



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 626**

51 Int. Cl.:

C12N 9/78 (2006.01)

C12N 9/80 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C07K 14/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06813511 .0**

96 Fecha de presentación : **17.08.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1917355**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2008**

54 Título: **Lisinas mutantes de Ply-GBS.**

30 Prioridad: **24.08.2005 US 710936 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.04.2011

73 Titular/es: **The Rockefeller University**
1230 York Avenue, Box 81
New York, New York 10021, US

72 Inventor/es: **Fischetti, Vincent, A. y**
Cheng, Qi

74 Agente: **Polo Flores, Carlos**

ES 2 357 626 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

Lisinas mutantes de Ply-GBS.

5 Esta invención se refiere a la identificación y el uso de enzimas líticas asociadas a fagos para detectar o destruir rápida y específicamente ciertas bacterias, tales como las bacterias estreptocócicas del grupo B (*Group B streptococci*, GBS).

Antecedentes

10 Los estreptococos del grupo B (GBS), o *Streptococcus agalactiae*, son una importante causa de infección bacteriana neonatal en los Estados Unidos (Baker, C. J., y M. S. Edwards, "Group B streptococcal infections", págs. 1091-1156 en J. Remington y J. O. Klein (ed.), *Infectious diseases of the fetus and newborn infants*, 5ª ed. The W. B. Saunders Co. Philadelphia, PA (2001)). Los GBS generalmente colonizan los tractos genital y gastrointestinal inferior en humanos, y pueden ser transmitidos verticalmente de la madre al hijo durante un parto vaginal normal. Las manifestaciones habituales de la enfermedad por GBS en neonatos incluyen septicemia, meningitis, neumonía e infecciones articulares. Aproximadamente el 21% de las mujeres embarazadas están colonizadas vaginalmente con GBS y un significativamente alto porcentaje de bebés desarrolla los síntomas asociados a la infección por GBS. Por ejemplo, aparece septicemia en 16 de cada 1.000 recién nacidos vivos de mujeres con colonización por GBS, mientras que sólo en 0,4 de cada 1.000 recién nacidos vivos de mujeres sin colonización por GBS (Regan, J. A., M. A. Klebanoff, R. P. Nugent & otros 7 autores. 1996. Colonization with group B streptococci in pregnancy and adverse outcome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174: 1354-1360).

25 La profilaxis antibiótica durante el parto (*intrapartum antibiotic prophylaxis*, IAP) es la prevención primaria sugerida por los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (*Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) porque puede reducir eficazmente la colonización neonatal por GBS y el comienzo temprano de la infección (Centros de Control y Prevención de Enfermedades, "Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective", *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 45: 1-24 (1996); y Centros de Control y Prevención de Enfermedades, "Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines from CDC", *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 51: 1-22 (2002)). La IAP se administra habitualmente a mujeres embarazadas colonizadas por GBS 4 h antes del parto para prevenir la transmisión vertical. Sin embargo, hay muchos lugares en el mundo en los que el cribado de cultivos de GBS no es rutinario para mujeres embarazadas, y la administración universal de antibióticos puede suponer una potencial amenaza para los neonatos. La resistencia a los antibióticos es otra preocupación importante porque ya se ha encontrado que algunas cepas clínicas de GBS son resistentes a eritromicina y clindamicina (Fernández, M., M. Hickman y C. J. Baker, "Antimicrobial susceptibilities of group B streptococci isolated between 1992 and 1996 from patients with bacteremia or meningitis", *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1517-1519 (1998); Centros de Control y Prevención de Enfermedades, "Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines from CDC", *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 51: 1-22 (2002)). Por lo tanto, hay una necesidad de una alternativa directa y eficaz a la IAP.

40 Una metodología prometedora en la detección y el tratamiento de bacterias patógenas es el uso de enzimas líticas de bacteriófagos como agentes bacteriolíticos. Las enzimas líticas de bacteriófagos responsables de la lisis del hospedador bacteriano también se conocen como lisinas. Muchas lisinas pueden romper rápidamente la pared celular bacteriana con objeto de liberar el fago de descendencia (Young, R. 1992. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol. Rev.* 56: 430-481). Estructuralmente, las lisinas se encuentran habitualmente como proteínas modulares con un dominio amino terminal que les confiere la actividad enzimática para un enlace de peptidoglucano, y un dominio carboxi terminal que les confiere una especificidad de unión a un epítipo de carbohidrato en la pared celular bacteriana (Loessner, M., K. Kramer, F. Ebel y S. Scherer, "C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates", *Mol. Microbiol.* 44: 335-349 (2002); López, R., E. García, P. García y J. L. García, "The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins?", *MicroB. Drug Resist.* 3: 199-211 (1997); López, R., M. P. González, E. García, J. L. García y P. García, "Biological roles of two new murein hydrolases of *Streptococcus pneumoniae* representing examples of module shuffling", *Res. Microbiol.* 151: 437-443 (2002); Sheehan, M. M., J. L. García, R. López y P. García, "The lytic enzyme of the pneumococcal phage Dp-1: a chimeric enzyme of intergeneric origin", *Mol. Microbiol.* 25: 717-725 (1997)). Se cree que las lisinas proporcionan al menos una de las siguientes actividades enzimáticas frente a un sustrato de peptidoglucano: muramidasa, glucosaminidasa, N-acetil-muramyl-L-alanina amidasa y endopeptidasas (Young, R., "Bacteriophage lysis: mechanism and regulation", *Microbiol. Rev.* 56: 430-481 (1992)). Puede aplicarse una lisina purificada a partir de un bacteriófago exógenamente para que afecte a la lisis bacteriana (Loeffler, J. M., D. Nelson y V. A. Fischetti, "Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase", *Science*. 294: 2170-2172 (2001); Loessner, M., G. Wendlinger y S. Scherer, "Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes", *Mol. Microbiol.* 16: 1231-1241 (1995); Loessner, M., S. K. Maier, H. Daubek-Puza, G. Wendlinger y S. Scherer, "Three *Bacillus cereus* bacteriophage endolysins are unrelated but reveal high homology to cell wall hydrolases from different bacilli", *J. Bacteriol.* 179: 2845-2851 (1997); Nelson, D., L. Loomis y V. A. Fischetti, "Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme", *Prot. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 98: 4107-4112 (2001)).

ES 2 357 626 T3

Las lisinas normalmente son muy específicas de la especie bacteriana a partir de la cual se aisló la lisina derivada del fago (Fischetti, V. A. 2003. Novel method to control pathogenic bacteria on human mucous membranes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 987: 207-214; Fischetti, V. A. 2001. Phage antibacterials make a comeback. *Nature Biotechnol.* 19: 734-735). Aunque la gama de bacterias que son el objetivo de las lisinas es menos restrictiva que el correspondiente bacteriófago, las lisinas todavía mantienen un grado de especificidad, teniendo unos efectos mínimos sobre otras bacterias, incluyendo organismos comensales. Aunque las gamas de hospedadores bacteriófagos son ampliamente restrictivas, reconociendo sólo un antígeno específico en su hospedador bacteriano, las lisinas de fagos son menos restrictivas, reconociendo una molécula de carbohidrato específica común a la especie particular de bacterias hospedadoras.

Se cree que es menos probable que aparezca resistencia bacteriana a las lisinas de fagos en comparación con la adsorción bacteriófaga por al menos dos razones: en primer lugar, la lisis bacteriana tras la exposición a la lisina es prácticamente inmediata, y no permite a las bacterias muchas posibilidades de mutación, y en segundo lugar, las lisinas se unen a moléculas altamente conservadas en la pared celular bacteriana que están bajo una presión selectiva para no mutar. Por el contrario, la resistencia bacteriana a muchos antibióticos a menudo es fácilmente identificada. Adicionalmente, el problema de la conversión lisogénica se reduce o elimina con las lisinas de fagos, y las pruebas y el tratamiento en animales pueden realizarse eficazmente usando lisinas.

Hay una continua necesidad de terapias y agentes eficaces en el diagnóstico y control de la contaminación, la colonización y la infección bacterianas. Además, los compuestos con efectos bactericidas pueden ser útiles en la descontaminación de bacterias en superficies y objetos inanimados. Las enzimas líticas bacteriófagas proporcionadas son útiles proporcionando agentes útiles en la detección o destrucción de bacterias estreptocócicas del grupo B (GBS).

Resumen

La presente invención se refiere a lisinas bacterianas que comprenden una variante del péptido PlyGBS con actividad de destrucción bacteriana. Por ejemplo, la variante del péptido PlyGBS puede ser una lisina mutante de PlyGBS con una actividad lítica destructora frente a las bacterias estreptocócicas del grupo B que es mayor que la actividad destructora del péptido de PlyGBS frente a las mismas bacterias.

Se desvelan lisinas con una actividad lítica mejorada frente a las células GBS en comparación con la actividad lítica de la enzima PlyGBS (SEQ ID NO: 1). Las lisinas mutantes hiperactivas de PlyGBS pueden proporcionar una mayor actividad destructora frente a las células GBS en comparación con la proteína PlyGBS sola, según se evidencia tanto en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*. Las lisinas pueden ser enzimas líticas mutantes derivadas de enzimas líticas mutantes de la proteína PlyGBS usando métodos de mutagénesis de ADN aplicados al gen plyGBS. También se identifican y caracterizan las enzimas mutantes polipeptídicas PlyGBS que muestran una actividad lítica incrementada frente a la proteína de GBS.

La actividad destructora de las lisinas de PlyGBS, tales como las lisinas mutantes de PlyGBS, puede cuantificarse realizando un ensayo de destrucción bacteriana *in vitro* descrito en el Ejemplo 3 a continuación, o realizando un ensayo de destrucción bacteriana *in vivo* descrito en el Ejemplo 4 a continuación. Una mutante hiperactiva de PlyGBS puede proporcionar una actividad lítica al menos de 1,5 veces hasta aproximadamente 40 veces mayor que la PlyGBS (SEQ ID NO: 1) frente a las células GBS, al menos una actividad lítica aproximadamente 14 veces hasta aproximadamente 40 veces mayor, o una actividad lítica al menos aproximadamente 25 veces hasta aproximadamente 40 veces mayor. Las lisinas mutantes hiperactivas de PlyGBS de la invención se eligen del grupo: PlyGBS 80 (SEQ ID NO: 3), PlyGBS 90-8 (SEQ ID NO: 4), PlyGBS 90-1 (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS 94 (SEQ ID NO: 8). La PlyGBS (SEQ ID NO: 1) contiene un dominio de endopeptidasa N-terminal [aminoácidos (aa) 1-107], un dominio de muramidasa central (aa 150-394) y una región C-terminal (aa 395-443). La mutante PlyGBS86-6 (SEQ ID NO: 2) (SEQ ID NO: 2) tiene un cambio en un aminoácido de ácido aspártico a ácido glutámico (D374E). La mutante PlyGBS80 (SEQ ID NO: 3) (aa 1-164) (SEQ ID NO: 3) y la mutante PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4) (aa 1-138) (SEQ ID NO: 4) son mutantes truncadas debido a codones de detención aportados por mutaciones terminadoras. La PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) (SEQ ID NO: 5) derivaba de una delección fuera de marco que eliminaba los pb 424-1255 en el gen plyGBS y como resultado, codifica los primeros 141 aminoácidos de PlyGBS más 13 aminoácidos adicionales (DGHALTIQSRRNG) debido al cambio de marco de la región C-terminal (pb 1256-1332) del gen plyGBS. La mutante hiperactiva de PlyGBS PlyGBS94 (SEQ ID NO: 8) (SEQ ID NO: 8) contiene el dominio de endopeptidasa N-terminal (primeros 146 aminoácidos) y es similar a la mutante PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4) (primeros 138 aminoácidos) (SEQ ID NO: 4). Se observó un nivel similar de actividad lítica en estas dos mutantes. La PlyGBS95 (SEQ ID NO: 9) (SEQ ID NO: 9) tiene una delección dentro de marco del dominio de muramidasa central (delección entre los 147-348).

También se desvelan las estructuras de ciertas lisinas mutantes de PlyGBS. Muchas mutantes hiperactivas de PlyGBS incluyen mutantes de truncamiento que contienen sólo el dominio de endopeptidasa de la región N-terminal de PlyGBS y representan aproximadamente un tercio de la longitud de la PlyGBS natural (SEQ ID NO: 1). Estas mutantes pueden tener un aumento de 25-40 veces en las actividades específicas en comparación con la PlyGBS, y también pueden tener un espectro de actividad similar frente a diversas especies estreptocócicas. La PlyGBS tiene dos dominios catalíticos putativos y un dominio C-terminal no asignado. La comparación de las mutantes de PlyGBS PlyGBS95 (SEQ ID NO: 9) (SEQ ID NO: 9) y PlyGBS94 (SEQ ID NO: 8) (SEQ ID NO: 8) indica que la delección del C-terminal no tiene un efecto significativo sobre su especificidad o sobre la actividad lítica. Las mutantes hiperactivas de PlyGBS PlyGBS94 (SEQ ID NO: 8) (SEQ ID NO: 8), PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4) (SEQ ID NO: 4) pueden tener truncamientos en las regiones central y C-terminal, y parecen ser

similares a la lisozima en que sólo tienen un dominio catalítico sin un dominio de unión a la pared celular. El dominio de endopeptidasa presente en estas mutantes es prácticamente idéntico al dominio CHAP identificado recientemente en otra enzima lítica procedente de GBS B30, PlyGBS (SEQ ID NO: 1) (Pritchard, D. G., S. Dong, J. R. Baker y J. A. Engler, "The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30", de Microbiology 150: 2079-2087 (2004)). Sin embargo, el propio dominio CHAP en estas mutantes truncadas no es sólo activo frente a GBS, sino que tiene una actividad significativamente incrementada (de 25 a 40 veces) con respecto a la PlyGBS natural (SEQ ID NO: 1). Aunque los dominios CHAP están ampliamente presentes en muchas lisinas de fagos, no se ha informado de que ninguno de estos dominios CHAP tenga una actividad lítica sin la asociación de un dominio de unión a la pared celular.

Se han comparado las características bioquímicas de las mutantes hiperactivas de PlyGBS, tales como la estabilidad durante el almacenamiento y el pH óptimo, con la PlyGBS (SEQ ID NO: 1). La mutante PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) (SEQ ID NO: 5) tiene su actividad óptima cuando la concentración salina es de 50-100 mM, mientras que la concentración óptima de NaCl para la PlyGBS natural (SEQ ID NO: 1) es de aproximadamente 200 mM. Notablemente, la mutante PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) (SEQ ID NO: 5) mantiene su actividad lítica frente a todas las especies de estreptococos que son sensibles a PlyGBS (SEQ ID NO: 1), aunque la mutante PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) (SEQ ID NO: 5) contiene sólo un tercio de la PlyGBS natural (SEQ ID NO: 1).

Las mutantes hiperactivas de PlyGBS son más activas líticamente que la PlyGBS y pueden destruir GBS a una velocidad más rápida que la PlyGBS natural, proporcionando una ventaja para la futura terapia durante el parto que requeriría una eficacia en el tiempo. Las mutantes hiperactivas de PlyGBS pueden administrarse *in vivo*, dando como resultado una reducción en la colonización por GBS. Por ejemplo, se usó la mutante hiperactiva de PlyGBS PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) (SEQ ID NO: 5) en un modelo vaginal de ratón para probar la eficacia reduciendo la colonización por GBS *in vivo*. Una única dosis de PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) (SEQ ID NO: 5) redujo la colonización por GBS desde 5,54 logs (aproximadamente $3,5 \times 10^5$ ufc por ratón de media) antes del tratamiento a 1,68 logs (menos de 50 ufc por ratón) 4 h después del tratamiento. La administración de mutantes hiperactivas de PlyGBS *in vivo* puede usarse, por ejemplo, para reducir la infección neonatal por GBS durante el parto, proporcionando una metodología alternativa para sustituir a la profilaxis antibiótica durante el parto.

Otros sistemas, procedimientos, características y ventajas de la invención serán o se harán apreciables por el experto en la materia tras el examen de las siguientes figuras y descripción detallada. Se pretende que todos esos sistemas, procedimientos, características y ventajas adicionales estén incluidos en esta descripción.

En un primer aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una lisina mutante hiperactiva de PlyGBS en una mayor actividad destructora frente células estreptocócicas del grupo B (GBS) en comparación con la proteína PlyGBS, teniendo la lisina mutante de PlyGBS una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por: PlyGBS 90-1 (SEQ ID NO: 5), PlyGBS 80 (SEQ ID NO: 3), PlyGBS 90-8 (SEQ ID NO: 4) y PlyGBS 94 (SEQ ID NO: 8). En un aspecto adicional, la invención proporciona una lisina mutante de PlyGBS con una mayor actividad destructora frente a células estreptocócicas del grupo B (GBS) en comparación con la proteína PlyGBS, en el que la lisina mutante de PlyGBS se elige del grupo constituido por: PlyGBS 80 (SEQ ID NO: 3), PlyGBS 90-8 (SEQ ID NO: 4), PlyGBS 90-1 (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS 94 (SEQ ID NO: 8). En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una lisina mutante de PlyGBS con una mayor actividad destructora frente a bacterias estreptocócicas del grupo B (GBS) en comparación con la proteína PlyGBS, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una infección, en el que la lisina mutante es un polipéptido seleccionado del grupo constituido por: PlyGBS 90-1 (SEQ ID NO: 5), PlyGBS 80 (SEQ ID NO: 3), PlyGBS 90-8 (SEQ ID NO: 4) y PlyGBS 94 (SEQ ID NO: 8).

Breve descripción de los dibujos

La invención puede entenderse mejor con referencia a los siguientes dibujos y descripción. Los componentes de las figuras no están necesariamente a escala, y proporcionan una ilustración de ciertos aspectos de la invención.

La Fig. 1 es una tabla que enumera la secuencia de la PlyGBS (SEQ ID NO: 1) y las secuencias para las diversas mutantes de PlyGBS descritas (SEQ ID NOS: 2-9).

La Fig. 2 es un diagrama esquemático de la PlyGBS (SEQ ID NO: 1) y diversas mutantes de la PlyGBS con una actividad lítica incrementada frente a células GBS.

La Fig. 3 es un gel de SDS-PAGE teñido con azul comassie (gradiente del 4-20%) para PlyGBS90-8 purificada (SEQ ID NO: 4) (carril 1), PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) (carril 2), y PlyGBS natural (carril 3), con la masa molecular de la escalera proteica presentada en kilodaltons (kDa).

La Fig. 4 es un diagrama esquemático de la PlyGBS y varias mutantes truncadas.

La Fig. 5A es una gráfica que muestra la actividad relativa de PlyGBS, PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4) a 4°C; la Fig. 5B es una gráfica que muestra la estabilidad de PlyGBS, PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4) a 4°C almacenada en glicerol al 25% a -80°C.

ES 2 357 626 T3

La Fig. 6A es una gráfica que compara el efecto destructor para PlyGBS y PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) a diferentes cantidades (2; 10, 50 y 100 μg) de PlyGBS y PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5); la Fig. 6B es una gráfica que compara el efecto destructor de PlyGBS y PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) usando la misma cantidad de PlyGBS y de PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) (aproximadamente 3.000 μg) en la viabilidad *in vitro*.

La Fig. 7 es una gráfica que muestra el efecto de la concentración salina sobre la actividad lítica de las enzimas.

La Fig. 8 es una gráfica que muestra la especificidad de las lisinas PlyGBS (SEQ ID NO: 1) y PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) en un ensayo *in vitro*.

La Fig. 9 es una gráfica que muestra el control de la colonización por GBS en vagina de ratón con PlyGBS (SEQ ID NO: 1) o PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5).

Descripción detallada

A continuación se proporcionan las definiciones de ciertos términos usados y su aplicabilidad a la desvelación.

La expresión “mutantes hiperactivas de PlyGBS” se refiere a lisinas mutantes de PlyGBS con una actividad mejorada frente a GBS en comparación con la enzima PlyGBS en condiciones de ensayo sustancialmente idénticas.

El término “aislado” significa purificado al menos parcialmente a partir de un material de partida.

El término “purificado” significa que se ha incrementado mensurablemente la concentración del material biológico mediante cualquier proceso de purificación, incluyendo, pero no limitándose a, cromatografía en columna, HPLC, precipitación, electroforesis, etc., eliminando así parcial, sustancial o completamente impurezas tales como precursores u otras sustancias químicas implicadas en la preparación del material. Por consiguiente, el material, que es homogéneo o sustancialmente homogéneo (por ejemplo, rinde una única señal proteica en un procedimiento de separación tal como electroforesis o cromatografía), está incluido dentro de los significados de aislado y purificado. Los artesanos expertos apreciarán que la cantidad de purificación necesaria dependerá del uso del material. Por ejemplo, las composiciones destinadas a la administración a seres humanos habitualmente deben estar altamente purificadas según los estándares normativos.

La expresión “enzima lítica codificada genéticamente por un bacteriófago” se refiere a un polipéptido con al menos cierta actividad lítica frente a las bacterias hospedadoras.

“Polipéptido” se refiere a una molécula constituida por aminoácidos que se corresponde con los polipéptidos codificados por una secuencia polinucleotídica que es natural. El polipéptido puede incluir sustituciones conservativas, en las que el aminoácido natural es sustituido por uno con unas propiedades similares, en el que dichas sustituciones conservativas no alteran la función del polipéptido (véase, por ejemplo, Lewin “Genes V”, Oxford University Press, capítulo 1, págs. 9-13, 1994).

“Una enzima lítica asociada a un fago de secuencia nativa” se refiere a un polipéptido con la misma secuencia de aminoácidos que una enzima derivada de la naturaleza. Dicha enzima de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o producirse mediante medios recombinantes o sintéticos. El término “enzima de secuencia nativa” engloba específicamente formas naturales (por ejemplo, formas empalmadas o modificadas alternativamente), y variantes naturales de la enzima. En un ejemplo, la enzima de secuencia nativa es un polipéptido maduro o de longitud completa que está codificado genéticamente por un gen procedente de un bacteriófago específico para estreptococos del grupo B (GBS).

El término “aproximadamente” usado con referencia a una cantidad incluye variaciones en la mencionada cantidad que son equivalentes a la cantidad mencionada, por ejemplo, una cantidad que no es sustancialmente diferente de una cantidad mencionada para un propósito o función pretendidos.

La expresión “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad de un principio activo suficiente para conseguir un efecto deseado sin causar un efecto secundario indeseable. En algunos casos, puede ser necesario alcanzar un equilibrio entre obtener un efecto deseado y limitar la gravedad de un efecto indeseado. La cantidad de principio activo usada variará dependiendo del tipo de principio activo y del uso pretendido de la composición de la presente invención.

