaac aagatatggc 900
30     ggaagctcat caaatcctgg attgacctgac atgcgcggtc tttttgttcg t          951

35

40

45

50

55

60

65

```