Una “enzima lítica asociada a un fago de secuencia polipeptídica variante” significa una enzima lítica funcionalmente activa codificada genéticamente por un bacteriófago específico para estreptococos del grupo B (GBS), o *Streptococcus agalactiae*, con una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, o incluso al menos el 99,5%, con una secuencia descrita.

“Porcentaje (%) de identidad de la secuencia polipeptídica” con respecto a las secuencias polipeptídicas de enzimas líticas identificadas aquí se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de la enzima lítica específica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y no considerando ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Los procedimientos de

alineamiento con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos se describen a continuación.

Lisinas de PlyGBS

5 Se proporcionan lisinas de bacteriófagos con actividad destructora frente a bacterias estreptocócicas del grupo B (GBS). Las lisinas de bacteriófagos preferidas son enzimas mutantes hiperactivas de PlyGBS de la lisina PlyGBS con una actividad destructora mejorada frente a GBS en comparación con la actividad de la PlyGBS y sus variantes. En los ejemplos descritos a continuación se identifican y caracterizan varias enzimas mutantes hiperactivas de PlyGBS con actividad destructora frente a GBS. Otros ejemplos proporcionan lisinas con actividad específica frente a otras bacterias grampositivas, que incluyen variantes y fragmentos de las lisinas.

15 La enzima muralítica de fago, PlyGBS, puede usarse para lisar células GBS *in vitro* e *in vivo*, por ejemplo, según se describe en Cheng, Q. y col., "Removal of group B streptococci colonizing the vagina y oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme", *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 111-117 (2005). La PlyGBS pertenece a un grupo de lisinas bacteriófagas que pueden destruir bacterias digiriendo la pared celular bacteriana, haciendo a las células susceptibles a una lisis osmótica. Por ejemplo, en un modelo de ratón, una única dosis de PlyGBS puede reducir significativamente la colonización por GBS tanto en la vagina como en la orofaringe. La administración de una enzima muralítica de fago tal como PlyGBS es una alternativa prometedor a la profilaxis antibiótica durante el parto con objeto de reducir la colonización vaginal por GBS en mujeres embarazadas antes del parto, o para descontaminar recién nacidos en diversas zonas del cuerpo, reduciendo así la incidencia de infecciones neonatales asociadas a GBS.

25 Las lisinas se presentan generalmente en una estructura modular. El módulo N-terminal consiste en un dominio catalítico que se cree que posee la habilidad de romper la pared celular bacteriana de ciertas bacterias. Las actividades enzimáticas asociadas a menudo con el dominio catalítico son amidasas, endopeptidasas, glucosamididasas y muramididasas. El módulo C-terminal consiste en un dominio de unión que se cree que tiene una afinidad por un epítipo de carbohidrato en la pared celular bacteriana objetivo. Se cree que el dominio de unión determina la especificidad de la lisina.

30 Se proporcionan agentes líticos de bacteriófagos eficaces frente a bacterias GBS, junto con las correspondientes secuencias polipeptídicas y polinucleotídicas relativas a los mismos. Las composiciones que comprenden las enzimas líticas proporcionadas pueden ser útiles en aplicaciones de diagnóstico, tratamiento y descontaminación relativas a diversos tipos de bacterias grampositivas, según se describe, incluyendo bacterias GBS. También se desvelan los procedimientos de tratamiento y descontaminación usando las composiciones que comprenden las secuencias de las enzimas líticas, los polipéptidos o los polinucleótidos.

35 Se describen enzimas mutantes hiperactivas de PlyGBS que muestran un efecto lítico sobre cepas bacterianas de BGS, y particularmente, las lisinas con actividad destructora frente a una o más especies bacterianas de GBS. Las lisinas que incluyen lisinas mutantes hiperactivas de PlyGBS comprenden una secuencia polipeptídica con al menos una homología del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor con la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9.

45 Las siguientes referencias relativas a la aplicación terapéutica de enzimas líticas como un agente antibacteriano se incorporan al presente documento como referencia en su totalidad: Cheng, Q., D. Nelson, S. W. Zhu y V. A. Fischetti, "Removal of group B streptococci colonizing the vagina y oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme", *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 111-117 (2005); Loeffler, J. M., D. Nelson y V. A. Fischetti. 2001. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* 294: 2170-2172; Nelson, D., L. Loomis y V. A. Fischetti. 2001. Prevention y elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 98: 4107-4112; y Schuch, R., D. Nelson y V. A. Fischetti. 2002. A bacteriolytic agent that detects y kills *Bacillus anthracis*. *Nature* 418: 884-889.

50 La actividad destructora de las lisinas de PlyGBS, tales como las lisinas mutantes de PlyGBS, puede cuantificarse realizando un ensayo de destrucción bacteriana *in vitro* descrito en el Ejemplo 3 a continuación, o realizando un ensayo de destrucción bacteriana *in vivo* descrito en el Ejemplo 4 a continuación.

Mutantes mutágenas de PlyGBS

55 En referencia a la tabla de la Fig. 1, las lisinas mutantes hiperactivas de PlyGBS incluyen lisinas seleccionadas del grupo constituido por PlyGBS 86-6 (SEQ ID NO: 2), PlyGBS 80 (SEQ ID NO: 3), PlyGBS 90-8 (SEQ ID NO: 4), PlyGBS 90-1 (SEQ ID NO: 5), PlyGBS 94 (SEQ ID NO: 8) y PlyGBS 95 (SEQ ID NO: 9). La Fig. 2 es un diagrama esquemático de PlyGBS y varias mutantes producidas mediante mutagénesis aleatoria. La PlyGBS (SEQ ID NO: 1) contiene un dominio de endopeptidasa N-terminal [aminoácidos (aa) 1-107], un dominio de muramidasa central (aa 150-394) y una región C-terminal (aa 395-443). La PlyGBS86-6 mutante (SEQ ID NO: 2) tiene un cambio de aminoácido de ácido aspártico a ácido glutámico (D374E). La PlyGBS80 (SEQ ID NO: 3) (aa 1-164) y la PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4) (aa 1-138) mutantes son mutantes truncadas debido a codones de detención aportados por mutaciones terminadoras. La PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) procedía de una delección fuera de marco que eliminaba los pb 424-1255 en el gen plyGBS y como resultado, codifica los primeros 141 aminoácidos de PlyGBS más 13 aminoácidos adicionales (DGHALTIQSRNG) debido al cambio de marco de la región C-terminal (pb 1256-1332) del gen plyGBS.

ES 2 357 626 T3

Se obtuvieron dos lisinas mutantes hiperactivas de PlyGBS a partir de la cepa mutadora *E. coli* XL-1 Red. La primera, PlyGBS86-6 (SEQ ID NO: 2), tiene una única mutación puntual resultante del cambio de aminoácido de ácido aspártico a ácido glutámico (D374E). La mutante PlyGBS86-6 (SEQ ID NO: 2) tiene una actividad específica 14 veces mayor que la PlyGBS natural (SEQ ID NO: 1). La segunda mutante, PlyGBS80 (SEQ ID NO: 3), tiene un codón de detención en el centro del gen plyGBS (Q164Stop) que da como resultado una molécula truncada. La mutante PlyGBS80 (SEQ ID NO: 3) contiene únicamente los primeros 163 aminoácidos de la PlyGBS natural (SEQ ID NO: 1), pero tiene una actividad específica 1,5 veces mayor que la PlyGBS (SEQ ID NO: 1).

Se identificaron dos mutantes hiperactivas a partir de una mutagénesis aleatoria mediante PCR. La mutante PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4) es similar a la PlyGBS80 (SEQ ID NO: 3) en que ambas son mutantes truncadas como resultado de la incorporación de un codón de detención. La mutante PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4) tiene los primeros 138 aminoácidos de la PlyGBS (SEQ ID NO: 1). Significativamente, la mutante PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4) tiene una actividad específica que es aproximadamente 25 veces mayor que la de la PlyGBS natural. Otra mutante, la PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5), no incluye la región de los pb 424-1255 en el gen plyGBS. Como resultado, sólo codifica los primeros 141 aminoácidos de PlyGBS (SEQ ID NO: 1) más 13 aminoácidos adicionales debido al cambio de marco de la región C-terminal (pb 1256-1332) del gen plyGBS. Esta mutante tiene una actividad específica que es aproximadamente 40 veces mayor que la del tipo natural.

Las dos mutantes hiperactivas, PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4), se purificaron usando una cromatografía de intercambio aniónico de Q-Sepharose, y las fracciones activas se agruparon y se analizaron en un gel de SDS-PAGE en gradiente. Como se muestra en la Fig. 3, las mutantes PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4) migraban cerca de las regiones para el peso molecular calculado (17,0, 15,3 KDa) enumerado en la Tabla 1. La Fig. 3 muestra un gel de SDS-PAGE tenido con azul commassie (gradiente del 4-20%) para PlyGBS90-8 purificada (SEQ ID NO: 4) (carril 1), PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) (carril 2) y PlyGBS natural (carril 3), con la masa molecular de la escalera proteica presentada en kilodaltons (KDa).

TABLA 1

Características de la PlyGBS natural y de dos lisinas mutantes hiperactivas de PlyGBS

<i>Proteína</i>	<i>Aminoácidos totales</i>	<i>Peso molecular calculado (KDa)</i>	<i>Punto isoeléctrico (pI)</i>
PLYGBS (SEQ ID NO: 1)	443	49,6	4,88
PLYGBS90-1 (SEQ ID NO: 5)	154	17,0	4,99
PLYGBS90-8 (SEQ ID NO: 4)	138	15,3	4,50

Mutantes de delección de PlyGBS

La PlyGBS (SEQ ID NO: 1) tiene dos dominios catalíticos, uno endopeptidasa y uno muramidasa, y un dominio C-terminal no asignado. (Cheng, Q., D. Nelson, S. W. Zhu y V. A. Fischetti, "Removal of group B streptococci colonizing the vagina y oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme", *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 111-117 (2005)). Varias de las mutantes de PlyGBS identificadas como mutantes hiperactivas de PlyGBS son mutantes truncadas que sólo contienen un dominio catalítico, pero que aún tienen una mayor actividad que la PlyGBS natural. Las mutantes de delección se designaron basándose en la organización de dominio de la PlyGBS. La delección del C-terminal proporciona mutantes de PlyGBS que conservan la especificidad y la actividad lítica de la enzima lítica PlyGBS (SEQ ID NO: 1). La delección del C-terminal no tuvo un efecto sustancial sobre su especificidad o sobre la actividad lítica, según se ilustra comparando las mutantes de delección hiperactivas PlyGBS95 (SEQ ID NO: 9) y PlyGBS94 (SEQ ID NO: 8). Las mutantes hiperactivas (PlyGBS94 (SEQ ID NO: 8), PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4)) tienen truncamientos en las regiones central y C-terminal, y parecen ser similares a la lisozima en que sólo tienen un dominio catalítico, sin un dominio de unión a la pared celular. Sin embargo, no se observó una actividad lítica significativa para la lisozima de clara de huevo (Sigma, St. Louis, MO) frente a GBS, así como muchas otras especies bacterianas que son el objetivo de estas mutantes truncadas de PlyGBS. El dominio de endopeptidasa presente en estas mutantes es similar al dominio CHAP recientemente identificado en la enzima lítica PlyGBS (SEQ ID NO: 1) a partir del bacteriófago de GBS B30. Pritchard y col., "The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30", *Microbiology.* 150: 2079-2087 (2004). Sin embargo, el propio dominio CHAP en las mutantes truncadas hiperactivas de PlyGBS no sólo es activo frente a GBS, sino que tiene una actividad significativamente incrementada (desde aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 40 veces) con

respecto a la PlyGBS natural (SEQ ID NO: 1). Aunque los dominios CHAP están ampliamente presentes en muchas lisinas de fagos, los dominios CHAP no tienen típicamente actividad lítica sin la asociación de un dominio de unión a pared celular.

5 La Fig. 4 es un diagrama esquemático de la PlyGBS y diversas mutantes truncadas. La mutante PlyGBS92 (SEQ ID NO: 6) sólo contiene un dominio de muramidasa central (aa 150-394), mientras que la PlyGBS93 (SEQ ID NO: 7) tiene dominios de muramidasa más C-terminal (aa 150-443). La mutante PlyGBS94 (SEQ ID NO: 8) contiene el dominio endopeptidasa de N-terminal (aa 1-146). Para comparar, se construyó la PlyGBS95 (SEQ ID NO: 9) que tenía una delección en marco del dominio de muramidasa central (delección entre los aa 147-348). Como se muestra en la Fig. 10 4, la mutante hiperactiva de PlyGBS PlyGBS94 (SEQ ID NO: 8) contiene el dominio de endopeptidasa N-terminal (primeros 146 aminoácidos), y es similar a la mutante PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4) (primeros 138 aminoácidos) obtenida anteriormente. Se observó un nivel similar de actividad lítica en estas dos mutantes. La mutante PlyGBS92 (SEQ ID NO: 6) contiene el dominio de muramidasa putativo localizado en el centro de la PlyGBS, mientras que la mutante PlyGBS93 (SEQ ID NO: 7) contiene el dominio de muramidasa más la región C-terminal. En comparación 15 con el dominio activo de endopeptidasa presente en la mutante PlyGBS94 (SEQ ID NO: 8), ninguna de estas mutantes de delección tenía una actividad lítica frente a GBS. También se analizó la actividad lítica de una mutante (PlyGBS95 (SEQ ID NO: 9)) que contenía una delección en marco del dominio de muramidasa central (Fig. 4). La mutante tiene una actividad lítica similar a la mutante PlyGBS94 (SEQ ID NO: 8).

20 *Estabilidad proteica de las mutantes hiperactivas de PlyGBS*

La Fig. 5A es una gráfica que muestra la actividad relativa de PlyGBS, PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4) a 4°C. La Fig. 5B es una gráfica que muestra la estabilidad de PlyGBS (SEQ ID NO: 1), PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4) en glicerol al 25% a 80°C. Para obtener los datos para las gráficas 25 de las Fig. 5A y Fig. 5B, se almacenaron la PlyGBS (SEQ ID NO: 1) y las mutantes hiperactivas PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4) en alícuotas a 4°C (Fig. 5A) en tampón y a -80°C (Fig. 5B) en glicerol al 25%. En diferentes puntos temporales se midió la actividad lítica de estas muestras mediante una actividad lítica *in vitro* frente a GBS, y se determinaron los valores de V_{max} para calcular la actividad relativa. Como se muestra en la Fig. 5A, a 4°C, la PlyGBS natural es estable durante más de 40 días, mientras que sólo se conservó el 25% y el 31,2% de la actividad para el mismo periodo para las mutantes PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4), respectivamente, y prácticamente se perdió a los 60 días. Sin embargo, cuando almacenamos estas proteínas en glicerol al 25% a -80°C (Fig. 5B), las 3 proteínas tenían un perfil de estabilidad mejor de hasta 40 días, con menos pérdida a los 60 días.

35 *Comparación de la actividad lítica de la PlyGBS con lisinas mutantes hiperactivas de PlyGBS*

Las Fig. 6A y Fig. 6B son gráficas que muestran una comparación del efecto destructor para PlyGBS y PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) usando diferentes cantidades de PlyGBS (SEQ ID NO: 1) y de PlyGBS90-1 mutante (SEQ ID NO: 5) (2, 10, 50 y 100 μ g) en un ensayo *in vitro* para medir la actividad lítica mediante la determinación de la V_{max} . 40 Para obtener los resultados del ensayo ilustrado en la Fig. 6A, se usaron diferentes cantidades (2, 10, 50 y 100 μ g) de PlyGBS (SEQ ID NO: 1) y de PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) en el ensayo *in vitro*, y la disminución en la DO₆₀₀ se monitorizó con un espectrofotómetro. La actividad lítica se expresó como la velocidad inicial de la disminución en la absorbancia con el tiempo (-mDO₆₀₀/min). Como se muestra en la Fig. 6A, la V_{max} sólo es de -22,8 mDO₆₀₀/min cuando se usaron 100 μ g de PlyGBS natural (SEQ ID NO: 1), mientras que los valores de V_{max} son de -60,5 y -266,5 mDO₆₀₀/min para 10 μ g y 100 μ g de PlyGBS90-1 mutante (SEQ ID NO: 5), respectivamente. La V_{max} mide la velocidad inicial de la caída en la DO₆₀₀, la tasa de lisis celular, y es probable que esté subestimada cuando se usan 100 45 μ g de la mutante hiperactiva PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) porque la lisis celular se produjo demasiado rápidamente como para ser medida de forma precisa en estas condiciones.

50 Se probó la eficacia de la PlyGBS90-1 mutante (SEQ ID NO: 5) en un ensayo de viabilidad celular *in vitro*. Para obtener los resultados del ensayo ilustrado en la Fig. 6B, se usó la misma cantidad de PlyGBS (SEQ ID NO: 1) y de PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) (aproximadamente 3.000 μ g) en el ensayo de viabilidad *in vitro*. Como se muestra en la Fig. 6B, la viabilidad celular disminuyó aproximadamente 6 logs después de 60 min de incubación con la PlyGBS90-1 mutante (SEQ ID NO: 5), y sólo 2 logs para la PlyGBS natural durante el mismo periodo. A los 10 min de incubación, 55 la viabilidad celular disminuyó 3 logs para la mutante y menos de 1 log para la natural. Estos resultados indican que la enzima mutante tiene una actividad lítica significativamente incrementada frente a GBS.

La actividad de lisina de las lisinas de PlyGBS puede verse afectada por la concentración salina. Para obtener los resultados ilustrados en la gráfica de la Fig. 7, se midieron la actividad lítica de la PlyGBS (SEQ ID NO: 1) y de la PlyGBS90-1 mutante (SEQ ID NO: 5) a varias concentraciones salinas de NaCl que variaban desde 0 hasta 500 mM. La Fig. 7 es una gráfica que muestra el efecto de la concentración salina sobre la actividad lítica de la PlyGBS (SEQ ID NO: 1) y de la PlyGBS90-1 mutante (SEQ ID NO: 5). Para obtener los datos ilustrados en la Fig. 7, se dializaron PlyGBS (SEQ ID NO: 1) y PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) purificadas frente a Tris-HCl 2 mM (pH 7,4) hasta el día siguiente, y se añadieron diversas cantidades de NaCl 5 M para proporcionar la concentración salina deseada para el ensayo de actividad *in vitro*. La actividad lítica más alta a una concentración salina óptima para PlyGBS (SEQ ID NO: 1) o PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) se considera como el 100% para el estándar, para calcular la actividad relativa. Como se muestra en la Fig. 7, la concentración óptima de NaCl para la PlyGBS natural (SEQ ID NO: 1) es de aproximadamente 200 mM, mientras que el óptimo para la PlyGBS90-1 mutante (SEQ ID NO: 5) cambió a 65

aproximadamente 50-100 mM. Los resultados ilustrados en la Fig. 7 sugieren que aunque la enzima PlyGBS natural (SEQ ID NO: 1) conservaba la actividad durante un intervalo más amplio de sal que la PlyGBS90-1 mutante (SEQ ID NO: 5), la mutante era más sensible a estos cambios. Cuando el perfil de actividad según el pH de la PlyGBS90-1 mutante (SEQ ID NO: 5) se comparaba con la PlyGBS natural (SEQ ID NO: 1), ambas tenían un pico a pH 5,0.

Se comparó el espectro de actividad de la lisina mutante PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) con la lisina PlyGBS natural (SEQ ID NO: 1) usando la misma cantidad de lisina. La PlyGBS (SEQ ID NO: 1) tenía un espectro relativamente amplio frente a diversos grupos y especies de estreptococos, tales como *S. pyogenes* (GAS), *S. equi* (GCS) y *S. salivarius* (Cheng, Q., D. Nelson, S. W. Zhu y V. A. Fischetti, "Removal of group B streptococci colonizing the vagina y oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme", *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 111-117 (2005), incorporada como referencia en este documento en su totalidad). La Fig. 8 es una gráfica que compara la especificidad de lisina PlyGBS (SEQ ID NO: 1) y la PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5). Para obtener los datos ilustrados en la Fig. 8, se usó la misma dosis de PlyGBS o de PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) (40 U) en el ensayo *in vitro*, y la actividad lítica se expresó como - mDO₆₀₀/min. Sorprendentemente, ambas enzimas tenían un nivel similar de actividad lítica (V_{max}) frente a GBS y *S. salivarius* (Fig. 8), así como algunas otras especies de estreptococos. Se ensayaron algunas otras especies bacterianas en las que la enzima PlyGBS natural (SEQ ID NO: 1) tenía poca o ninguna actividad (es decir, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*), y la enzima mutante PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4) mostró un patrón similar de especificidad, excepto por una pequeña actividad encontrada con *B. cereus* (Fig. 8). Se observó un resultado similar con algunas de nuestras otras mutantes truncadas, tales como PlyGBS80 (SEQ ID NO: 3) y PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4), que muestran el mismo efecto destructor frente a *B. cereus*.

Se ensayó la preparación de la mutante purificada PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) para comprobar su actividad lítica frente a GBS en un modelo vaginal de ratón según se describe en los Ejemplos, a continuación, y en Cheng, Q., D. Nelson, S. W. Zhu y V. A. Fischetti, "Removal of group B streptococci colonizing the vagina y oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme", *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 111-117 (2005). La Fig. 9 ilustra los resultados de las pruebas *in vivo* que demuestran el control de la colonización por GBS en vagina de ratón con PlyGBS (SEQ ID NO: 1) o PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5). Para obtener los datos ilustrados en la Fig. 9, se colonizaron vaginas de ratones con GBS después de una sincronización con valerato de β -estradiol. Un día después de la inoculación con GBS, se trataron tres grupos de ratones con tampón (n = 10), o con 1.500 μ g de PlyGBS (SEQ ID NO: 1) (n = 10), o con 1.500 μ g de PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) (n = 10). Se realizaron frotis vaginales de cada ratón antes del tratamiento (muestras en la hora 0) y después del tratamiento a intervalos de 2 a 4 horas (muestras en las horas 2 y 4). Se promediaron los recuentos de colonias de los frotis vaginales para cada intervalo temporal en el mismo grupo, y se representaron gráficamente. La barra de error representa el error estándar de la media. Como se muestra en la Fig. 9, los ratones tratados con la mutante PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) mostraron una caída estadísticamente significativa (desde 5,54 logs antes del tratamiento hasta una media de 1,68 logs 4 horas después del tratamiento) en comparación con el control de tampón (p < 0,0001). La PlyGBS natural dio como resultado una caída de los GBS desde 5,38 logs hasta una media de 2,28 logs 4 horas después del tratamiento. Los análisis estadísticos indicaron que la mutante PlyGBS90-1 mostró un descenso más eficiente en la colonización por GBS que el tratamiento con PlyGBS 4 horas después del tratamiento (p = 0,0037). Por lo tanto, la mutante PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) mostró una disminución más eficiente en la colonización por GBS.

Variantes polipeptídicas

Además de las lisinas codificadas por las secuencias polipeptídicas de la SEQ ID NO: 1, la presente desvelación también proporciona ciertas variantes polipeptídicas, incluyendo fragmentos de las mismas y polipéptidos con algunas sustituciones. Las variantes polipeptídicas pueden ser lisinas mutantes hiperactivas de PlyGBS. Por ejemplo, la variante polipeptídica es una lisina mutante hiperactiva de PlyGBS seleccionada del grupo: PlyGBS 86-6 (SEQ ID NO: 2), PlyGBS 80 (SEQ ID NO: 3), PlyGBS 90-8 (SEQ ID NO: 4), PlyGBS 90-1 (SEQ ID NO: 5), PlyGBS 94 (SEQ ID NO: 8) y PlyGBS 95 (SEQ ID NO: 9). La forma modificada o alterada de la proteína o los péptidos, y los fragmentos de péptidos, según se desvela, incluye proteínas, péptidos y fragmentos de péptidos que son sintetizados químicamente o preparados mediante técnicas de ADN recombinante, o ambos, estas técnicas incluyen, por ejemplo, quimerización y transposiciones. Cuando la proteína o el péptido se produce mediante síntesis química, preferiblemente está sustancialmente exento de precursores químicos u otras sustancias químicas, es decir, está separado de los precursores químicos u otras sustancias químicas que están implicadas en la síntesis de la proteína. Consecuentemente, dichas preparaciones de la proteína tienen menos de aproximadamente el 30%, 20%, 10%, 5% (en peso en seco) de precursores o compuestos químicos distintos al polipéptido de interés.

Una "enzima lítica de secuencia polipeptídica variante asociada a fago" puede ser un polipéptido de una enzima lítica activa con una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 80% con una secuencia natural completa de una secuencia polipeptídica de una enzima según se desvela. Dichas variantes polipeptídicas de enzimas líticas incluyen, por ejemplo, polipéptidos de enzimas líticas en los que se han añadido, o delecionado, uno o más residuos de aminoácidos en el N- o C-terminal de la secuencia de aminoácidos natural completa. Una variante polipeptídica de una enzima lítica tendrá una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 80%, y puede tener al menos aproximadamente el 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5% de identidad en la secuencia de aminoácidos con una secuencia natural completa de una secuencia polipeptídica de una enzima lítica, una secuencia polipeptídica de una enzima lítica que carece de péptido de señalización, un dominio extracelular de un polipéptido de una enzima lítica, con o sin el péptido de señalización, o cualquier otro fragmento definido específicamente de una secuencia polipeptídica

ES 2 357 626 T3

completa de una enzima lítica, según se desvela. Las variantes polipeptídicas de enzimas líticas pueden tener al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, a menudo al menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 ó 300 aminoácidos de longitud, o más.

5 Dichas variantes de enzimas líticas asociadas a fagos incluyen, por ejemplo, polipéptidos de enzimas líticas en los que se han añadido o delecionado uno o más residuos de aminoácidos en el N o C terminal de la secuencia de las SEQ ID NOS: 1-9. En un ejemplo, uno o más aminoácidos se sustituyen, delecionan y/o añaden en cualquier posición(es) de la secuencia, o porción de la secuencia.

10 El “porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias de enzimas líticas asociadas a fagos identificadas, se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos de la secuencia de la enzima lítica asociada a fago, después de alinear las secuencias en el mismo marco de lectura e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y no considerando ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas formas que están en la pericia de la técnica, por ejemplo, usando un programa informático para ordenador disponible públicamente tal como el programa informático blast.

20 El alineamiento de polipéptidos con el propósito de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas formas que están en la pericia de la técnica, por ejemplo, usando un programa informático para ordenador disponible públicamente tal como programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir un alineamiento máximo sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando.

25 Los valores del porcentaje de la identidad de secuencia de aminoácidos también pueden obtenerse según se describe a continuación, usando el programa para ordenador WU-BLAST-2 (Altschul y col., *Methods in Enzymology* 266: 460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se establecen en los valores por defecto. Los que no se establecen en los valores por defecto se establecen con los siguientes valores: overlap span = 1, overlap fraction = 0,125, word threshold (T) = 11 y scoring matrix = BLOSUM62. Cuando se emplea WU-BLAST-2, un porcentaje del valor de la identidad de secuencia de aminoácidos se determina dividiendo (a) el número de residuos de aminoácidos idénticos coincidentes entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la enzima lítica de interés con una secuencia derivada del polipéptido de la enzima lítica natural, y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (es decir, la secuencia contra la que se está comparando el polipéptido de la enzima lítica de interés, que puede ser una variante polipeptídica de una enzima lítica) según se determina mediante WU-BLAST-2 entre (b) el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido de la enzima lítica de interés. Por ejemplo, en la afirmación “un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos A que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 80% con la secuencia de aminoácidos B”, la secuencia de aminoácidos A es la secuencia de aminoácidos de comparación de interés, y la secuencia de aminoácidos B es la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la enzima lítica de interés.

45 El porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos también puede determinarse usando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul y col., *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 puede descargarse en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. NCBI-BLAST2 usa diversos parámetros de búsqueda, en los que todos esos parámetros de búsqueda se establecen a los valores de defecto que incluyen, por ejemplo, unmask = yes, stry = all, expected occurrences = 10, minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0,01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final gapped alignment = 25 y scoring matrix = BLOSUM62.

50 En las situaciones en las que se emplea NCBI-BLAST2 para las comparaciones entre secuencias de aminoácidos, el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con, o contra una secuencia de aminoácidos dada B (que alternativamente puede expresarse como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un cierto porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos con respecto a, con, o contra una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula como sigue:

55
$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

60 en la que X es el número de residuos de aminoácidos puntuado como correspondencias idénticas por el programa de alineación de secuencias NCBI-BLAST2 en la alineación de A y B de ese programa, y en la que Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos entre A y B no será igual al porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos entre B y A.

65 *Fragmentos de lisina*

En algunos ejemplos se proporcionan fragmentos biológicamente activos de las lisinas, incluyendo las secuencias polipeptídicas tales como la SEQ ID NO: 1 o las variantes de las mismas descritas. Las variantes polipeptídicas

ES 2 357 626 T3

incluyen lisinas mutantes hiperactivas de PlyGBS. La variante polipeptídica puede ser una lisina mutante hiperactiva de PlyGBS seleccionada del grupo constituido por: PlyGBS 86-6 (SEQ ID NO: 2), PlyGBS 80 (SEQ ID NO: 3), PlyGBS 90-8 (SEQ ID NO: 4), PlyGBS 90-1 (SEQ ID NO: 5), PlyGBS 94 (SEQ ID NO: 8) y PlyGBS 95 (SEQ ID NO: 9). Un "fragmento" puede incluir una variante polipeptídica con una secuencia de aminoácidos que es en su totalidad igual a parte, pero no toda, la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos mencionados anteriormente. Un fragmento puede ser "independiente", o estar incluido en un polipéptido mayor del que forma una parte o región, muy preferiblemente como una única región continua, un único polipéptido mayor.

Las porciones biológicamente activas de una proteína o un fragmento de péptido de los ejemplos, según se describe, incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos lo suficientemente idénticas a, o derivadas de, la secuencia de aminoácidos de la proteína de fago de la desvelación, que incluyen menos aminoácidos que la proteína completa de la proteína de fago, y muestran al menos una actividad de la correspondiente proteína completa. Típicamente, las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de la proteína correspondiente. Una porción biológicamente activa de una proteína o fragmento de proteína de la desvelación puede ser un polipéptido que tiene, por ejemplo, 10, 25, 50, 100 menos o más aminoácidos de longitud. Además, pueden prepararse otras porciones biológicamente activas en las que otras regiones de la proteína son delecionadas o añadidas mediante técnicas recombinantes, y evaluarse para una o más de las actividades funcionales de la forma natural de un polipéptido.

Los fragmentos pueden incluir, por ejemplo, polipéptidos de truncamiento con una porción de una secuencia de aminoácidos correspondiente con, por ejemplo, una identidad de secuencia del 50%, al menos el 60%, una identidad de secuencia de al menos el 70%, una identidad de secuencia de al menos el 80%, una identidad de secuencia de al menos el 95% una identidad de secuencia de al menos el 97% o al menos, o incluso, una identidad de secuencia del 98% de al menos una región de 50 aminoácidos de longitud de la Región de Unión Natural, o de variantes, tales como una serie continua de residuos que incluye el amino terminal, o una serie continua de residuos que incluye el carboxilo terminal. También se proporcionan formas de degradación de los polipéptidos en una célula hospedadora. Adicionalmente se proporcionan fragmentos caracterizados por atributos estructurales o funcionales tales como fragmentos que comprenden regiones que se forman en hélice alfa y hélice alfa, regiones que se forman en lámina beta y lámina beta, regiones que se forman en giro y giro, regiones que se forman en espiral y espiral, regiones hidrófilas, regiones hidrófobas, regiones anfipáticas alfa, regiones anfipáticas beta, regiones flexibles, regiones de formación en superficie, regiones de unión al sustrato y regiones de alto índice antigénico.

También se proporcionan fragmentos que tienen actividades de unión de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 ó 10^9 frente a bacterias GBS, incluyendo aquellos con una actividad similar o una actividad mejorada, o con una indeseable actividad disminuida. También son ventajosos los conjugados de los sitios de unión y una etiqueta detectable o una etiqueta bactericida que confieren dicha función clínica deseable mediante la cual la región de unión se une específicamente a una pared bacteriana.

Pueden emplearse variantes que son fragmentos de los polipéptidos de la desvelación para producir el correspondiente polipéptido completo mediante síntesis peptídica; por lo tanto, estas variantes pueden emplearse como intermedios para producir los polipéptidos completos de los ejemplos de la desvelación.

Pueden prepararse fragmentos peptídicos de enzimas líticas mediante cualquiera de las numerosas técnicas convencionales. Los fragmentos peptídicos deseados pueden sintetizarse químicamente. Una metodología alternativa implica la generación de fragmentos de enzimas líticas mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima de la que se sabe que escinde proteínas en sitios definidos por unos residuos de aminoácidos en particular, o digiriendo el ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislando el fragmento deseado. Otra técnica adecuada más implica aislar y amplificar un fragmento de ADN que codifica para un fragmento polipeptídico deseado, mediante una reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR). Se emplean oligonucleótidos que definen los términos deseados del fragmento de ADN en los cebadores 5' y 3' de la PCR. Preferiblemente, los fragmentos polipeptídicos de la enzima lítica comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido de la enzima lítica natural desvelada.

Por ejemplo, pueden usarse genotecas de fragmentos de la secuencia codificante de un polipéptido de la desvelación para generar una población variada de polipéptidos para el cribado y la subsiguiente selección de variantes. Por ejemplo, puede generarse una genoteca de fragmentos de secuencias codificantes tratando un fragmento de PCR bicatenario de la secuencia codificante de interés con una nucleasa en unas condiciones en las que el mellado se produce sólo una vez por molécula, desnaturalizando el ADN bicatenario, renaturalizando el ADN para formar un ADN bicatenario que puede incluir pares sentido/antisentido de diferentes productos mellados, eliminando las porciones monocatenarias de las dobles hebras reformadas mediante un tratamiento con nucleasa S1, y ligando la genoteca de fragmentos resultantes en un vector de expresión. Mediante este procedimiento puede derivarse una genoteca de expresión que codifica para los fragmentos N terminal e internos de varios tamaños de la proteína de interés. En la materia se conocen varias técnicas para cribar productos génicos de genotecas combinatorias creadas mediante mutaciones puntuales o truncamientos, y para cribar genotecas de ADNc buscando productos génicos con una propiedad seleccionada. Las técnicas usadas más ampliamente, que son susceptibles de análisis de alto rendimiento, para el cribado de grandes genotecas incluyen típicamente la clonación de genotecas en vectores de expresión replicables, transformar las células apropiadas con la genoteca resultante de vectores, y expresar los genes combinatorios en unas condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilite el aislamiento del vector que

ES 2 357 626 T3

5 codifica para el gen cuyo producto se detectó. La mutagénesis de conjunto recurrente (*recursive ensemble mutagenesis*, REM), una técnica que incrementa la frecuencia de mutantes funcionales en las genotecas, puede usarse en combinación con los ensayos de cribado para identificar variantes de una proteína de la desvelación (Arkin y Yourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 7811 7815; Delgrave y col. (1993) Protein Engineering 6 (3): 327 331).

10 Las porciones inmunológicamente activas de una proteína o fragmento peptídico pueden incluir regiones que se unan a anticuerpos que reconocen la enzima del fago. En este contexto, la porción más pequeña de una proteína (o de un ácido nucleico que codifica para la proteína) puede ser un epítopo que es reconocible como específico para el fago que crea la proteína lisina. Consecuentemente, el polipéptido más pequeño (y el ácido nucleico asociado que codifica para el polipéptido) que puede esperarse que se una al anticuerpo y sea útil puede tener 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, 85 ó 100 aminoácidos de longitud. Aunque pequeñas secuencias tan cortas como de 8, 9, 10, 11, 12 ó 15 aminoácidos de longitud comprenden fiablemente una estructura suficiente para actuar como epítomos, secuencias más cortas de 5, 6 ó 7 aminoácidos de longitud pueden mostrar una estructura epitópica en algunas condiciones y tener valor. Por lo tanto, la porción más pequeña de la proteína descrita por la SEQ ID NO 1 puede incluir polipéptidos tan pequeños como de 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 aminoácidos de longitud.

20 Las proteínas y los ácidos nucleicos homólogos pueden prepararse de forma que comparten una funcionalidad con dichas pequeñas proteínas y/o ácidos nucleicos (o regiones de proteínas y/o ácidos nucleicos de moléculas mayores), como apreciará el artesano experto. Dichas moléculas pequeñas y regiones cortas de moléculas mayores, que pueden ser homólogas específicamente, pretenden ser ejemplos, y no son limitantes. La homología de dichas regiones de valor puede ser de al menos el 50%, 65%, 75%, 85%, al menos el 90%, 95%, 97%, 98%, o al menos el 99% en comparación con la SEQ ID NO 1. Estos valores porcentuales de homología no incluyen alteraciones debidas a sustituciones conservativas de aminoácidos.

30 También puede usarse un epítopo según se ha descrito para generar un anticuerpo, y también puede usarse para detectar la unión a moléculas que reconocen la proteína lisina. Otro ejemplo es una molécula tal como un anticuerpo u otro agente de unión específico, que puede crearse mediante el uso de un epítopo, tal como mediante una inmunización regular o mediante una metodología de exposición de fase en la que puede usarse un epítopo para cribar una genoteca de potenciales agentes de unión. Dichas moléculas reconocen uno o más epítomos de la proteína lisina o un ácido nucleico que codifica para la proteína lisina. Un anticuerpo que reconoce un epítopo puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado o una porción de una proteína de anticuerpo. Deseablemente, la molécula que reconoce un epítopo tiene una unión específica por ese epítopo que es al menos 10 veces tan fuerte como la que tiene la molécula por la albúmina sérica. La unión específica puede medirse como afinidad (Km). La unión específica puede ser de al menos 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 o incluso mayor que la que tiene por la albúmina sérica en las mismas condiciones.

40 En un ejemplo, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está en una forma útil para detectar la presencia de la proteína lisina. Se conocen varias formas y procedimientos para su síntesis, como apreciará el artesano experto. El anticuerpo puede estar conjugado (complejado covalentemente) con una molécula o átomo indicador tal como flúor, una enzima que crea una señal óptica, un quimiolumóforo, una micropartícula o un átomo radiactivo. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede sintetizarse *in vivo*, tras la inmunización de un animal, por ejemplo. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede sintetizarse a través de un cultivo celular tras una recombinación genética. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede prepararse mediante una combinación de síntesis celular y modificación química.

Variantes polipeptídicas

50 Las variantes por sustitución son aquellas en las que al menos un residuo de la secuencia de aminoácidos ha sido eliminado y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. Dichas sustituciones pueden realizarse según la siguiente Tabla 2 cuando se desea modular finamente las características de la proteína. La Tabla 2 muestra aminoácidos que pueden ser sustituidos por un aminoácido original en una proteína y que son considerados como sustituciones conservativas.

55

60

65

ES 2 357 626 T3

TABLA 2

	Residuo Original	
		Sustituciones Conservativas
5	Ala	ser
10	Arg	lys
	Asn	gln, his
15	Asp	glu
	Cys	ser
	Gln	asn
20	Glu	asp
	Gly	pro
	His	asn; gin
25	Ile	leu, val
	Leu	ile; val
30	Lys	arg; gln; glu
	Met	leu; ile
	Phe	met; leu; tyr
35	Ser	thr
	Thr	ser
	Trp	tyr
40	Tyr	trp; phe
	Val	ile; leu
45		

Los cambios sustanciales en la función o la identidad inmunológica se realizan seleccionando sustituciones que son menos conservativas que las de la Tabla 2, es decir, seleccionando residuos que difieran más significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de: (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o en hélice; (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo; o (c) el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que se espera que produzcan en general los mayores cambios en las propiedades de la proteína serán aquellas en las que: (a) un residuo hidrófilo, por ejemplo, serilo o treonilo, es sustituido por un residuo hidrófobo, por ejemplo, leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina es sustituida por cualquier otro residuo; (c) un residuo con una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo o histadilo, es sustituido por un residuo electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o (d) un residuo con una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, es sustituido por uno sin una cadena lateral, por ejemplo, glicina.

Pueden evaluarse los efectos de estas sustituciones o deleciones o adiciones de aminoácidos para derivados de la proteína lítica analizando la capacidad de las proteínas derivadas para complementar la sensibilidad a agentes de reticulación de ADN mostrada por los fagos en hospedadores bacterianos infectados. Estos ensayos pueden realizarse transfectando moléculas de ADN que codifican para las proteínas derivadas de las bacterias, según se describió anteriormente.

Las modificaciones sustanciales en la función o la identidad inmunológica del polipéptido de la enzima lítica se consiguen seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o

ES 2 357 626 T3

en hélice, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos basados en propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gin, his, lys, arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas pueden comportar el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos residuos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativa, o en los sitios (no conservados) remanentes.

Las variaciones polipeptídicas pueden realizarse usando procedimientos conocidos en la materia tales como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida), barrido de alanina y mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida [Carter y col., Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller y col., Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)], la mutagénesis de casete [Wells y col., Gene, 34: 315 (1985)], la mutagénesis de selección o restricción [Wells y col., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)] u otras técnicas conocidas, pueden realizarse sobre el ADN clonado para producir el ADN de la variante de la enzima lítica.

También puede emplearse el análisis de barrido de aminoácidos para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Por ejemplo, los aminoácidos de barrido pueden ser relativamente pequeños, aminoácidos neutros. Dichos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es típicamente un aminoácido de barrido preferido de entre este grupo porque elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]. La alanina también es típicamente preferida porque es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones enterradas como expuestas [Creighton, The Proteins, (W. H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol. 150: 1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no rinde cantidades adecuadas de la variante, puede usarse un aminoácido isotérico.

Proteínas de fusión quiméricas

En algunos ejemplos también pueden modificarse una lisina para formar una molécula quimérica que comprende una enzima lítica fusionada a otra, a un polipéptido heterólogo o a una secuencia de aminoácidos. Una “proteína quimérica” o “proteína de fusión” comprende toda o una parte (por ejemplo, una biológicamente activa) de un polipéptido de la desvelación unido operativamente a un polipéptido heterólogo. Las proteínas o péptidos quiméricos se producen, por ejemplo, combinando dos o más proteínas con dos o más sitios activos. Las proteínas y los péptidos quiméricos pueden actuar independientemente en la misma o en distintas moléculas, y por lo tanto tienen un potencial para tratar dos o más infecciones bacterianas diferentes al mismo tiempo. Las proteínas y los péptidos quiméricos también se utilizan para tratar una infección bacteriana mediante la escisión de la pared celular en más de una ubicación.

En un ejemplo, dicha molécula quimérica comprende una fusión de la enzima lítica con una etiqueta polipeptídica que proporciona un epítipo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. La etiqueta de epítipo se coloca generalmente en el amino o carboxilo terminal de la enzima lítica. La presencia de dichas formas etiquetadas con epítipo de la enzima lítica puede ser detectada usando un anticuerpo contra la etiqueta polipeptídica. También, la provisión de la etiqueta de epítipo permite que la enzima lítica sea fácilmente purificada mediante purificación de afinidad usando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la etiqueta de epítipo. En la materia se conocen diversas etiquetas polipeptídicas y sus respectivos anticuerpos. Algunos ejemplos incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-his) o de poli-histidina-glicina (poli-his-gli); la etiqueta polipeptídica HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 [Field y col., Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos de la misma 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 [Evan y col., Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985) 1; y la etiqueta de la glucoproteína D del virus Herpes Simplex (gD) y su anticuerpo [Paborsky y col., Protein Engineering: (6): 547-553 (1990)]. Otras etiquetas polipeptídicas incluyen el péptido Flag [Hopp y col., BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)]; el péptido de epítipo KT3 [Martin y col., Science 255: 192-194 (1992)]; un método de epítipo de α -tubulina [Skinner y col., J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991) 1; y la etiqueta peptídica de la proteína 10 del gen T7 [Lutz-Freyermuth y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 87: 6393-6397 (1990)].

En un ejemplo alternativo, la molécula quimérica puede comprender una fusión de la enzima lítica con una inmunoglobulina o una región en particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también denominada “inmunoadesina”), dicha fusión podría ser con la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones con Ig pueden incluir la sustitución de una forma soluble (dominio transmembranal deletado o inactivado) de un polipéptido de un enzima lítica en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. La fusión

de inmunoglobulina puede incluir las regiones de bisagra, CH2 y CH3, o la bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas, véase también la patente de EE.UU. N° 5.428.130 expedida el 27 de junio de 1995.

5 En otro ejemplo, la proteína o el péptido quimérico contiene una secuencia de señalización heteróloga en su N terminal. Por ejemplo, puede eliminarse la secuencia de señalización natural de un polipéptido de la desvelación y sustituirse por una secuencia de señalización de otra proteína. Por ejemplo, puede usarse la secuencia secretora gp67 de la proteína de cubierta de baculovirus como una secuencia de señalización heteróloga (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel y col., eds., John Wiley & Sons, 1992, incorporada al presente documento como
10 referencia). Otros ejemplos de secuencia de señalización heterólogas eucariotas incluyen las secuencias secretoras de melitina y de fosfatasa alcalina placentaria humana (Stratagene; La Jolla, California). En otro ejemplo más, algunas secuencias de señalización heterólogas procariotas incluyen la señal secretora phoA (Sambrook y col., más arriba) y la señal secretora de la proteína A (Pharmacia Biotech; Piscataway, Nueva Jersey).

15 Otro ejemplo de una proteína de fusión útil es una proteína de fusión GST en la que el polipéptido de la desvelación se fusiona con el C terminal de una secuencia GST. Dicha proteína quimérica puede facilitar la purificación de un polipéptido recombinante de la desvelación.

Otro ejemplo muestra una proteína de fusión de inmunoglobulina en la que todo o parte de un polipéptido de la
20 desvelación se fusiona con las secuencias derivadas de un miembro de la familia de proteínas de las inmunoglobulinas. Puede incorporarse una proteína de fusión de inmunoglobulina en una composición farmacéutica y administrarse a un sujeto para inhibir una interacción entre un ligando (soluble o unido a membrana) y una proteína en la superficie de una célula (receptor), para suprimir así la traducción de señales *in vivo*. La proteína de fusión de inmunoglobulina puede alterar la biodisponibilidad de un ligando cognado de un polipéptido de la desvelación. La inhibición de la interacción
25 ligando/receptor puede ser útil terapéuticamente, para tratar enfermedades asociadas a bacterias y alteraciones en la modulación (por ejemplo, promoción o inhibición) de la supervivencia celular. Además, una proteína de fusión de inmunoglobulina puede usarse como un inmunógeno para producir anticuerpos dirigidos contra un polipéptido de la desvelación en un sujeto, para purificar ligandos, y en ensayos de cribado para identificar moléculas que inhiben la interacción de receptores con ligandos. Las proteínas y péptidos quiméricos y de fusión de la desvelación
30 pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante estándar.

En otro ejemplo, el gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales, incluyendo sintetizadores automáticos de ADN. Alternativamente pueden llevarse a cabo amplificaciones de fragmentos de genes mediante PCR usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos,
35 que subsiguientemente pueden hibridar y reamplificarse para generar una secuencia genética quimérica (véase, es decir, Ausubel y col., más arriba). Además, hay disponibles comercialmente muchos vectores de expresión que ya codifican para una fracción de fusión (es decir, un polipéptido GST). Puede clonarse un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de la desvelación en dicho vector de expresión, de forma que la fracción de fusión esté unida en marco al polipéptido de la desvelación.

40 *Combinación con secuencias de señalización*

Una secuencia de señalización de un polipéptido de puede facilitar el movimiento transmembranal de la proteína y los péptidos y fragmentos de péptidos de la desvelación hacia y desde las membranas mucosas, así como facilitar
45 la secreción y el aislamiento de la proteína secretada u otras proteínas de interés. Las secuencias de señalización se caracterizan típicamente por un núcleo de aminoácidos hidrófobos que generalmente son extendidos desde la proteína madura durante la secreción en uno o más eventos de escisión. Dichos péptidos de señalización contienen sitios de procesado que permiten la escisión de la secuencia de señalización desde las proteínas maduras según pasan a través de la vía secretora. Los polipéptidos descritos pueden comprender adicionalmente una secuencia de señalización, además
50 de la propia secuencia de señalización y del polipéptido en ausencia de la secuencia de señalización (es decir, los productos de escisión). En un ejemplo, puede unirse operativamente una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de señalización de la desvelación en un vector de expresión a una proteína de interés, tal como una proteína que habitualmente no es secretada o que de otro modo es difícil de aislar. La secuencia de señalización dirige la secreción de la proteína, tal como desde un hospedador eucariota en el que es transformado el vector de expresión, y la secuencia de señalización es subsiguiente o simultáneamente extendida. Entonces la proteína puede ser
55 fácilmente purificada desde el medio extracelular mediante procedimientos conocidos en la materia. Alternativamente, la secuencia de señalización puede unirse a una proteína de interés usando una secuencia que facilite la purificación, tal como con un dominio GST.

60 En otro ejemplo puede usarse una secuencia de señalización para identificar secuencias reguladoras, es decir, promotores, potenciadores, represores. Dado que las secuencias de señalización son la mayoría de los amino terminal de un péptido, se espera que los ácidos nucleicos que flanquean la secuencia de señalización en su lado amino terminal sean secuencias reguladoras que afecten a la transcripción. Por lo tanto, puede usarse una secuencia de nucleótidos que codifique para toda o una porción de una secuencia de señalización como una sonda para identificar y aislar la
65 secuencia de señalización y su región flanqueante, y puede estudiarse esta región flanqueante para identificar elementos reguladores en la misma. Las variantes de los polipéptidos de la desvelación pueden tener una secuencia de aminoácidos alterada, y pueden funcionar como agonistas (miméticos) o como antagonistas. Las variantes pueden generarse mediante mutagénesis, es decir, mutaciones puntuales discretas o truncamiento. Un agonista puede conservar

sustancialmente las mismas, o un subconjunto, de las actividades biológicas de la forma natural de la proteína. Un antagonista de una proteína puede inhibir una o más de las actividades de la forma natural de la proteína mediante, por ejemplo, la unión competitiva a un miembro cascada abajo o cascada arriba de una cascada de señalización celular que incluye la proteína de interés. Por lo tanto, los efectos biológicos específicos pueden ser desencadenados mediante el tratamiento con una variante de función limitada. El tratamiento de un sujeto con una variante con un subconjunto de las actividades biológicas de la forma natural de la proteína puede tener menos efectos secundarios en un sujeto con respecto al tratamiento con la forma natural de la proteína. Las variantes de una proteína de la desvelación que funcionan como agonistas (miméticos) o como antagonistas pueden identificarse mediante el cribado de genotecas combinatorias de mutantes, es decir, mutantes de truncamiento, de la proteína de la desvelación, para identificar la actividad agonista o antagonista. En un ejemplo, se genera una variedad de genotecas de variantes mediante mutagénesis combinatoria a nivel de ácido nucleico y está codificada por una genoteca variada. Puede producirse una variedad de genotecas mediante, por ejemplo, la ligación enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas de forma que un conjunto degenerado de potenciales secuencias proteicas sea expresable como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión mayores (es decir, para la visualización del fago). Existen varios procedimientos que pueden usarse para producir genotecas de variantes potenciales de los polipéptidos de la desvelación a partir de una secuencia oligonucleotídica degenerada. Los procedimientos para sintetizar oligonucleótidos degenerados son conocidos en la materia (véase, es decir, Narang (1983) *Tetrahedron* 39: 3; Itakura y col. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53: 323; Itakura y col. (1984) *Science* 198: 1056; Ike y col. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11: 477, todos incorporados al presente documento como referencia).

20 *Enzimas transpuestas*

Ciertos ejemplos proporcionan proteínas o péptidos transpuestos que comprenden uno o más péptidos o variantes de la enzima lítica desvelada, productos génicos o péptidos para más de una proteína de fago relacionada o fragmentos de péptidos de la proteína que son escindidos aleatoriamente y reensamblados en una proteína más activa o específica. Las moléculas transpuestas de oligonucleótidos, péptidos o fragmentos de péptidos se eligen o criban para identificar una molécula con una propiedad funcional deseada. Este procedimiento se describe, por ejemplo, en Stemmer, patente de EE.UU. N° 6.132.970. (Method of shuffling polynucleotides); Kauffman, patente de EE.UU. N° 5.976.862 (Evolution via Condon based Synthesis) y Huse, patente de EE.UU. N° 5.808.022 (Direct Codon Synthesis). El contenido de estas patentes se incorpora al presente documento como referencia. Las transposiciones se usan para crear una proteína que es de 10 a 100 veces más activa que la proteína de molde. La proteína de molde se elige de entre diferentes variedades de proteínas lisinas u holinas. La proteína o los péptidos transpuestos constituyen, por ejemplo, uno o más dominios de unión y uno o más dominios catalíticos. Cada dominio de unión o catalítico deriva del mismo o de distinto fago o proteína de fago. Los dominios transpuestos son tanto moléculas basadas en oligonucleótidos como genes o productos génicos, que tanto solos como en combinación con otros genes o productos génicos son traducibles en un fragmento peptídico, o son moléculas basadas en péptidos. Los fragmentos génicos incluyen cualquier molécula de ADN, ARN, híbrido de ADN y ARN, ARN antisentido, ribozimas, ESTs, SNIPs y otras moléculas basadas en oligonucleótidos, que tanto solas como en combinación con otras moléculas producen una molécula oligonucleotídica capaz o incapaz de traducirse en un péptido.

40 *Modificación covalente de polipéptidos*

Otros ejemplos proporcionan modificaciones covalentes de una enzima lítica, o de un fragmento o variante de la misma. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar los residuos de aminoácidos objetivo de un polipéptido de un enzima lítica con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N o C-terminal de la enzima lítica. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular la enzima lítica con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su uso en el procedimiento de purificación de los anticuerpos anti-enzima lítica, y viceversa. Los agentes de reticulación usados habitualmente incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(propionato de succinimidilo), maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimidio-1,8-octano y agentes tales como propioimidato de metil-3-[(p-azidofenil)ditiol].

Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos de glutamilo y asparaginilo a los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, la metilación de los grupos α -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina [T., E. Creighton, *Proteins: Structure y Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, págs. 79-86 (1983)], la acetilación de la amina N-terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente del polipéptido de la enzima lítica proporcionada comprende alterar el patrón de glucosilación natural del polipéptido. La alteración del patrón de glucosilación natural pretende significar, para el propósito de este documento, la delección de una o más fracciones de carbohidratos halladas en la enzima lítica de secuencia natural (bien eliminando el sitio de glucosilación subyacente o bien deleccionando la glucosilación mediante medios químicos y/o enzimáticos), y/o la adición de uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en la enzima lítica de secuencia natural. Además, la frase incluye cambios cualitativos en la glucosilación de las proteínas naturales, que implican un cambio en la naturaleza y proporciones de las diversas fracciones de carbohidrato presentes.

ES 2 357 626 T3

La adición de sitios de glucosilación al polipéptido de la enzima lítica puede conseguirse alterando la secuencia de aminoácidos. La alteración puede realizarse, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en la enzima lítica de secuencia natural (para sitios de glucosilación unidos por O). La secuencia de aminoácidos de la enzima lítica puede alterarse opcionalmente a través de cambios a nivel del ADN, particularmente en mutando el ADN que codifica para el polipéptido de la enzima lítica en bases preseleccionadas, de forma que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio para incrementar el número de fracciones de carbohidratos del polipéptido de la enzima lítica es mediante un acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido. Dichos procedimientos se describen en la materia, por ejemplo, en el documento WO87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306 (1981).

La eliminación de las fracciones de carbohidrato presentes en el polipéptido de la enzima lítica puede conseguirse química o enzimáticamente, o mediante una sustitución mutacional de los codones que codifican para los residuos de aminoácidos que sirven como objetivo de la glucosilación. Las técnicas de desglucosilación química son conocidas en la materia y las describen, por ejemplo Hakimuddin, y col., Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (1987) y Edge y col., Anal. Biochem., 118: 131 (1981). La escisión enzimática de fracciones de carbohidrato en polipéptidos puede conseguirse mediante el uso de una variedad de endo y exoglucosidasas, según describen Thotakura y col., Meth. Enzymol., 138: 350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente de la enzima lítica comprende la unión del polipéptido de la enzima lítica a uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, en la manera establecida en las patentes de EE.UU. N^{os} 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

Proteínas holinas

Las lisinas bacterianas pueden opcionalmente comprender, o administrarse en combinación con, proteínas holinas. Las proteínas holinas pueden administrarse, por ejemplo, en combinación con uno o más péptidos de enzimas líticas, o variantes o fragmentos de los mismos. Las proteínas holinas producen orificios en la membrana celular, también pueden usarse. Las proteínas holinas, u "holinas", pueden formar lesiones letales en la membrana. Al igual que las proteínas líticas, las proteínas holinas son codificadas y portadas por un fago. La mayoría de las secuencias de las proteínas holinas son cortas, y en conjunto, de naturaleza hidrófoba, con un dominio carboxi terminal altamente hidrófilo. En muchos casos, la proteína holina putativa está codificada en un marco de lectura diferente dentro del dominio enzimáticamente activo del fago. En otros casos, la proteína holina está codificada por el ADN siguiente o cercano al ADN que codifica para la proteína lítica de la pared celular. Las proteínas holinas se sintetizan frecuentemente durante la etapa tardía de infección del fago, y se encuentran en la membrana citoplasmática, en la que causan lesiones de membrana.

Las holinas pueden agruparse en dos clases generales según el análisis de su estructura primaria. Las holinas de clase I tienen habitualmente 95 residuos o más, y pueden tener tres dominios transmembranales potenciales. Las holinas de clase II son habitualmente más pequeñas, de aproximadamente 65-95 residuos, con la distribución de los residuos cargados e hidrófobos indicando dos dominios TM (Young, y col. Trends in Microbiology v. 8, N^o 4, marzo de 2000). Al menos para los fagos de los hospedadores grampositivos, sin embargo, el sistema lítico de componente doble puede no ser universal. Aunque se ha demostrado o sugerido la presencia de holinas para varios fagos, todavía no se han encontrado genes que codifiquen para holinas putativas para todos los fagos. Se ha demostrado que las holinas están presentes en diversas bacterias, incluyendo, por ejemplo, el bacteriófago lactocócico Tuc2009, lactocócico NLC3, el bacteriófago neumocócico EJ 1, el bacteriófago de *LactoBacillus gasseri* Nadh, el bacteriófago de *Staphylococcus aureus* Twort, los bacteriófagos de *Listeria monocytogenes*, el fago neumocócico Cp 1, el fago de *Bacillus subtilis* M29, la lisina del bacteriófago de *LactoBacillus delbrueckii* LL H y el bacteriófago N11 de *Staphylococcus aureus*. (Loessner, y col., Journal of Bacteriology, agosto de 1999, págs. 4452-4460).

Polinucleótidos

Una lisina puede producirse mediante muchos procedimientos diferentes. La enzima lítica se produce infectando dichas bacterias GBS con el código genético aportado por un bacteriófago específico para dichas bacterias GBS. En otro ejemplo, la enzima lítica se produce mediante la producción recombinante a partir de un ácido nucleico que comprende un ADN con la secuencia de bases de una secuencia de polinucleótidos que codifica para uno o más polipéptidos de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que híbrida con el complemento de bases de una secuencia de polinucleótidos que codifica para las secuencias de polipéptidos de la SEQ ID NO: 1 en unas condiciones de hibridación adecuadas. La enzima lítica puede producirse eliminando un gen para la enzima lítica del genoma del fago, introduciendo dicho gen en un vector de transferencia y clonando dicho vector de transferencia en un sistema de expresión, donde el vector de transferencia es un plásmido. El sistema de expresión puede ser una bacteria seleccionada de cualquiera de los grupos enumerados anteriormente, o a partir de *E. coli*. En otro sistema de expresión, la producción de la enzima es mediante un sistema de expresión acelular.

Además de las secuencias polinucleotídicas naturales completas que codifican para los polipéptidos de la enzima lítica descritas, se contempla que pueden prepararse variantes de la enzima lítica. La degeneración del código genético

extiende adicionalmente el ámbito de los ejemplos, ya que permite variaciones importantes en la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN manteniendo la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. Por ejemplo, un residuo de aminoácido representativo es alanina. Ésta puede estar codificada por ADNc mediante el triplete de codón de nucleótidos GCT. Debido a la degeneración del código genético, otros tres tripletes de codones de nucleótidos - GCT, GCC y GCA- también codifican para alanina. Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos del gen podría cambiarse en esta posición por cualquiera de estos tres codones sin afectar a la composición del aminoácido de la proteína codificada o a las características de la proteína. El código genético y las variaciones en los codones de nucleótidos para aminoácidos en particular son conocidos por el artesano experto. Basándose en la degeneración del código genético, pueden derivarse variantes de moléculas de ADN a partir de las moléculas de ADNc desveladas usando técnicas de mutagénesis de ADN estándar, según se describió anteriormente, o mediante la síntesis de secuencias de ADN. Las secuencias de ADN que no hibridan en condiciones de rigurosidad con las secuencias de ADNc desveladas en virtud de la variación de la secuencia basada en la degeneración del código genético están comprendidas en este documento mediante esta desvelación.

Pueden prepararse variantes de enzimas líticas, por ejemplo, introduciendo los cambios apropiados en nucleótidos del ADN de la enzima lítica, y/o mediante la síntesis del polipéptido de la enzima lítica deseado. Los expertos en la materia apreciarán que los cambios en los aminoácidos pueden alterar los procesos post-traduccionales de la enzima lítica, tal como un cambio en el número o la posición de los sitios de glucosilación, o una alteración en las características de anclaje a la membrana.

Un experto en la materia reconocerá que las técnicas de mutagénesis de ADN descritas en este documento pueden producir una amplia variedad de moléculas de ADN que codifican para una lisina de bacteriófago específica para las bacterias GBS, que mantienen las características esenciales de la proteína lítica. También pueden seleccionarse proteínas recientemente derivadas con objeto de obtener variaciones en la característica de la proteína lítica, como se describirá más completamente a continuación. Dichos derivados incluyen aquellas con variaciones en la secuencia de aminoácidos que incluyen deleciones, adiciones y sustituciones menores. Mientras que el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la mutación *per se* no tiene por qué estar predeterminada. Por ejemplo, con objeto de optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, puede realizarse una mutagénesis aleatoria en el codón o región objetivo, y cribarse las variantes de la proteína expresada para la combinación óptima de actividad deseada. Las técnicas para realizar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados del ADN con una secuencia conocida según se describe anteriormente son conocidas. Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de residuos individuales; las inserciones serán habitualmente del orden de aproximadamente desde 1 hasta 10 residuos de aminoácidos; y las deleciones variarán aproximadamente desde 1 hasta 30 a residuos. Las deleciones o inserciones pueden ser de forma individual, pero preferiblemente se realizan en pares adyacentes, es decir, una deleción de 2 a residuos o una inserción de 2 residuos. Las sustituciones, deleciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas pueden combinarse para llegar a un constructo final.

El “porcentaje de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos” con respecto a las secuencias de la enzima lítica asociada al fago significa el porcentaje de nucleótidos de una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos de la secuencia de la enzima lítica asociada al fago, después de alinear las secuencias e introducir los huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia. El alineamiento con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos puede conseguirse de diversas formas que están al alcance de los expertos en la materia, incluyendo, pero no limitándose a, el uso de programas informáticos para ordenador disponibles públicamente.

Además de las secuencias de nucleótidos que codifican para la enzima lítica codificada genéticamente por un bacteriófago específico para GBS y los fragmentos de esas enzimas, correspondientemente se proporcionan las hebras de ADN complementario de la molécula de ADNc y moléculas de ADN que hibridan en condiciones rigurosas con la molécula de ADNc de la enzima lítica o su hebra complementaria. Dichas moléculas que hibridan incluyen moléculas de ADN que difieren únicamente en cambios menores en la secuencia, incluyendo sustituciones, deleciones y adiciones de nucleótidos. También están contemplados por esta desvelación oligonucleótidos aislados que comprenden al menos un segmento de la molécula de ADNc o su hebra complementaria, tales como oligonucleótidos que pueden emplearse como sondas de hibridación eficaces de ADN, o cebadores útiles en la reacción en cadena de la polimerasa. Las moléculas de ADN que hibridan y las variantes del ADNc de la enzima lítica pueden crearse fácilmente mediante técnicas estándar de biología molecular.

Una gran variedad de secuencias de ADNc aisladas que codifican para las enzimas líticas asociadas a fagos y las secuencias parciales que hibridan con dichas secuencias fílmicas son útiles para la producción recombinante de la enzima lítica. Las secuencias de ácidos nucleicos representativas en este contexto son secuencias polinucleotídicas que codifican para los polipéptidos de las SEQ ID NOS: 1-9, secuencia y secuencias que hibridan, en condiciones rigurosas, con secuencias complementarias del ADN que codifica para estas secuencias polipeptídicas. Todavía se contemplan aún variantes adicionales de estas secuencias y de secuencias de ácidos nucleicos que hibridan con las mostradas en las Figuras para su uso en la producción de enzimas líticas según la desvelación, incluyendo las variantes naturales que puedan obtenerse.

La detección de mutaciones específicas en el ADN puede conseguirse mediante procedimientos tales como hibridación usando oligonucleótidos específicos (Wallace y col. (1986). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 257-261), secuenciación directa de ADN (Church y Gilbert (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81: 1991-1995), el uso

de enzimas de restricción (Flavell y col. (1978). *Cell* 15: 25), la discriminación según la movilidad electroforética en geles con un reactivo desnaturalizante (Myers y Maniatis (1986). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 275-284), protección de ARNasa (Myers y col. (1985). *Science* 230: 1242), la escisión química (Cotton y col. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85: 4397-4401) (incorporado al presente documento como referencia), y el procedimiento de detección mediado por la ligasa (Landegren y col., 1988).

Muchas de las moléculas variantes de ADN contempladas incluyen aquellas creadas mediante técnicas estándar de mutagénesis de ADN, tales como la mutagénesis con el cebador M13. Los detalles de estas técnicas se proporcionan en Sambrook y col. (1989) *In Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y. (incorporado al presente documento como referencia). Mediante el uso de dichas técnicas pueden crearse variantes que difieren en formas menores con respecto a las desveladas. Las moléculas de ADN y las secuencias de nucleótidos que son derivadas de aquellas desveladas específicamente y que difieren de las desveladas mediante la delección, adición o sustitución de nucleótidos, codificando aún para una proteína que posee la característica funcional de la proteína BSMR, están contempladas por la desvelación. También están incluidas pequeñas moléculas de ADN que son derivados de moléculas de ADN que codifican para todas o parte de las secuencias peptídicas desveladas, o variantes de las mismas. Dichas moléculas pequeñas de ADN incluyen oligonucleótidos adecuados para su uso como sondas de hibridación o cebadores en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como tales, estas pequeñas moléculas de ADN comprenderán al menos un segmento de una enzima lítica codificado genéticamente por un bacteriófago específico para las bacterias GBS y, para el propósito de la PCR, comprenderán al menos una secuencia de 10-15 nucleótidos y, más preferiblemente, una secuencia de 15-30 nucleótidos del gen. Las moléculas de ADN y las secuencias de nucleótidos que derivan de las moléculas de ADN desveladas según se describió anteriormente, también pueden definirse como secuencias de ADN que hibridan en condiciones rigurosas con las secuencias de ADN desveladas, o fragmentos de las mismas.

Los oligonucleótidos específicos de secuencias normales o mutantes se sintetizan químicamente usando máquinas disponibles comercialmente, se marcan radioactivamente con isótopos (tales como ^{32}P) o no radioactivamente (con etiquetas tales como biotina (Ward y Langer y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 78: 6633-6657 1981) (incorporado al presente documento como referencia), y se hibridan con muestras individuales de ADN inmovilizadas sobre membranas u otros soportes sólidos mediante transferencia puntual o transferencia a partir de gel tras una electroforesis. La presencia o la ausencia de estas secuencias específicas se visualiza mediante procedimientos tales como una autorradiografía o reacciones fluorométricas o colorimétricas (Gebeyehu y col. *Nucleic Acids Res.* 15: 4513-4534 1987) (incorporado al presente documento como referencia).

Las diferencias en la secuencia entre las formas normal y mutante del gen también pueden revelarse mediante el método de secuenciación directa de ADN de Church y Gilbert (1988) (incorporado al presente documento como referencia). Los segmentos de ADN clonados pueden usarse como sondas para detectar segmentos específicos de ADN. La sensibilidad de este método se incrementa en gran medida cuando se combina con una PCR (Stoflet y col. *Science* 239: 491-494, 1988) (incorporado al presente documento como referencia). En esta metodología se usa un cebador de secuenciación, que yace dentro de la secuencia amplificada, con el producto bicatenario de la PCR o el molde monocatenario generado mediante una PCR modificada. La determinación de la secuencia se realiza mediante procedimientos convencionales con nucleótidos radiomarcados, o mediante procedimientos de secuenciación automática con etiquetas fluorescentes. Dichas secuencias son útiles para la producción de enzimas líticas según los ejemplos descritos.

Las condiciones de hibridación correspondientes al grado de rigurosidad en particular variarán dependiendo de la naturaleza del procedimiento de hibridación de elección y la composición y longitud del ADN de hibridación usado. Generalmente, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente la concentración del ión sodio) del tampón de hibridación determinarán la rigurosidad de la hibridación. Los cálculos relativos a las condiciones de hibridación requeridas para conseguir unos grados en particular de rigurosidad los discuten Sambrook y col. (1989), en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., capítulos 9 y 11, (incorporado al presente documento como referencia).

Un ejemplo de dicho cálculo es como sigue: puede realizarse un experimento de hibridación mediante la hibridación de una molécula de ADN (por ejemplo, una variación natural de la enzima lítica codificada genéticamente por una bacteria específica de las bacterias GBS) con una molécula de ADN objetivo. Un ADN objetivo puede ser, por ejemplo, el correspondiente ADNc que ha sido electroporado en un gel de agarosa y transferido a una membrana de nitrocelulosa mediante inmunotransferencia Southern (Southern (1975). *J. Mol. Biol.* 98: 503), una técnica bien conocida en la materia y descrita por Sambrook y col. (1989) en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y. (incorporado al presente documento como referencia). La hibridación con una sonda objetivo marcada con dCTP marcado con un isótopo de P(32) se lleva a cabo en una disolución de alta fuerza iónica tal como 6 veces SSC a una temperatura que está 20-25 grados Celsius por debajo del punto de fusión, T_m , (descrito más abajo). Para dichos experimentos de hibridación Southern en los que la molécula de ADN objetivo del transferido de Southern contiene 10 ng de ADN o más, la hibridación se lleva a cabo durante 6-8 horas usando 1-2 ng/ml de una sonda radiomarcada (con una actividad específica igual a 10^9 CPM/mug o mayor). Después de la hibridación, el filtro de nitrocelulosa se lava para eliminar la hibridación de fondo. Las condiciones de lavado son lo más rigurosas posibles para eliminar la hibridación de fondo, conservando una señal de hibridación específica. El término " T_m " representa la temperatura por encima de la cual, en las condiciones iónicas predominantes, la molécula de la sonda radiomarcada no hibridará con su molécula de ADN objetivo.

ES 2 357 626 T3

La T_m de dicha molécula híbrida puede estimarse a partir de la siguiente ecuación: $T_m = 81,5 \text{ grados C} - 16,6 \log 10$ de la concentración del ión sodio) + 0,41 (% de G + C) - 0,63 (% de formamida) - (600/I), donde I = la longitud del híbrido en pares de bases. Esta ecuación es válida para concentraciones de ión sodio en el intervalo de 0,01 M a 0,4 M, y es menos precisa para el cálculo de la T_m en disoluciones con una concentración de ión sodio más alta (Bolton y McCarthy (1962). Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 48: 1390) (incorporado al presente documento como referencia). La ecuación también es válida para un ADN con un contenido en G + C entre el 30% y el 75%, y también se aplica en híbridos mayores de 100 nucleótidos de longitud. El comportamiento de las sondas oligonucleotídicas se describe con detalle en el capítulo 11 de Sambrook y col. (1989), en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y. (incorporado al presente documento como referencia).

Por lo tanto, a modo de ejemplo, para una sonda de ADN de 150 pares de bases derivada de los primeros 150 pares de bases del marco abierto de lectura de un ADNc con un % de GC = 45%, un cálculo de las condiciones de hibridación requeridas para dar unas rigurosidades en particular puede realizarse como sigue:

Asumiendo que el filtro se lavará con una disolución 0,3 X SSC después de la hibridación, el ión sodio = 0,045 M; el % de GC = 45%; la concentración de formamida = 0, I = 150 pares de bases (véase la ecuación en Sambrook y col.) y por tanto la $T_m = 74,4$ grados C. La T_m del ADN bicatenario disminuye en 1-1,5 grados C con cada 1% de disminución en la homología (Bonner y col. (1973). J. Mol. Biol. 81: 123). Por lo tanto, para este ejemplo dado, lavando el filtro con 0,3 veces SSC a 59,4-64,4 grados C, producirá una rigurosidad de hibridación equivalente al 90%; las moléculas de ADN con una variación de más del 10% en la secuencia con respecto al ADNc del BSMR objetivo no hibridarán. Alternativamente, el lavado del filtro hibridado con 0,3 veces SSC a una temperatura de 65,4-68,4 grados C rendirá una rigurosidad de hibridación del 94%; las moléculas de ADN con más de un 6% de variación en la secuencia con respecto a la molécula de ADNc del BSMR objetivo no hibridarán. El ejemplo anterior se da únicamente a modo de ilustración teórica. El experto en la materia apreciará que pueden utilizarse otras técnicas de hibridación y que las variaciones en las condiciones experimentales necesitarán cálculos alternativos para la rigurosidad.

En algunos ejemplos, las condiciones de rigurosidad pueden definirse como aquellas bajo las cuales las moléculas de ADN con una variación en la secuencia de más del 25% (también denominada “mal emparejada”) no hibridarán. En un ejemplo, las condiciones rigurosas son aquellas bajo las cuales las moléculas de ADN con más del 15%, 10% o preferiblemente el 6% de errores de emparejamiento no hibridarán.

La “rigurosidad” de las reacciones de hibridación la determina fácilmente el experto en la materia, y generalmente es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración salina. En general, las sondas más largas requerirán temperaturas más altas para un apareamiento adecuado, mientras que las sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado de volver a aparearse cuando hay presentes hebras complementarias en un entorno por debajo de sus temperaturas de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseado entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, la consecuencia es que unas temperaturas relativas más altas tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que unas temperaturas más bajas lo harían menos. Para detalles adicionales y una explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

Las “condiciones rigurosas” o “condiciones de alta rigurosidad”, según se define en este documento, pueden identificarse mediante aquellas que: (1) emplean una baja fuerza iónica y alta temperatura de lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecilsulfato sódico al 0,1% a 50°C.; (2) emplean un agente desnaturizante durante la hibridación, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina sérica bovina al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) emplean formamida al 50%, 5 X SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0-1%, 5 X de disolución de Denhardt, ADN de esperma de salmón tratado con ultrasonidos (50 Kg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C., con lavados a 42°C, en 0,2 X SSC (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50% a 55°C, seguido por un lavado de alta rigurosidad consistente en 0,1 X SSC que contiene EDTA a 55°C.

Las “condiciones moderadamente rigurosas” pueden identificarse según se describe en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de disolución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es una incubación hasta el día siguiente a 37°C en una disolución que comprende: formamida al 20%, 5 X SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 X de disolución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10% y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado cortado, seguido de lavado de los filtros con 1 vez SSC a aproximadamente 37-50°C. El artesano experto reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. según sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

Vectores/células hospedadoras que expresan polinucleótidos para lisinas

También se proporcionan vectores que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos que codifican para una de las secuencias polipeptídicas de la lisina descrita, o variantes o fragmentos de la misma, incluyendo vectores formados únicamente a partir de la región de unión, o como mucho, de la proteína lisina completa, o la ligación/conjugación

de la región de unión con otra proteína. Otros ejemplos conciernen a células hospedadoras que son modificadas genéticamente con vectores de la desvelación y a la producción de polipéptidos de la desvelación mediante técnicas recombinantes. También pueden emplearse sistemas de traducción acelulares para producir dichas proteínas usando ARNs derivados de los constructos de ADN de la desvelación.

5 Para la producción recombinante, las células hospedadoras pueden modificarse genéticamente para incorporar sistemas de expresión o porciones de los mismos o polinucleótidos de la desvelación. La introducción de un polinucleótido en la célula hospedadora puede efectuarse mediante procedimientos descritos en muchos manuales de laboratorio estándar, tales como Davis y col., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, (1986) y Sambrook
10 y col., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), tales como, transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, carga por raspado, introducción balística e infección.

15 Algunos ejemplos representativos de hospedadores apropiados incluyen células bacterianas, tales como células de estreptococos, estafilococos, enterococos *E. coli*, *Streptomyces* y *Bacillus subtilis*; células fúngicas, tales como células de levadura y células de *Aspergillus*; células de insectos, tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células animales, tales como células CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293 y de melanoma Bowes; y células vegetales.

20 Puede usarse una gran variedad de sistemas de expresión para producir los polipéptidos de la desvelación. Dichos vectores incluyen, entre otros, vectores episomales y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de transposones, de episomas de levadura, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levadura, de virus tales como baculovirus, papovavirus, tales como SV40, virus de vacunas, adenovirus,
25 virus de la viruela aviar, virus y retrovirus de pseudorrabia, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como los derivados de plásmidos y de elementos genéticos de bacteriófagos, tales como cósmidos y fagémidos. Los sistemas de expresión constructos pueden contener regiones de control que regulen, así como engendren, la expresión. Generalmente puede usarse cualquier sistema o vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos y/o para expresar un polipéptido en un hospedador para la expresión a este respecto. La secuencia de ADN apropiada
30 puede insertarse en el sistema de expresión mediante cualquiera de las diversas técnicas conocidas y rutinarias, tales como, por ejemplo, las establecidas en Sambrook y col., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, (más arriba).

35 Para la secreción de la proteína traducida en la luz del retículo endoplásmico, en el espacio periplásmico o en el entorno extracelular, pueden incorporarse las señales de secreción apropiadas en el polipéptido expresado. Estas señales pueden ser endógenas al polipéptido, o pueden ser señales heterólogas.

Los polipéptidos de la desvelación pueden recuperarse y purificarse desde cultivos de células recombinantes mediante procedimientos conocidos que incluyen una precipitación con sulfato amónico o etanol, una extracción ácida,
40 una cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, una cromatografía en fosfocelulosa y una cromatografía de interacción hidrófoba, una cromatografía de afinidad, una cromatografía en hidroxilapatito y una cromatografía en lecitina. La cromatografía líquida de alta resolución también se emplea para la purificación. Pueden emplearse técnicas conocidas para desplegar proteínas para regenerar la conformación activa cuando el polipéptido es desnaturalizado durante el aislamiento y o la purificación.

45 El ácido nucleico está “unido operativamente” cuando está ubicado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para un líder de presecuencia o secretor está unido operativamente al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está posicionado de forma que facilite la traducción. Generalmente, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas, y en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se consigue mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan los adaptadores o conectores oligonucleotídicos sintéticos según la práctica convencional.

55 *Ensayos diagnósticos*

Los ensayos de detección utilizan ventajosamente un formato heterogéneo en el que se produce una reacción de unión entre un agente de unión conjugado y un analito, seguida de una etapa de lavado para eliminar el agente de
60 unión conjugado no unido. Por ejemplo, pueden prepararse partículas de oro en sol con una proteína que comprenda la región de unión con la proteína de unión inmovilizada en las superficies de las partículas. Según se produce la unión entre la proteína y las bacterias, las partículas se asocian y forman un producto coloreado. Análogamente, la proteína de unión puede complejarse, por ejemplo covalentemente, con una enzima tal como beta galactosidasa, peroxidasa o peroxidasa de rábano picante. Después del lavado, la enzima unida remanente puede detectarse añadiendo un sustrato,
65 tal como un sustrato fluorógeno o quimioluminógeno. La proteína de unión puede complejarse con cualquier otro reactivo que pueda crear una señal, tal como un flúor de tierras raras, y detectarse mediante fluorescencia resuelta en el tiempo, un material radioactivo y detectarse mediante la medida de la radioactividad, o una etiqueta fluorescente regular y detectarse mediante fluorescencia.

La conjugación de la región de unión con una etiqueta detectable puede llevarse a cabo mediante química sintética o un proceso biológico. Por ejemplo, puede unirse una secuencia de ADN que codifica para la región de unión o para la proteína de lisina completa, con información genética que codifica para un marcador detectable tal como una proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*, GFP) o una enzima tal como fosfatasa alcalina. Esto podría conseguirse separando el ADN para el dominio de unión, eliminando el dominio catalítico N-terminal y sustituyéndolo en marco por moléculas indicadoras tales como proteínas fluorescentes verdes (GFP), y purificando la molécula de fusión expresada para la identificación de las bacterias GBS. Dado que el dominio de unión tiene una afinidad de unión similar a la de una molécula de inmunoglobulina G, el dominio de unión marcado identificará de forma efectiva las bacterias GBS con una actividad de falso positivo baja. Uno también podría fusionar la molécula de GFP o una enzima en el extremo 5' de la enzima lisina completa si fuera necesario, haciendo esto, el dominio enzimático estará al menos parcialmente inactivado, permitiendo aún que el dominio de unión funcione para unirse a su sustrato en la pared celular.

El dominio de unión aislado separado del dominio catalítico puede expresarse, purificarse y etiquetarse usando varias moléculas fluorescentes tales como isotiocianato de fluoresceína, isotiocianato de rodamina y otras conocidas por los artesanos expertos. El dominio de unión puede modificarse con biotina para permitir la formación de un complejo biotina-avidina después de que la región de unión se adhiera a las bacterias GBS para su identificación.

A la región de unión pueden añadirse otros dominios catalíticos. Según han ejemplificado Díaz y col. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 87: 8125 (1990) para otro sistema, el dominio catalítico puede ser sustituido por dominios catalíticos de otras enzimas líticas de fagos para escindir otros enlaces en el peptidoglucano de la pared celular de las bacterias GBS. Por ejemplo, puede eliminarse la porción del extremo 5' del gen de la lisina gamma que codifica para el dominio catalítico N-terminal (una amidasa) y sustituirse por el dominio catalítico de las enzimas líticas de fagos de otro fago de GBS, e incluso de fagos de otras bacterias grampositivas y gramnegativas. Estos dominios catalíticos pueden ser otras amidasas (que pueden tener una actividad más alta o características especiales), muramidasas, glucaminidasas, o endopeptidasas, todas las cuales, cuando se fusionan genéticamente con el dominio de unión de la lisina gamma, escinden sus respectivos enlaces en el peptidoglucano de las bacterias GBS. En un ejemplo relacionado, pueden fusionarse dos o tres (o más) dominios catalíticos en tándem de diferentes especificidades (es decir, muramidasas-glucaminidasas-amidasa) a un único dominio de unión de la lisina gamma para escindir estos enlaces en el peptidoglucano de la pared celular de las bacterias GBS, produciendo una enzima de escisión altamente activa. Navarre (Identification of a D-alanyl glycine endopeptidase activity. J Biol Chem. 1999 May 28; 274: 15847-56.) ha demostrado que pueden existir dominios enzimáticos triples en enzimas líticas de bacteriófagos.

Pueden usarse diversos conectores convencionales, por ejemplo, diisocianatos, diisotiocianatos, carbodiimidas, ésteres de bis-hidroxi-succinimida, ésteres de maleimida-hidroxisuccinimida, glutaraldehído y similares, tal como un conector secuencial selectivo tal como el conector de anhídrido-isotiocianato desvelado en la patente de EE.UU. N° 4.680.338.

Composiciones terapéuticas

Las enzimas líticas también pueden usarse para proporcionar un tratamiento profiláctico para dolencias asociadas con la exposición a bacterias GBS, o como un tratamiento terapéutico para aquellos que ya han caído enfermos por la infección. Las enzimas líticas asociadas a fagos descritas son específicas para bacterias GBS, y preferiblemente rompen de forma efectiva y eficaz la pared celular de las bacterias GBS.

Los polipéptidos de enzimas líticas descritas también pueden emplearse como un agente terapéutico. Los polipéptidos de enzimas líticas de la presente invención pueden formularse según procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, para lo que el producto de enzima lítica del presente documento se combina en una mezcla con un vehículo o portador farmacéuticamente aceptables. Las composiciones que pueden usarse para el tratamiento profiláctico y terapéutico de una infección por bacterias GBS también incluyen la enzima transpuesta y/o química y un medio de aplicación (tal como un sistema portador o un modo de administración oral) en el revestimiento mucoso de las cavidades oral y nasal, de forma que la enzima se deposita en el sistema portador o modo de administración oral para que alcance el revestimiento de la mucosa.

Los "portadores" según se usa en este documento incluyen portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero que se expone a los mismos a las dosis y concentraciones empleadas. A menudo, el portador fisiológicamente aceptable es una disolución acuosa de pH tamponado. Algunos ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; un polipéptido de bajo peso molecular (menor de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparragina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, polietilenglicol (PEG) y PLURONICSTM.

Antes de, o en el momento en el que la enzima lítica modificada es introducida en el sistema portador o modo de administración oral, la enzima puede estar en un entorno tamponado estabilizante para mantener un intervalo de pH adecuado, tal como entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0, incluyendo un pH de aproximadamente 5,0,

ES 2 357 626 T3

6,0, 7,0, 8,0 o cualquier intervalo de pH de 0,05 entre los mismos, o cualquier intermedio que sea un múltiplo de 0,05 entre los mismos, incluyendo valores de pH de 5,2, 6,5, 7,4, 7,5 y 8,5.

5 Las formulaciones terapéuticas se preparan para su almacenamiento mezclando el principio activo con el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menor de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como
10 albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparragina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o PEG.

15 Cualquiera de los portadores para la enzima lítica puede elaborarse mediante medios convencionales. Sin embargo, si se usa alcohol en el portador, la enzima debería estar en una micela, liposoma o un liposoma "inverso", para evitar la desnaturalización de la enzima. De forma similar, cuando la enzima lítica se está introduciendo en el portador, y el portador es, o debe ser, calentado, dicha introducción debe realizarse después de que el portador se haya enfriado un poco, para evitar la desnaturalización térmica de la enzima. El portador es preferiblemente estéril. Pueden añadirse una o más enzimas líticas a estas sustancias en forma líquida o en estado liofilizado, con lo que estará solubilizada cuando se encuentre con un cuerpo líquido.

Tampones estabilizantes

25 Un tampón estabilizante debería permitir la actividad óptima de la enzima lisina. El tampón puede contener un reactivo reductor, tal como ditioneitol. El tampón estabilizante también puede ser o incluir un reactivo quelante de metales, tal como la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético, o también puede contener un tampón de fosfato o de citrato fosfato, o cualquier otro tampón. El ADN que codifica para estos fagos y otros fagos puede alterarse para
30 permitir que una enzima recombinante ataque una pared celular en más de dos ubicaciones, para permitir que la enzima recombinante escinda la pared celular de más de una especie bacteriana, para permitir que la enzima recombinante ataque a otras bacterias o cualquier combinación de las mismas. El tipo y el número de alteraciones en una enzima recombinante producida por un bacteriófago son incalculables. Pueden ensamblarse muchas enzimas quiméricas y transpuestas, solas o junto con proteínas holinas, para tratar la exposición a bacterias GBS.

Mucoadhesivos

35 En algunos ejemplos, una composición terapéutica comprende un mucoadhesivo y una enzima lítica, o enzimas líticas quiméricas y/o transpuestas, o sus fragmentos peptídicos cuando la composición está dirigida al revestimiento mucoso para destruir las bacterias patológicas colonizantes. El revestimiento mucoso, según se describe, incluye, por ejemplo, el tracto respiratorio superior e inferior, ojos, cavidad bucal, nariz, recto, vagina, bolsa periodontal, intestinos y colon. Debido a los mecanismos naturales de eliminación o limpieza de los tejidos mucosos, las formas de dosificación convencionales no son retenidas en el sitio de aplicación durante un periodo significativo de tiempo.

45 Por estas y otras razones es ventajoso tener materiales que muestren adhesión a los tejidos mucosos, para ser administrados con una o más enzimas de fagos y otros agentes complementarios durante un periodo de tiempo. Los materiales con una capacidad de liberación controlada son particularmente deseables, y el uso de mucoadhesivos de liberación sostenida ha recibido un significativo grado de atención.

50 J. R. Robinson (patente de EE.UU. N° 4.615.697, incorporada al presente documento como referencia) proporciona una revisión de las diversas composiciones poliméricas de liberación controlada usadas en la administración de fármacos en mucosas. La patente describe una composición de tratamiento de liberación controlada que incluye un bioadhesivo y una cantidad eficaz de un agente tratante. El bioadhesivo es un polímero carboxi funcional fibroso, reticulado, hinchable en agua pero insoluble en agua que contiene (a) una pluralidad de unidades repetitivas de las que
55 al menos aproximadamente el 80% contienen al menos una funcionalidad carboxilo, y (b) aproximadamente del 0,05 hasta aproximadamente el 1,5 por ciento de agentes de reticulación sustancialmente libres de poliéter de polialqueno. Aunque los polímeros de Robinson son hinchables pero insolubles en agua, están reticulados, no son termoplásticos, y no son fáciles de formular con principios activos, y en las diversas formas de dosificación, como los sistemas de copolímero de la presente solicitud. También pueden usarse micelas y micelas multilaminares para controlar la liberación de la enzima.

60 Se conocen otras metodologías que implican mucoadhesivos que son la combinación de materiales hidrófilos e hidrófobos. Orahesive® de E. R. Squibb & Co es un adhesivo que es una combinación de pectina, gelatina y carboximetil celulosa sódica en un polímero adherente de hidrocarburo, para adherirse a la mucosa oral. Sin embargo, dichas mezclas físicas de componentes hidrófilos e hidrófobos fracasan con el tiempo. Por el contrario, los dominios hidrófilo e hidrófobo de la presente desvelación producen un copolímero insoluble.

La patente de EE.UU. N° 4.948.580, también incorporada como referencia, describe un sistema de administración oral de fármacos bioadhesivo. La composición incluye una mezcla polimérica liofilizada formada por el copolímero poli(metilvinil éter/anhídrido maleico) y gelatina, dispersado en una base de ungüento, tal como aceite mineral que contiene polietileno dispersado. La patente de EE.UU. N° 5.413.792 (incorporada al presente documento como referencia) de la preparaciones de tipo pasta que comprenden (A) una base de tipo pasta que comprende un poliorganosiloxano y un material polimérico soluble en agua que pueden estar presentes en una proporción ponderal desde 3:6 hasta 6:3, y (B) un principio activo. La patente de EE.UU. N° 5.554.380 reivindica un sistema de administración de fármacos bioadherente ingerible oralmente sólido o semisólido que contiene un sistema de agua en aceite con al menos dos fases. Una fase comprende desde aproximadamente el 25% hasta aproximadamente el 75% en volumen de una fase hidrófila interna, y la otra fase comprende desde aproximadamente el 23% hasta aproximadamente el 75% en volumen de una fase hidrófoba externa, en el que la fase hidrófoba externa está constituida por tres componentes: (a) un emulsionante, (b) un éster de glicérido, y (c) un material ceroso. La patente de EE.UU. N° 5.942.243 describe algunos materiales de liberación representativos útiles para administrar agentes antibacterianos, cuya desvelación se incorpora como referencia.

Una composición terapéutica puede contener mucoadhesivos poliméricos consistentes esencialmente en un copolímero injertado que comprende una cadena principal hidrófila y cadenas hidrófobas injertadas para la liberación controlada de agentes biológicamente activos. El copolímero injertado es un producto de reacción de (1) un macromonomero de poliestireno con un grupo funcional insaturado etilénicamente, y (2) al menos un monómero ácido hidrófilo con un grupo funcional insaturado etilénicamente. Las cadenas injertadas consisten esencialmente en poliestireno, y la cadena polimérica principal en fracciones monoméricas hidrófilas, algunas de las cuales tienen funcionalidad ácida. El porcentaje en peso del macromonomero de poliestireno en el copolímero injertado está entre aproximadamente el 1 y aproximadamente el 20%, y el porcentaje en peso del monómero hidrófilo total en el copolímero injertado está entre el 80 y el 99%, y en el que al menos el 10% de dicho monómero hidrófilo total es ácido, teniendo dicho copolímero injertado, cuando está completamente hidratado, un contenido de agua en equilibrio de al menos el 90%.

Las composiciones que contienen los copolímeros se hidratan gradualmente mediante sorción de los fluidos tisulares en el sitio de aplicación, para rendir una masa gelatinosa muy blanda que muestra adhesión a la superficie de la mucosa. Durante el periodo de tiempo en el que la composición está adherida a la superficie de la mucosa, proporciona la liberación sostenida del agente farmacológicamente activo, que es absorbido por el tejido mucoso.

La mucoadhesividad de las composiciones de estos ejemplos es producida, en gran medida, por los monómeros ácidos hidrófilos de la cadena del copolímero de poliestireno injertado. Los monómeros ácidos incluyen, pero no se limitan a, ácidos acrílico y metacrílico, ácido 2 acrilamido 2 metil propanosulfónico, metacrilato de 2 sulfoetilo y ácido vinilfosfónico. Otros monómeros copolimerizables incluyen, pero no se limitan a, N,N dimetilacrilamida, metacrilato de glicerilo, monometacrilato de polietilenglicol, etc.

Las composiciones de la desvelación pueden contener opcionalmente otros materiales poliméricos, tales como ácido poliacrílico, polivinilpirrolidona, y plastificantes de carboximetil celulosa sódica, y otros excipientes farmacéuticamente aceptables en cantidades que no provoquen un efecto perjudicial en la mucoadhesividad de la composición. Las formas de dosificación de las composiciones de esta desvelación pueden prepararse mediante procedimientos convencionales.

Productos farmacéuticos

La presente desvelación también proporciona composiciones que comprenden uno o más agentes farmacéuticos y una o más lisinas. Adicionalmente se proporcionan procedimientos de tratamiento que combinan la administración de uno o más agentes farmacéuticos y una o más lisinas administrados separadamente o en combinación.

Los productos farmacéuticos que pueden usarse incluyen agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, agentes antivíricos, agentes anestésicos locales, corticosteroides, agentes de terapia destructora, antifúngicos y antiandrógenos. Los productos farmacéuticos activos que pueden usarse en formulaciones tópicas incluyen agentes antimicrobianos, especialmente aquellos con propiedades antiinflamatorias tales como dapsona, eritromicina, minociclina, tetraciclina, clindamicina y otros antimicrobianos. Los porcentajes en peso para los antimicrobianos son desde aproximadamente el 0,5% hasta aproximadamente el 10%.

Algunos anestésicos locales incluyen tetracaína, clorhidrato de tetracaína, lidocaína, clorhidrato de lidocaína, diclonina, clorhidrato de diclonina, clorhidrato de dimetisoquina, dibucaína, clorhidrato de dibucaína, butambenpicrato y clorhidrato de pramoxina. Un ejemplo de concentración para anestésicos locales es desde aproximadamente el 0,025% hasta aproximadamente el 5% en peso de la composición total. Pueden usarse anestésicos tales como benzocaína a una concentración preferida de aproximadamente el 2% hasta aproximadamente el 25% en peso.

Algunos corticosteroides que pueden usarse incluyen dipropionato de betametasona, acetónido de fluocinolona, valerato de betametasona, acetónido de triamcinolona, propionato de clobetasol, desoximetasona, diacetato de diflora-sona, amcinonida, flurandrenolida, valerato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona y desonida están recomendados a unas concentraciones de aproximadamente el 0,01% al 1,0% en peso. Las concentraciones para corticosteroides tales como hidrocortisona o acetato de metilprednisolona pueden ser desde aproximadamente el 0,2% hasta aproximadamente el 5,0% en peso.

ES 2 357 626 T3

También pueden usarse agentes de terapia destructora tales como ácido salicílico o ácido láctico. Puede usarse a una concentración de aproximadamente el 2% hasta aproximadamente el 40% en peso. Puede utilizarse cantaridina, por ejemplo, en una concentración de aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 30% en peso. Los antifúngicos típicos que pueden usarse en composiciones tópicas y algunos ejemplos de concentraciones en peso adecuadas incluyen: nitrato de oxiconazol (del 0,1% al 5,0%), ciclopirox olamina (del 0,1% al 5,0%), ketoconazol (del 0,1% al 5,0%), nitrato de miconazol (del 0,1% al 5,0%) y nitrato de butoconazol (del 0,1% al 5,0%). Pueden incluirse otros agentes tópicos para abordar una variedad de coinfecciones tópicas que puedan aparecer, como apreciarán los artesanos expertos.

Típicamente, los tratamientos que usan una combinación de fármacos incluyen antibióticos en combinación con anestésicos locales tales como sulfato de polimicina B y sulfato de neomicina en combinación con tetracaína para geles antibióticos tópicos, para proporcionar profilaxis frente a la infección y aliviar el dolor. Otro ejemplo es el uso de minoxidilo en combinación con un corticosteroide tal como dipropionato de betametasona para el tratamiento de la alopecia areata. También es un ejemplo la combinación de un antiinflamatorio tal como cortisona con un antifúngico tal como ketoconazol para el tratamiento de infecciones de tiña.

La composición puede comprender dapsona y etoxidiglicol, que permite una proporción optimizada entre el fármaco microparticulado y el fármaco disuelto. Esta proporción determina la cantidad de fármaco administrado, en comparación con la cantidad de fármaco retenida en o por encima del estrato córneo para actuar en el dominio supracórneo. El sistema de dapsona y etoxidiglicol puede incluir agua purificada combinada con polímero gelificante de "CARBOPOL®", metilparabeno, propilparabeno, dióxido de titanio, BHA y un material cáustico para neutralizar el "CARBOPOL®".

Con objeto de acelerar el tratamiento de la infección, el agente terapéutico puede incluir adicionalmente al menos un agente complementario que también puede potenciar la actividad bactericida de la enzima lítica. El agente complementario puede ser eritromicina, claritromicina, azitromicina, roxitromicina, otros miembros de la familia de los macrólidos, penicilinas, cefalosporinas y cualesquiera combinaciones de las mismas en cantidades que son efectivas para incrementar sinérgicamente el efecto terapéutico de la enzima lítica. Puede usarse prácticamente cualquier otro antibiótico con la enzima lítica modificada. De forma similar, pueden incluirse otras enzimas líticas en el portador para tratar otras infecciones bacterianas. Pueden incluirse enzimas holinas en el tratamiento terapéutico.

En algunos ejemplos puede usarse un tensioactivo suave en una cantidad eficaz para potenciar el efecto terapéutico de la enzima lítica modificada en, o en combinación con, una composición terapéutica. Algunos tensioactivos suaves que incluyen, entre otros, ésteres de polioxietilensorbitano y ácidos grasos (serie Tween), octilfenoxipolietoxietanol (serie Triton X), n octil beta D glucopiranosido, n octil beta D tioglucopiranosido, n decal beta D glucopiranosido, n dodecil beta D glucopiranosido, y tensioactivos biológicos naturales, por ejemplo, ácidos grasos, glicéridos, monoglicéridos, desoxicolato y ésteres de desoxicolato.

Administración de composiciones que comprenden lisinas

Las composiciones terapéuticas que comprenden una o más enzimas líticas, tales como PlyGBS, o variantes o fragmentos de las mismas, pueden administrarse a un sujeto mediante cualquier medio adecuado. Los medios de aplicación de la(s) enzima(s) lítica(s) (modificada(s) o no modificada(s)) incluyen, pero no se limitan a, medios directos, indirectos, portadores y medios especiales, o cualquier combinación de medios. La aplicación directa de la enzima lítica puede ser mediante pulverizadores nasales, gotas nasales, ungüentos nasales, lavados nasales, inyecciones nasales, taponamientos nasales, pulverizadores e inhaladores bronquiales, o indirectamente a través del uso de pastillas para la garganta, enjuagues orales o gárgaras, o a través del uso de ungüentos aplicados en las fosas nasales, o cualquier combinación de estos procedimientos de aplicación y similares. Las formas en las que la enzima lítica puede administrarse incluyen, pero no se limitan a, pastillas, caramelos medicinales, caramelos, inyectables, gomas de mascar, comprimidos, polvos, pulverizadores, líquidos, ungüentos y aerosoles. Es muy probable que la exposición a las bacterias GBS sea a través de la nariz. Lo mejor es ser tratado para la exposición a las bacterias lo antes posible.

Cuando la(s) enzima(s) lítica(s) se introduce(n) directamente mediante el uso de pulverizadores nasales, gotas nasales, ungüentos nasales, lavados nasales, inyecciones nasales, taponamientos nasales, pulverizadores bronquiales, pulverizadores orales e inhaladores, la enzima puede estar en un entorno líquido o de gel, actuando el líquido como portador. Puede administrarse una versión anhidra o a seca de la enzima modificada mediante el inhalador y el pulverizador bronquial, aunque también puede usarse una forma líquida de administración.

La pastilla, comprimido o goma en la que se añade la enzima puede contener azúcar, jarabe de maíz, una variedad de pigmentos, edulcorantes no azucarados, saborizantes, cualquier ligante o combinaciones de los mismos. De forma similar, cualquier producto basado en goma puede contener acacia, cera de carnaúba, ácido cítrico, almidón de maíz, colorantes alimentarios, saborizantes, edulcorantes no azucarados, gelatina, glucosa, glicerina, goma base, goma laca, sacarina sódica, azúcar, agua, cera blanca, celulosa, otros ligantes, y combinaciones de los mismos.

Las pastillas pueden contener adicionalmente sacarosa, almidón de maíz, acacia, goma de tragacanto, anetol, linaza, oleorresina, aceite mineral y celulosa, otros ligantes, y combinaciones de los mismos. En otro ejemplo de la desvelación, se usan sustitutos de azúcar en lugar de dextrosa, sacarosa u otros azúcares.

ES 2 357 626 T3

Como se mencionó anteriormente, la enzima también puede introducirse en un pulverizador nasal, en el que el aerosol es el portador. El pulverizador nasal puede ser un pulverizador de efecto prolongado o de liberación regular, y puede elaborarse mediante medios conocidos en la materia. También puede usarse un inhalador, de forma que la enzima pueda llegar más abajo en el tracto bronquial, incluyendo dentro de los pulmones.

Cualquiera de los portadores para la enzima lítica puede elaborarse mediante medios convencionales. Sin embargo, se prefiere que cualquier enjuague oral o producto de tipo similar no contenga alcohol para evitar la desnaturalización de la enzima, aunque las enzimas en liposomas y otros modos y formas protectoras pueden usarse en alcohol. De forma similar, cuando la(s) enzima(s) se está(n) introduciendo en unas gotas para la tos, goma, caramelo o pastilla durante el proceso de elaboración, dicha introducción debería realizarse antes del endurecimiento de la pastilla o el caramelo, pero después de que las gotas para la tos o el caramelo se hayan enfriado un poco, para evitar la desnaturalización térmica de la enzima. La enzima también puede pulverizarse sobre la superficie de la gota para la tos, goma, caramelo o pastilla, en dosis lo suficientemente altas para que sean eficaces.

La enzima puede añadirse a estas sustancias en una forma líquida o en un estado liofilizado, con lo que estará solubilizada cuando se encuentre con fluidos corporales tales como la saliva. La enzima también puede estar en una micela o en un liposoma.

Dosificación de lisinas

Las tasas o cantidades de dosis eficaz de la(s) enzima(s) para tratar la infección dependerán en parte de si la(s) enzima(s) se usará(n) terapéuticamente o profilácticamente, de la duración de la exposición del receptor a las bacterias infecciosas, del tamaño y el peso del individuo, etc. La duración del uso de la composición que contiene la enzima también depende de si el uso es para propósitos profilácticos, en los que el uso puede ser cada hora, diario o semanal, durante un corto periodo de tiempo, o de si el uso será para propósitos terapéuticos, en los que puede requerirse un régimen más intensivo del uso de la composición, de forma que el uso puede durar horas, días o semanas, y/o sobre una base diaria o en intervalos regulares durante el día. Cualquier forma de dosificación empleada debería proporcionar un mínimo de unidades durante una mínima cantidad de tiempo. La concentración de unidades activas de la enzima que puede proporcionar una cantidad eficaz o dosis de la enzima puede estar en el intervalo de aproximadamente 10 unidades/ml de fluido en el entorno húmedo o mojado de los conductos nasal y oral, y también tópicamente, y posiblemente en el intervalo de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 unidades/ml hasta aproximadamente 50.000 unidades/ml. Algunos valores representativos incluyen por tanto aproximadamente 200 unidades/ml, 300 unidades/ml, 500 unidades/ml, 1.000 unidades/ml, 2.500 unidades/ml, 5.000 unidades/ml, 10.000 unidades/ml, 20.000 unidades/ml, 30.000 unidades/ml y 40.000 unidades/ml. Más específicamente, el tiempo de exposición a las unidades de enzima activa puede influir en la concentración deseada de unidades de enzima activa por ml. Debería mencionarse que los portadores que se clasifican como portadores de liberación "larga" o "lenta" (tales como, por ejemplo, ciertos pulverizadores nasales o pastillas) podían poseer o proporcionar una menor concentración de unidades activas (de enzima) por ml, pero durante un período de tiempo más largo, mientras que un portador de liberación "corta" o "rápida" (tal como, por ejemplo, un gargarismo) podría poseer o proporcionar una concentración mayor de unidades activas (de enzima) por ml, pero durante un periodo de tiempo más corto. La cantidad de unidades activas por ml y la duración del tiempo de exposición dependen de la naturaleza de la infección, de si el tratamiento va a ser profiláctico o terapéutico, y de otras variantes. Por lo tanto, el número de dosis dependerá de las circunstancias, y puede variar desde 1-4 veces al día o más, con duraciones desde un día hasta varias semanas. Pueden producirse infecciones en la piel, y por lo tanto dichas composiciones pueden formularse asimismo para su aplicación tópica, usando vehículos conocidos tales como los descritos en las patentes de EE.UU. 6.056.954 y 6.056.955.

Procedimientos de tratamiento

Existen muchas ventajas en el uso de enzimas líticas para tratar infecciones bacterianas, particularmente por bacterias GBS. El diseño modular de las lisinas, con sus claros dominios catalítico y de unión, las hace ideales para experimentos de intercambio de dominios en los que las especificidades y las actividades catalíticas bacterianas pueden mejorarse o adaptarse para el uso frente a patógenos alternos. Dado que los objetivos catalíticos y de unión de las lisinas (peptidoglucano y carbohidratos asociados, respectivamente) son en gran parte esenciales para la viabilidad, la resistencia a las lisinas será rara.

El "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico y profiláctico como a medidas preventivas, en las que el objeto es prevenir o retardar (atenuar) la dolencia o afección patológica objetivo. Aquellos que necesitan el tratamiento incluyen aquellos que ya presentan la afección, así como aquellos que tienden a presentar la afección o aquellos en los que la afección debe prevenirse.

Un "mamífero", para el propósito del tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoo, deportes o mascotas, tales como perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* son preferiblemente estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril, antes o después de la liofilización y la reconstitución. Las composiciones terapéuticas de este documento generalmente se introducen en un recipiente con

ES 2 357 626 T3

puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de disolución intravenosa o un vial con un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

5 La vía de administración es según los procedimientos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión mediante las vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional, administración tópica o mediante sistemas de liberación sostenida. Cuando se trata una exposición o una infección bacteriana, la enzima lítica puede administrarse de cualquier forma adecuada, incluyendo por vía parenteral o a través de la cavidad oral o nasal.

10 Las dosis y las concentraciones de fármaco deseadas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo del uso previsto en particular. La determinación de la dosis o vía de administración apropiadas está en la pericia del médico habitual. Los experimentos animales proporcionan una guía fiable para la determinación de las dosis eficaces para la terapia humana. El escalado interespecie de la dosis eficaz puede realizarse siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. y Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi y col., Eds., Pergamon Press, Nueva York 1989, págs. 42-15 96.

20 Cuando se emplea la administración *in vivo* de una enzima lítica, las cantidades de dosis normales pueden variar desde aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal del mamífero o más por día, o aproximadamente 1 µg/kg/día hasta 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. Más abajo también se proporciona una guía sobre las dosis y procedimientos de administración en particular, así como en la bibliografía. Se anticipa que diferentes formulaciones serán eficaces para diferentes compuestos de tratamiento y afecciones diferentes, que la administración dirigida a un órgano o tejido, por ejemplo, puede necesitar la administración de una forma diferente a la de otro órgano 25 tejido.

30 Cuando se desea una administración de liberación sostenida de una enzima lítica en una formulación con unas características de liberación adecuadas para el tratamiento de cualquier enfermedad o afección que requiera la administración de la enzima lítica, se contempla la microencapsulación de la enzima lítica. La microencapsulación de proteínas recombinantes para su liberación sostenida se ha realizado con éxito con la hormona de crecimiento humana (rhGH), interferón-(rhIFN-), interleucina-2 y MN rgp120. Johnson y col., Nat. Med., 2: 795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27: 1221-1223 (1993); Hora y col., Bio/Technology. 8: 755-758 (1990); Cleland, "Design y Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems". en Vaccine Design: The Subunit y Adjuvant Approach, Powell y Newman, eds, (Plenum Press: Nueva York, 1995), págs. 439-462; documentos WO97/03692, WO96/40072, WO96/07399; y patente de EE.UU. N° 5.654.010. 35

40 Las formulaciones de liberación sostenida de estas proteínas pueden usar un polímero de ácido poliláctico-coglicólico (*polylactic-coglycolic acid*, PLGA) debido a su biocompatibilidad y amplia gama de propiedades biodegradables. Los productos de degradación del PLGA, los ácidos láctico y glicólico, pueden eliminarse rápidamente en el cuerpo humano. Además, la degradabilidad de este polímero puede ajustarse desde meses hasta años dependiendo de su peso molecular y composición. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", en: M. Chasin y R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: Nueva York, 1990), págs. 1-41. 35

45 *Infección cutánea*

50 Las composiciones para el tratamiento de infecciones tópicas comprenden una cantidad eficaz de al menos una lisina producida según esta desvelación y un portador para administrar al menos una enzima lítica a la piel infectada. El modo de aplicación de la enzima lítica incluye varios tipos y combinaciones de portadores que incluyen, pero no se limitan a, un líquido acuoso, un líquido de base alcohólica, un gel soluble en agua, una loción, un ungüento, una base líquida no acuosa, una base de aceite mineral, una mezcla de aceite mineral y vaselina, lanolina, liposomas, portadores de proteínas tales como albúmina sérica o gelatina, carmel celulosa en polvo, y combinaciones de los mismos. Un modo de administración del portador que contiene el agente terapéutico incluye, pero no se limita a, un extendido, un pulverizador, un parche de liberación sostenida, un paño impregnado en líquido, y combinaciones de los mismos. La enzima lítica puede aplicarse a una venda bien directamente o bien en uno de los otros portadores. Las vendas 55 pueden venderse mojadas o secas, en las que la enzima está en una forma liofilizada en la venda. Este procedimiento de aplicación es el más eficaz para el tratamiento de la piel infectada.

60 Los portadores de las composiciones tópicas pueden comprender vehículos semisólidos y de tipo gel que incluyen un espesante polimérico, agua, conservantes, tensioactivos o emulsionantes activos, antioxidantes, filtros solares y un disolvente o un sistema disolvente mixto. La patente de EE.UU. N° 5.863.560 (Osborne) discute muchas combinaciones diferentes de portadores que pueden ayudar en la exposición de la piel a un medicamento.

65 Los espesantes poliméricos que pueden usarse incluyen los conocidos por el experto en la materia, tal como agentes gelificantes hidrófilos e hidroalcohólicos usados frecuentemente en las industrias cosmética y farmacéutica. El agente gelificante hidrófilo o hidroalcohólico puede comprender, por ejemplo, "CARBOPOL®" (B. F. Goodrich, Cleveland, Ohio), "HYPAN®" (Kingston Technologies, Dayton, N. J.), "NATROSOL®" (Aqualon, Wilmington, Del.), "KLUCEL®" (Aqualon, Wilmington, Del.) o "STABILEZE®" (ISP Technologies, Wayne, N. J.). El agente gelificante puede comprender entre aproximadamente el 0,2% y aproximadamente el 4% en peso de la composición. Más par-

ES 2 357 626 T3

5 ticularmente, algunos ejemplos de la gama de porcentajes ponderales de la composición de “CARBOPOL®” pueden estar entre aproximadamente el 0,5% y aproximadamente el 2%, mientras que la gama de porcentajes ponderales para “NATROSOL®” y “KLUCCEL®” puede estar entre aproximadamente el 0,5% y aproximadamente el 4%. Una gama de porcentajes ponderales para la composición de “HYPAN®” y “STABILEZE®” puede estar entre aproximadamente el 0,5% y aproximadamente el 4%.

10 “CARBOPOL®” es uno de los numerosos polímeros del ácido acrílico reticulados que tienen el nombre general adoptado de carbómero. Estos polímeros se disuelven en agua y forman un gel claro o ligeramente brumoso tras la neutralización con un material cáustico tal como hidróxido sódico, hidróxido potásico, trietanolamina u otras bases amínicas. “KLUCCEL®” es un polímero de celulosa que está dispersado en agua y forma un gel uniforme tras su hidratación completa. Otros polímeros gelificantes incluyen hidroxietil celulosa, goma de celulosa, polímero cruzado de decadieno y MVE/MA, copolímero de PVM/MA, o una combinación de los mismos.

15 También pueden usarse conservantes en esta invención, y pueden comprender, por ejemplo, aproximadamente del 0,05% hasta el 0,5% en peso de la composición total. El uso de conservantes asegura que si el producto es contaminado por microbios, la formulación evitará o disminuirá el crecimiento de los microorganismos. Algunos conservantes útiles en esta invención incluyen metilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, cloroxilenol, benzoato sódico, DMDM hidantoína, carbamato de 3-yodo-2-propilbutilo, sorbato potásico, digluconato de clorhexidina, o una combinación de los mismos.

20 También puede usarse dióxido de titanio como filtro solar para que sirva como agente profiláctico frente a la fotosensibilización. Algunos filtros solares alternativos incluyen cinamato de metilo. Además, puede usarse BHA como un antioxidante, así como para proteger al etoxidiglicol y/o la dapsona de la decoloración debida a la oxidación. Un antioxidante alternativo es BHT.

25 En un ejemplo, la invención comprende una composición dermatológica con aproximadamente del 0,5% al 10% de carbómero, y aproximadamente del 0,5% al 10% de un producto farmacéutico que existe tanto un estado disuelto como en un estado microparticulado. El producto farmacéutico disuelto tiene la capacidad de atravesar el estrato córneo, mientras que el producto farmacéutico microparticulado no lo hace. La adición de una base amínica, potasio, una disolución de hidróxido o una disolución de hidróxido sódico completa la formación del gel. Más particularmente, el producto farmacéutico puede incluir dapsona, un agente antimicrobiano con propiedades antiinflamatorias. Un ejemplo de proporción entre la dapsona microparticulada y disuelta es de cinco o menos.

30 En otro ejemplo, la invención comprende aproximadamente un 1% de carbómero, aproximadamente un 80-90% de agua, aproximadamente un 10% de etoxidiglicol, aproximadamente un 0,2% de metilparabeno, aproximadamente un 0,3% al 3,0% de dapsona, incluyendo tanto dapsona microparticulada como dapsona disuelta, y aproximadamente un 2% de material cáustico. Más particularmente, el carbómero puede incluir “CARBOPOL® 980” y el material cáustico puede incluir una disolución de hidróxido sódico.

40 En un ejemplo, si hay una infección bacteriana en el tracto respiratorio superior, la infección puede tratarse profiláctica o terapéuticamente con una composición que comprende una cantidad eficaz de al menos una enzima lítica producida por una bacteria que está infectada con un bacteriófago específico para esa bacteria, y un portador para administrar la enzima lítica en la boca, garganta o cavidad nasal. La enzima lítica puede ser una enzima lítica, una enzima lítica quimérica y/o una enzima lítica transpuesta, que puede usarse junto con una proteína holina o una combinación de las mismas. La enzima lítica puede estar en un entorno con un pH que permita la actividad de la enzima lítica. Si un individuo ha estado expuesto a alguien con una afección del tracto respiratorio superior, la enzima lítica residirá en el revestimiento mucoso y evitará cualquier colonización de las bacterias infectantes.

Administración parenteral

50 En algunos ejemplos, cualquier infección puede tratarse por vía parenteral. Las enzimas que pueden usarse son, como más arriba, enzimas líticas, enzimas líticas quiméricas, enzimas líticas transpuestas, y combinaciones de las mismas. Las enzimas pueden administrarse por vía intramuscular, intravenosa, subcutánea, subdérmica, o combinaciones de las mismas. En un ejemplo, las infecciones pueden tratarse inyectando en el paciente un agente terapéutico que comprende la(s) enzima(s) lítica(s) transpuesta(s) y/o quimérica(s) y un portador para la(s) enzima(s). El portador puede estar constituido por agua destilada, una disolución salina, albúmina, un suero, o cualquier combinación de los mismos. Más específicamente, pueden prepararse disoluciones para infusión con inyección de una forma convencional, por ejemplo, con la adición de conservantes tales como p-hidroxibenzoatos o estabilizantes tales como sales de metales alcalinos del ácido etilendiaminotetraacético, que pueden transferirse entonces a recipientes de fusión, viales de inyección o ampollas. Alternativamente, el compuesto para inyección puede liofilizarse con o sin los demás ingredientes, y solubilizarse en una disolución tamponada o agua destilada, según sea apropiado, en el momento del uso. En este documento también son útiles vehículos no acuosos tales como aceites fijados, liposomas y oleato de etilo. En la composición pueden incluirse otras enzimas líticas asociadas a fagos, junto con una proteína holina.

65 En los casos en los que el modo de administración elegido es una inyección intramuscular, puede usarse una formulación isotónica. Generalmente, los aditivos para isotonicidad pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En algunos casos se usan disoluciones isotónicas tales como una disolución salina tamponada con fosfato. Algunos estabilizantes incluyen gelatina y albúmina. En algunos ejemplos se añade un agente vasoconstrictor

ES 2 357 626 T3

a la formulación. Las preparaciones farmacéuticas se proporcionan estériles y exentas de pirógenos. Generalmente, según se mencionó anteriormente, la inyección intravenosa puede ser lo más apropiado.

5 El portador contiene adecuadamente cantidades menores de aditivos tales como sustancias que incrementan la isotonicidad y la estabilidad química. Dichos materiales no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, succinato, ácido acético y otros ácidos orgánicos o sus sales; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez residuos), por ejemplo, poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; glicina; aminoácidos tales como ácido glutámico, ácido aspártico, 10 histidina o arginina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo celulosa o sus derivados, glucosa, manosa, trehalosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones tales como sodio; tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos, poloxámeros o polietilenglicol (PEG); y/o sales neutras, por ejemplo, NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, etc.

15 La glicerina o glicerol (1,2,3 propanotriol) está disponible comercialmente para uso farmacéutico. La glicerina o glicerol puede diluirse en agua estéril para inyección, o cloruro sódico para inyección, u otro fluido de inyección acuoso farmacéuticamente aceptable, y usarse en concentraciones del 0,1 al 100% (v/v), del 1,0 al 50% o aproximadamente el 20%.

20 El DMSO es un disolvente aprótico con una notable capacidad para incrementar la penetración de muchos fármacos aplicados localmente. El DMSO puede diluirse en agua estéril para inyección, o en cloruro sódico para inyección, o en cualquier fluido de inyección acuoso farmacéuticamente aceptable, y usarse en concentraciones del 0,1 al 100% (v/v). El vehículo también puede incluir disolución de Ringer, una disolución tamponada y una disolución de dextrosa, particularmente cuando se prepara una disolución intravenosa.

25 Antes de, o en el momento en el que la enzima es introducida en el sistema portador o el modo de administración oral, puede ser deseable para las enzimas estar en un entorno tamponado estabilizante, manteniendo un intervalo de pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 7,5.

30 El tampón estabilizante debería permitir la actividad óptima de la enzima. El tampón puede ser un reactivo reductor, tal como ditiotreitol. El tampón estabilizante también puede ser o incluir un reactivo quelante de metales, tal como la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético, o también puede contener un tampón de fosfato o citrato fosfato. Los tampones que se encuentran en el portador pueden servir para estabilizar el entorno para las enzimas líticas.

35 Las tasas o cantidades de dosis eficaces de la enzima que se va a administrar por vía parenteral, y la duración del tratamiento, dependerán en parte de la gravedad de la infección, el peso del paciente, la duración de la exposición del receptor a las bacterias infecciosas, la gravedad de la infección y una variedad de muchas otras variables. La composición puede aplicarse en cualquier parte desde una hasta varias veces al día, y puede aplicarse durante un periodo a corto o a largo plazo. El uso puede durar días o semanas. Cualquier forma de dosificación empleada debería proporcionar un número mínimo de unidades para una mínima cantidad de tiempo. La concentración de unidades activas de enzima que se cree puede aportar una cantidad o dosis eficaz de la enzima puede estar en el intervalo de aproximadamente 10, 40 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 unidades/ml hasta aproximadamente 10.000.000 unidades/ml de la composición, en un intervalo de aproximadamente 1.000 unidades/ml hasta aproximadamente 10.000.000 unidades/ml, y desde aproximadamente 10.000 hasta 10.000.000 unidades/ml. La cantidad de unidades activas por ml y la duración del tiempo 45 de exposición dependen de la naturaleza de la infección y de la cantidad de contacto que permita el portador que tenga la enzima. Debe recordarse que la enzima trabaja mejor cuando está en un entorno fluido. Por lo tanto, la eficacia de la enzima está relacionada en parte con la cantidad de humedad atrapada por el portador. La concentración de la enzima para el tratamiento depende del recuento bacteriano en sangre y del volumen de sangre.

50 Con objeto de acelerar el tratamiento de la infección, el agente terapéutico puede incluir adicionalmente al menos un agente complementario que también puede potenciar la actividad bactericida de la enzima lítica. El agente complementario puede ser cualquier antibiótico eficaz frente a bacterias GBS. De forma similar, pueden incluirse otras enzimas líticas para tratar otras infecciones bacterianas.

55 Adicionalmente, pueden usarse numerosos procedimientos para ayudar en el transporte de la enzima a través de la membrana celular. La enzima puede ser transportada en un liposoma, siendo la enzima "insertada" en los liposomas mediante técnicas conocidas. De forma similar, la enzima puede estar en una micela invertida. La enzima también puede estar pegilada, uniendo el polietilenglicol a la parte no activa de la enzima. Alternativamente, pueden usarse moléculas hidrófobas para transportar la enzima a través de la membrana celular. Finalmente, puede usarse la glucosilación de la enzima para dirigirla a receptores de internalización específicos en la membrana de la célula.

Ejemplos

Material

65 Se obtuvieron endonucleasas de restricción de New Engly Biolabs (Beverly, MA). Todos los reactivos usados se adquirieron en Sigma (St. Louis, MO) salvo que se indique de otro modo. Las cepas y plásmidos bacterianos usados en este estudio están enumerados en la Tabla 3 al final de los Ejemplos.

ES 2 357 626 T3

Ejemplo 1

Clonación y alineación de secuencias de la PlyGBS

5 Se cribaron los clones de la genoteca del fago de GBS NCTC11261 para buscar un posible gen de lisina en una superposición bacteriana de GBS NCTC11237. La secuencia completa del gen de la lisina (plyGBS) se obtuvo secuenciando el ADN genómico del fago NCTC11261. Unas búsquedas similares indicaron que tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos, este gen era idéntico en más del 90% en varias lisinas de diversas especies estreptocócicas, incluyendo la lisina del fago B30 de GBS (SEQ ID NO: 1) (número de acceso al GenBank AAN28166), la lisina asociada al fago M1 de *Streptococcus pyogenes* (AAK33905) y la proteína asociada al fago de *Streptococcus equi* (AF186180).

15 El alineamiento de la secuencia proteica putativa de la PlyGBS con la lisina del fago neumocócico Cp-1 (Cpl-1) y la lisina del fago estafilocócico 187 (Ply187) indicaron que la PlyGBS tiene tres dominios diferentes. Los 107 aminoácidos N-terminales son idénticos en un 27% a un dominio de la Ply187 que funciona como una endopeptidasa. Para los aminoácidos 150-394 (dominio central), la PlyGBS muestra una identidad del 46% con el dominio de muramidasa N-terminal de la Cpl-1. También hay presentes dos aminoácidos Asp y Glu, en la PlyGBS en las posiciones 158 (Asp) y 185 (Glu).

20 Ejemplo 2

Caracterización de la PlyGBS

25 Basándonos en la secuencia de aminoácidos deducida, la PlyGBS tiene un valor teórico de pI (punto isoelectrico) de 4,88. Con Tris-HCl 25 mM (pH 7,4) como tampón de elución en una cromatografía de intercambio iónico, la proteína se cargó negativamente y se unió a un intercambiador aniónico de Q-Sepharose cargado positivamente. La enzima fue eluida con un gradiente de NaCl, y las fracciones activas se agruparon y se analizaron mediante SDS-PAGE. La principal banda proteica a aproximadamente 50 KDa se correlacionaba con la masa molecular calculada para la PlyGBS (49,6 KDa). La preparación final, con una pureza estimada >95% mediante densitometría de barrido

30 en el gel SDS-PAGE teñido con Coomassie, se usó para todos los experimentos subsiguientes.

Se determinó que el pH óptimo de la PlyGBS purificada estaba alrededor de 5,0, con un intervalo de pH activo entre 4.0-6.0. La cromatografía de filtración en gel de la PlyGBS indica que la proteína funciona como un monómero.

35 Ejemplo 3

*Actividad *in vitro* de la PlyGBS (ensayo de destrucción lítica por densidad óptica *in vitro*)*

40 Para ensayar la actividad *in vitro* de la PlyGBS sobre varias cepas bacterianas, todas las cepas fueron inoculadas hasta el día siguiente, subcultivadas (1:100), y se hicieron crecer hasta una $DO_{600} = 0.3$. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en un volumen 1/10 de tampón de fosfato (40 mM, pH 5,0). Se incubaron alícuotas de 100 microlitros de la disolución bacteriana (5×10^8 - 10^9 ufc/ml) con las cantidades indicadas de PlyGBS a 37 grados C durante 60 min. Se usó un espectrofotómetro para controlar la actividad lítica, medida como la gota en mDO_{600} por minuto ($-mDO_{600}/min$). La velocidad inicial de esta reacción se define como la tasa de lisis. Para determinar la viabilidad bacteriana, se centrifugaron las células de la cepa de GBS NCTC11237 del ensayo anterior, se diluyeron y se colocaron en placas de agar THY para los recuentos celulares. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, y los experimentos de control con la adición de tampón de fosfato (pH 5,0) se realizaron en las mismas condiciones.

50 Para determinar la actividad de la PlyGBS *in vitro* frente a las células GBS, las células GBS (NCTC 11237, serotipo IIR) se mezclaron con 40 unidades de PlyGBS a 37 grados C durante 60 min. La DO_{600} cayó hasta la línea de base en 10 min, indicando una rápida tasa de lisis celular, que es corroborada por el descenso en 2 log observado en la viabilidad a 60 minutos. Cuando se ensayaron múltiples cepas de GBS, que representaban los serotipos Ia, Ib, Ic/II, IIR, IIIR, así como los serotipos predominantes III y V, para comprobar la sensibilidad frente a la PlyGBS basándose en la actividad lítica, se observó una velocidad de lisis similar ($-mDO_{600}/min$), con una cierta variación de una cepa a otra.

55 Además de las GBS, se analizaron cepas bacterianas que representaban una variedad de especies para determinar su sensibilidad a la PlyGBS *in vitro*. De las cepas estreptocócicas ensayadas pertenecientes a diferentes grupos de Lancefield, la PlyGBS tuvo una actividad lítica significativa frente a los grupos de estreptococos A, C, G y L, con poca o ninguna actividad frente a los grupos D, E y N. También se ensayó la actividad muralítica de la PlyGBS frente a especies estreptocócicas orales no Lancefield, incluyendo *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. sobrinus* y *S. mutans*. La PlyGBS tenía una actividad entre media y baja frente a *S. salivarius*, *S. gordonii* y *S. mutans*, pero ninguna actividad frente a las otras dos especies comensales ensayadas. No se observó actividad lítica con las dos especies estreptocócicas grampositivas, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, ni con dos bacterias comensales vaginales, *Lactobacillus acidophilus* y *L. crispatus*.

Se usaron microscopía de contraste de fases y electrónica para visualizar el efecto lítico de la lisina sobre las células GBS (un ejemplo de "actividad lítica"). Normalmente, las GBS intactas forman cadenas cortas en un tampón de

ES 2 357 626 T3

control. Tras el tratamiento con la lisina de la PlyGBS, las células fueron lisadas, liberando el contenido citoplasmático y volviéndose opacas ante microscopía de luz. Según se observa con otras lisinas mediante microscopía electrónica, un punto débil en la pared celular producido por la PlyGBS da como resultado extrusiones y la ruptura de la membrana citoplasmática, que parece estar más localizada dentro de la región del septo de las células en división. La subsiguiente pérdida del contenido citoplasmático transforma las células en “células fantasma” vacías.

Ejemplo 4

Actividad in vivo de la PlyGBS (ensayo de destrucción in vivo en un modelo de ratón)

Se adquirieron ratones hembra de seis semanas de edad BALB/c en Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Dado que se cree que la colonización bacteriana en la cavidad vaginal de ratón es más eficiente en el estro, se sincronizó el ciclo estral de todos los ratones en el día 1 mediante la inoculación subcutánea de 0,1 mg de valerato de β -estradiol. En el día 3, se anestesiaron 30 ratones y se inocularon vaginalmente con $\sim 10^6$ células de GBS NCTC11237 resistentes a estreptomycin usando una micropipeta (dosis de 20 μ l en tampón de fosfato 40 mM, pH 5,0). En el día 4, los ratones fueron tratados vaginalmente con 20 μ l de tampón de fosfato (pH 5,0) y se le realizó un frotis con hisopos ultrafinos con una punta de alginato cálcico (Fischer, Pittsburgh, PA). Las superficies de las placas de agar THY que contenían un 5% de sangre de oveja y estreptomycin (200 μ g/ml) se sembraron en estrías con los hisopos húmedos para determinar la colonización de línea de base. Entonces los ratones se distribuyeron al azar para ser tratados vaginalmente con 20 μ l de tampón de fosfato (pH 5,0) (n = 15) o 10 unidades de lisina de PlyGBS (n = 15). A las 2 y 4 h tras el tratamiento, a todos los ratones se les realizó otro frotis para la determinación del título.

Para ensayar si podía usarse la PlyGBS en el tratamiento posparto de recién nacidos, 38 ratones recibieron una exposición respiratoria superior de aproximadamente 10⁸ células StrR de GBS NCTC11237 (20 μ l por vía oral y 20 μ l en cada fosa nasal). A la mañana siguiente, a los ratones se les realizaron frotis orofaríngeos y se contó la colonización de línea de base según se describió anteriormente. Los ratones se distribuyeron al azar y se les administraron por vía oral y nasal 20 μ l de tampón de fosfato, pH 5,0 (n = 18) o 10 unidades de lisina de PlyGBS (n = 20). A las 2 y 4 h tras el tratamiento, a todos los ratones se les realizó un frotis orofaríngeo para determinar el recuento bacteriano.

Para el análisis estadístico se usó el modelo MIXED (de SAS Mixed Procedure) para comparar el estado de colonización entre los grupos. Se consideró significativo un valor de $P < 0,05$.

Se realizó un ensayo de destrucción *in vivo* para evaluar la actividad lítica *in vivo* de la PlyGBS se probó administrando la PlyGBS a GBS colonizados en un modelo de vagina de ratón. Para realizar esta prueba, se expusieron vaginalmente dos grupos de ratones a 10⁶ ufc de células StrR de GBS. Subsiguientemente, 24 horas después, se hizo un frotis de las cavidades vaginales para determinar la tasa de colonización inicial (muestras a las 0 h, antes del tratamiento). Entonces los ratones se trataron vaginalmente con tampón (n = 15) o con la PlyGBS (n = 15), y se les realizó un frotis 2 h y 4 h tras el tratamiento. Se observó un efecto insignificante en los animales con el tampón de control. Por el contrario, los animales tratados con una única dosis de PlyGBS mostraron una reducción significativa (aproximadamente una caída 3 log) en la carga bacteriana en ambos intervalos de 2 h y 4 h en comparación con el tampón de control ($p < 0,0001$).

De forma similar, dos grupos de ratones fueron expuestos a un total de 10⁸ ufc de StrR de GBS administradas por vía oral y nasal para determinar si podía usarse la PlyGBS para reducir las GBS colonizadas en el tracto respiratorio superior del ratón. Los ratones tratados con una única dosis de lisina por la misma ruta mostraron una reducción significativa en la colonización por GBS en ambos intervalos de frotis de 2 h y 24 h en comparación con el grupo del tampón de control ($p < 0,0001$).

Ejemplo 5

Producción de la lisina mutante de PlyGBS mediante mutagénesis usando una cepa mutadora de E. coli

Se usó la cepa de *Escherichia coli* XL-1 Red (Stratagene, Inc., La Jolla, CA, Tabla 3) para generar mutaciones aleatorias en la PlyGBS debido a deficiencias en las tres vías primarias de reparación del ADN (*mutS*, *mutD* y *mutT*) que dan como resultado una tasa de mutación significativamente más alta que la cepa natural. Se transformó el plásmido pCQJ67-2 que contiene el gen natural de plyGBS en *E. coli* XL-1 Red y se propagó en placas LB complementadas con canamicina (50 μ g/ml) a 37 grados C hasta el día siguiente. Las colonias se rasparon de las placas de agar y se subcultivaron (1:100) para otro crecimiento hasta el día siguiente, permitiendo que se acumularan las mutaciones en el ADN del plásmido. La mañana siguiente, el cultivo se subcultivó para un crecimiento adicional de 6 h y se preparó el ADN del plásmido. Los plásmidos resultantes que contenían mutaciones aleatorias se transformaron en la cepa de expresión proteica de *E. coli* BL21 (DE3) y se cribaron más de 5.000 clones para comprobar una actividad de la lisina mejor que la de la PlyGBS natural, usando el método de la zona clara según se describió previamente en Schuch, R., D. Nelson y V. A. Fischetti, “A bacteriolytic agent that detects y kills *Bacillus anthracis*”, Nature 418: 884-889 (2002). Para evitar cualquier mutación potencial en la región promotora, se preparó ADN de plásmido a partir de los clones con una actividad mejor que el natural, y se digirió con NcoI y XhoI. El fragmento de gen de plyGBS liberado se clonó en pET28a, y el plásmido resultante se transformó en *E. coli* BL21 (DE3) para confirmar la actividad de lisina incrementada. Se usó un análisis de la secuencia de ADN para localizar las mutaciones.

Ejemplo 6

Mutagénesis génica usando el método de la PCR propensa a error

5 Otro procedimiento de mutagénesis utilizado fue el “Diversify PCR Random Mutagenesis Kit” (BD Bioscience, Palo Alto, CA). El procedimiento implica realizar una reacción de PCR en unas condiciones que reducen la fidelidad de incorporación de nucleótidos, clonando los fragmentos de la PCR resultantes y después cribando la genoteca para buscar nuevas mutaciones con una actividad de lisina incrementada. La tasa de mutación de la PCR se eligió alrededor de 2,7 por 1.000 pb manteniendo la concentración de manganeso en 320 μM en la reacción. Se enumeran dos cebadores para PCR en Cheng, Q. y col., “Removal of group B streptococci colonizing the vagina y oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme”, Antimicrob. Agents Chemother. 49: 111-117 (2005). El producto de la PCR se digirió con NcoI y XhoI, y se clonó en pET28a para el cribado, usando el procedimiento mencionado anteriormente. Se realizaron múltiples series de mutagénesis por PCR para mejorar la actividad de la lisina.

15 Ejemplo 7

Construcción de mutantes de delección de plyGBS

20 Se construyeron varios mutantes de delección basándose en la organización de dominios de la plyGBS, y se muestra un mapa esquemático en la Fig. 4. Todas las regiones fueron amplificadas mediante PCR y clonadas en pET28a para la expresión proteica. La mutante PlyGBS92 (SEQ ID NO: 6), expresada a partir del plásmido pCQJ92 (Tabla 3), codifica para el dominio de muramidasa putativo [aminoácidos (aa) 150-394]. La mutante PlyGBS93 (SEQ ID NO: 7) contiene la región de los aa 150-443, que deleciona el dominio de endopeptidasa N-terminal. La mutante PlyGBS94 (SEQ ID NO: 8), expresada a partir de pCQJ94 (Tabla 3), contiene los primeros 146 aa, que es el dominio de endopeptidasa putativo. Otra mutante, la PlyGBS95 (SEQ ID NO: 9), que contiene una delección del dominio de muramidasa central (delección entre los aa 147-348), fue expresada a partir de pCQJ95, construido insertando el fragmento de PCR digerido por HindIII/XhoI (C-terminal del gen de plyGBS, pb 1045-1332) en pCQJ94. Todos los plásmidos construidos para la expresión mutante fueron secuenciados para confirmar la delección esperada.

30 Ejemplo 8

Comparación de la actividad y estabilidad de lisina

35 Para comparar la actividad de lisina de varias mutantes, se hicieron crecer clones y se indujo la sobreexpresión proteica en volúmenes de 10 ml en las mismas condiciones a las descritas en Cheng, Q. y col., “Removal of group B streptococci colonizing the vagina y oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme”, Antimicrob. Agents Chemother. 49: 111-117 (2005). Los extractos de proteína brutos se usaron para el ensayo de actividad *in vitro*. Con objeto de cuantificar la actividad proteica, se realizaron cultivos a gran escala (1 litro) de cada mutante. Dado que las mutantes tenían un pI (punto isoeléctrico) similar al de la enzima natural (Tabla 1), la purificación se realiza mediante cromatografía de intercambio aniónico según describen Cheng, Q. y col., “Removal of group B streptococci colonizing the vagina y oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme”, Antimicrob. Agents Chemother. 49: 111-117 (2005). Las fracciones activas se agruparon y se electroforesizaron en un gradiente del 4-20% de Tris-HCl en gel SDS-PAGE pre-cilindro (Bio-Rad, Hercules, CA). La actividad de la lisina se cuantificó según se describe en Cheng, Q. y col., “Removal of group B streptococci colonizing the vagina y oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme”, Antimicrob. Agents Chemother. 49: 111-117 (2005). La concentración proteica se determinó usando el BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL) para calcular la actividad específica de cada mutante.

50 Dado que las mutantes PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4) obtenidas por mutagénesis aleatoria tenían una actividad específica significativamente mayor que la PlyGBS natural, la estabilidad de las mutantes se comparó con la de la natural en condiciones de almacenamiento. Se almacenaron PlyGBS naturales recién purificadas, así como dos mutantes, PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS90-8 (SEQ ID NO: 4), directamente a 4 grados C o en glicerol al 25% a -80 grados C. Se realizó un ensayo de actividad *in vitro* en diferentes puntos temporales (0, 20, 40 y 60 días) usando un espectrofotómetro para controlar la actividad lítica, medida como la gota en miliDO600 por minuto (-mDO₆₀₀/min). El ensayo de actividad *in vitro* se realizó según se describe en Cheng, Q. y col., “Removal of group B streptococci colonizing the vagina y oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme”, Antimicrob. Agents Chemother. 49: 111-117 (2005). La velocidad inicial de esta reacción (V_{max}) se define como la tasa de lisis, y se usó para comparar la estabilidad proteica en varios intervalos temporales.

60 Ejemplo 9

características de la mutante hiperactiva PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5)

65 Se compararon las características de la mutante hiperactiva PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) con la PlyGBS natural. Se midió la actividad lítica *in vitro* de la PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) mediante dos procedimientos diferentes. En primer lugar, usamos varias cantidades de PlyGBS90-1 purificada (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS natural (2, 10, 50 y 100 μg) en el ensayo *in vitro* para medir el valor de la V_{max} , según se describe en Cheng, Q. y col., “Removal of group B streptococci colonizing the vagina y oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme”, Antimicrob. Agents Chemother. 49: 111-117 (2005). También probamos la eficacia destructora de la mutante PlyGBS90-1 (SEQ

ES 2 357 626 T3

ID NO: 5) sobre GBS en un ensayo de viabilidad *in vitro*, según se describe en Cheng, Q. y col., “Removal of group B streptococci colonizing the vagina y oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme”, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 111-117 (2005). La especificidad y el pH de la mutante se analizaron según se describe en Cheng, Q. y col., “Removal of group B streptococci colonizing the vagina y oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme”, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 111-117 (2005).

Para comprobar el efecto de la concentración salina sobre la actividad lítica, se dializaron PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS purificadas frente a Tris-HCl 2 mM (pH 7,4) hasta el día siguiente. Se añadieron varias cantidades de NaCl 5 M en las muestras proteicas dializadas para determinar los valores de V_{max} por debajo de la concentración salina de 0-500 mM usando un espectrofotómetro, según se describe en Cheng, Q. y col., “Removal of group B streptococci colonizing the vagina y oropharynx of mice with a bacteriophage lytic. enzyme”, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 111-117 (2005).

Ejemplo 10

Actividad *in vivo* de la mutante PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5)

Se probó la mutante PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) *in vivo* frente a GBS en un modelo vaginal de ratón desarrollado en un estudio previo (Cheng, Q., D. Nelson, S. W. Zhu y V. A. Fischetti, “Removal of group B streptococci colonizing the vagina y oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme”, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 111-117 (2005), incorporado al presente documento como referencia). En resumen, en el día 1, se sincronizaron los ciclos estrales de 20 ratones hembra de seis semanas de edad BALB/c (Charles River Lab, Wilmington, MA) con valerato de β -estradiol (McLean, N. W. y I. J. Rosenstein, “Characterization y selection of a *Lactobacillus species* to recolonize the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis”, *J. Med. Microbiol.* 49: 543-552 (2000)). En el día 3, los ratones fueron expuestos vaginalmente a 106 unidades formadoras de colonias (ufc) de células Str^R NCTC11237 de GBS. En el día 4, se realizaron frotis de las cavidades vaginales para determinar el estado de colonización antes del tratamiento (muestras a las 0 h). Entonces los ratones se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos y se trataron vaginalmente con tampón (n = 10), 1.500 μ g de PlyGBS (n = 10), o 1.500 μ g de mutante PlyGBS90-1 (SEQ ID NO: 5) (n = 10). Entonces se realizaron frotis vaginales de los ratones a las 2 h y 4 h después del tratamiento. Se usaron placas de agar THY (Nelson, D., L. Loomis y V. A. Fischetti, “Prevention y elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme”, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 98: 4107-4112 (2001), incorporado al presente documento como referencia), complementadas con un 5% de sangre de oveja y estreptomycinina (200 μ g/ml), para determinar los recuentos de colonias a partir de los frotis húmedos. Se usó el modelo MIXED (de SAS Mixed Procedure) para comparar el estado de colonización entre los grupos en un análisis estadístico, y se consideró significativo un valor de $P < 0,05$.

TABLA 3

Cepas bacterianas y plásmidos

40

BACTERIAS	Cepa	Serotipo	Fuente ^a
GBS			
	NCTC11237	IIIR	1
	Derivada de NCTC11237	IIIR, Str ^R	2
ESCHERICHIA COLI			
	XL-1 Red		3
	BL21 (DE3)		2
STREPTOCOCCUS SALIVARIUS	ATCC9222		4
BACILLUS CEREUS	ATCC4342		2
STAPHYLOCOCCUS AUREUS	RN6390		2
PLÁSMIDOS	Fenotipo	Proteína codificada	DESCRIPCIÓN

65

ES 2 357 626 T3

5	CQJ67-2	Kan ^R	Wt PlyGBS	Gen Wt <i>plyGBS</i> clonado en pET28a ()
	DERIVADO DE CQJ67-2			
	PCQJ86-6	Kan ^R	PlyGBS86-6	Una mutación puntual en el gen <i>plyGBS</i> causó el cambio D374E
10	PCQJ80	Kan ^R	PlyGBS80	Una mutante contiene los primeros 163 aminoácidos de PlyGBS debido a una mutación terminadora.
15	PCQJ90-1	Kan ^R	PlyGBS90-1	Una mutación tiene una deleción fuera de marco en el gen <i>plyGBS</i> (pb 424-1255). Expresa los primeros 141 aminoácidos de PlyGBS más 13 aminoácidos adicionales debido al cambio de marco.
20	PCQJ90-8	Kan ^R	PlyGBS90-8	Una mutante contiene los primeros 138 aminoácidos de PlyGBS debido a una mutación terminadora.
25	PCQJ90-8	Kan ^R	PlyGBS90-8	Una mutante contiene los primeros 138 aminoácidos de PlyGBS debido a una mutación terminadora.
	MUTANTES DE DELECIÓN DE <i>PLYGBS</i>			
30	PCQJ92	Kan ^R	PlyGBS92 NcoI/XhoI.	Fragmento de 738 pb de PCR clonado en pET28a mediante El plásmido resultante codifica para el dominio de muramidasa (aminoácidos 150-394) de la PlyGBS
35	PCQJ93	Kan ^R	PlyGBS93	Fragmento de 885 pb de PCR clonado en pET28a mediante NcoI/XhoI. El plásmido resultante codifica para el dominio de muramidasa más la región C-terminal (aminoácidos 150-443) de PlyGBS.
40	PCQJ93	Kan ^R	PlyGBS93	Fragmento de 885 pb de PCR clonado en pET28a mediante NcoI/XhoI. El plásmido resultante codifica para el dominio de muramidasa más la región C-terminal (aminoácidos 150-443) de PlyGBS.
45	PCQJ94	Kan ^R	PlyGBS94	Fragmento de 441 pb de PCR clonado en pET28a mediante NcoI/HindIII. pCQJ94 codifica para el dominio de endopeptidasa N-terminal (aminoácidos 1-146) de la PlyGBS.
50	PCQJ94	Kan ^R	PlyGBS94	Fragmento de 441 pb de PCR clonado en pET28a mediante NcoI/HindIII. pCQJ94 codifica para el dominio de endopeptidasa N-terminal (aminoácidos 1-146) de la PlyGBS.
55	PCQJ95	Kan ^R	PlyGBS95	Fragmento de 288 pb de PCR (C-terminal del gen <i>plyGBS</i> , pb 1045-1332) clonado en pCQJ94 mediante HindIII/XhoI. El plásmido resultante codifica para una PlyGBS mutante que tiene una deleción en el dominio de muramidasa central (deleción entre los aminoácidos 147-348).
60	PCQJ95	Kan ^R	PlyGBS95	Fragmento de 288 pb de PCR (C-terminal del gen <i>plyGBS</i> , pb 1045-1332) clonado en pCQJ94 mediante HindIII/XhoI. El plásmido resultante codifica para una PlyGBS mutante que tiene una deleción en el dominio de muramidasa central (deleción entre los aminoácidos 147-348).

Aunque se han descrito varias formas de realización de la invención, los expertos habituales en la materia apreciarán que son posibles muchas más formas de realización e implementaciones dentro del ámbito de la invención. Consecuentemente, la invención no debe estar restringida excepto a la luz de las reivindicaciones anexas y sus equivalentes.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado al recopilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones, y la OEP renuncia a cualquier obligación a este respecto.

Documentos patentes citados en la descripción

- US 5428130 A [0084] • US 4615697 A, J. R. Robinson [0142]
- US 6132970 A, Stemmer [0091] • US 4948580 A [0144]
- US 5976862 A, Kauffman [0091] • US 5413792 A [0144]
- US 5808022 A, Huse [0091] • US 5554380 A [0144]
- WO 8705330 A [0096] • US 5942243 A [0144]
- US 4640835 A [0098] • US 6056954 A [0165]
- US 4496689 A [0098] • US 6056955 A [0165]
- US 4301144 A [0098] • WO 9703692 A [0173]
- US 4670417 A [0098] • WO 9640072 A [0173]
- US 4791192 A [0098] • WO 9607399 A [0173]
- US 4179337 A [0098] • US 5654010 A [0173]
- US 4680338 A [0132] • US 5863560 A, Osborne [0176]
- US 60710936 B [0217]

Bibliografía no patente citada en la descripción

- Group B streptococcal infections. **Baker, C. J.**; **M. S. Edwards**. Infectious diseases of the fetus and newborn infants. The W. B. Saunders Co, 2001, 1091-1156 [0002]
- **Regan, J. A.**; **M. A. Klebanoff**; **R. P. Nugent**. Colonization with group B streptococci in pregnancy and adverse outcome. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1996, vol. 174, 1354-1360 [0002]
- Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.*, 1996, vol. 45, 1-24 [0003]
- Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines from CDC. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.*, 2002, vol. 51, 1-22 [0003]
- **Fernández, M.**; **M. Hickman**; **C. J. Baker**. Antimicrobial susceptibilities of group B streptococci isolated between 1992 and 1996 from patients with bacteremia or meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, vol. 42, 1517-1519 [0003]
- **Young, R.** Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol. Rev.*, 1992, vol. 56, 430-481 [0004]
- **Loessner, M.**; **K. Kramer**; **F. Ebel**; **S. Scherer**. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol. Microbiol.*, 2002, vol. 44, 335-349 [0004]
- **López, R.**; **E. García**; **P. García**; **J. L. García**. The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins?. *MicroB. Drug Resist.*, vol. 3, 199-211 [0004]
- **López, R.**; **M. P. González**; **E. García**; **J. L. García**; **P. García**. Biological roles of two new murein hydrolases of *Streptococcus pneumoniae* representing examples of module shuffling. *Res. Microbiol.*, 2002, vol. 151, 437-443 [0004]
- **Sheehan, M. M.**; **J. L. García**; **R. López**; **P. García**. The lytic enzyme of the pneumococcal phage Dp-1: a chimeric enzyme of intergeneric origin. *Mol. Microbiol.*, 1997, vol. 25, 717-725 [0004]

ES 2 357 626 T3

- **Loeffler, J. M.; D. Nelson; V. A. Fischetti.** Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science*, 2001, vol. 294, 2170-2172 [0004] [0042]
- 5 • **Loessner, M.; G. Wendlinger; S. Scherer.** *Heterogeneous endolysins in Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. *Mol. Microbiol.*, 1995, vol. 16, 1231-1241 [0004]
- 10 • **Loessner, M.; S. K. Maier; H. Daubek-Puza; G. Wendlinger; S. Scherer.** Three *Bacillus cereus* bacteriophage endolysins are unrelated but reveal high homology to cell wall hydrolases from different bacilli. *J. Bacteriol.*, 1997, vol. 179, 2845-2851 [0004]
- 15 • **Nelson, D.; L. Loomis; V. A. Fischetti.** Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Prot. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 2001, vol. 98, 4107-4112 [0004]
- 20 • **Fischetti, V. A.** Novel method to control pathogenic bacteria on human mucous membranes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2003, vol. 987, 207-214 [0005]
- **Fischetti, V. A.** Phage antibacterials make a comeback. *Nature Biotechnol.*, 2001, vol. 19, 734-735 [0005]
- **Pritchard, D. G.; S. Dong; J. R. Baker; J. A. Engler.** The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30. *Microbiology*, 2004, vol. 150, 2079-2087 [0011]
- 25 • **Lewin.** Genes V. Oxford University Press, 1994, 9-13 [0031]
- **Cheng, Q. y col.** Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, vol. 49, 111-117 [0038] [0211]
- 30 • **Cheng, Q.; D. Nelson; S. W. Zhu; V. A. Fischetti.** Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, vol. 49, 111-117 [0042] [0048] [0054] [0055]
- 35 • **Nelson, D.; L. Loomis; V. A. Fischetti.** Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 2001, vol. 98, 4107-4112 [0042]
- 40 • **Schuch, R.; D. Nelson; V. A. Fischetti.** A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*, 2002, vol. 418, 884-889 [0042] [0208]
- **Pritchard y col.** The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30. *Microbiology*, 2004, vol. 150, 2079-2087 [0048]
- 45 • **Altschul y col.** *Methods in Enzymology*, 1996, vol. 266, 460-480 [0061]
- **Altschul y col.** *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389-3402 [0062]
- **Arkin; Yourvan.** *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1992, vol. 89, 7811-7815 [0070]
- 50 • **Delgrave y col.** *Protein Engineering*, 1993, vol. 6 (3), 327 331 [0070]
- **Carter y col.** *Nucl. Acids Res.*, 1986, vol. 13, 4331 [0080]
- **Zoller y col.** *Nucl. Acids Res.*, 1987, vol. 10, 6487 [0080]
- 55 • **Wells y col.** *Gene*, 1985, vol. 34, 315 [0080]
- **Wells y col.** *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 1986, vol. 317, 415 [0080]
- 60 • **Cunningham; Wells.** *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0081]
- **Creighton.** *The Proteins.* W. H. Freeman & Co, [0081]
- 65 • **Chothia.** *J. Mol. Biol.*, 1976, vol. 150, 1 [0081]
- **Field y col.** *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 2159-2165 [0083]
- **Evan y col.** *Molecular and Cellular Biology*, 1985, vol. 5, 3610-3616 [0083]

ES 2 357 626 T3

- **Paborsky** y col. *Protein Engineering*, 1990, 547-553 [0083]
- **Hopp** y col. *BioTechnology*, 1988, vol. 6, 1204-1210 [0083]
- 5 • **Martin** y col. *Science*, 1992, vol. 255, 192-194 [0083]
- **Skinner** y col. *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 15163-15166 [0083]
- **Lutz-Freyermuth** y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1990, vol. 87, 6393-6397 [0083]
- 10 • Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons*, 1992 [0085]
- **Narang**. *Tetrahedron*, 1983, vol. 39, 3 [0090]
- 15 • **Itakura** y col. *Annu. Rev. Biochem.*, 1984, vol. 53, 323 [0090]
- **Itakura** y col. *Science*, 1984, vol. 198, 1056 [0090]
- **Ike** y col. *Nucleic Acid Res.*, 1983, vol. 11, 477 [0090]
- 20 • **T., E. Creighton**. *Proteins: Structure and Molecular Properties*. W. H. Freeman & Co, 1983, 79-86 [0093]
- **Aplin; Wriston**. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 1981, 259-306 [0096]
- 25 • **Hakimuddin** y col. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, vol. 259, 52 [0097]
- **Edge** y col. *Anal. Biochem.*, 1981, vol. 118, 131 [0097]
- **Thotakura** y col. *Meth. Enzymol.*, 1987, vol. 138, 350 [0097]
- 30 • **Young** y col. *Trends in Microbiology*, marzo de 2000, vol. 8 (4 [0100]
- **Loessner** y col. *Journal of Bacteriology*, agosto de 1999, 4452-4460 [0100]
- 35 • **Wallace** y col. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1986, vol. 51, 257-261 [0108]
- **Church; Gilbert**. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1988, vol. 81, 1991-1995 [0108]
- **Flavell** y col. *Cell*, 1978, vol. 15, 25 [0108]
- 40 • **Myers; Maniatis**. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1986, vol. 51, 275-284 [0108]
- **Myers** y col. *Science*, 1985, vol. 230, 1242 [0108]
- 45 • **Cotton** y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1985, vol. 85, 4397-4401 [0108]
- **Ward; Langer** y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1981, vol. 78, 6633-6657 [0110]
- **Gebeyehu** y col. *Nucleic Acids Res.*, 1987, vol. 15, 4513-4534 [0110]
- 50 • **Stofflet** y col. *Science*, 1988, vol. 239, 491-494 [0111]
- **Sambrook** y col. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1989 [0112] [0114]
- 55 • **Southern**. *J. Mol. Biol.*, 1975, vol. 98, 503 [0113]
- **Sambrook** y col. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor*, 1989 [0113]
- **Bolton; McCarthy**. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1962, vol. 48, 1390 [0114]
- 60 • **Bonner** y col. *J. Mol. Biol.*, 1973, vol. 81, 123 [0116]
- **Ausubel** y col. *Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience Publishers*, 1995 [0118]
- 65 • **Sambrook** y col. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press*, 1989 [0120]
- **Davis** y col. *BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*. 1986 [0122]

ES 2 357 626 T3

- **Sambrook** y col. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0122]
- **Díaz** y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1990, vol. 87, 8125 [0131]
- Identification of a D alanyl glycine endopeptidase activity. *J Biol Chem.*, 28 de mayo de 1999, vol. 274, 15847-56 [0131]
- *Remington's Pharmaceutical Sciences*. 1980 [0137]
- The use of interspecies scaling in toxicokinetics. **Mordenti, J.; Chappell, W.** y col. Toxicokinetics and New Drug Development. *Pergamon*, 1989, 42-96 [0171]
- **Johnson** y col. *Nat. Med.*, 1996, vol. 2, 795-799 [0173]
- **Yasuda**. *Biomed. Ther.*, 1993, vol. 27, 1221-1223 [0173]
- **Hora** y col. *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 755-758 [0173]
- Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems. **Cleland**. Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach. *Plenum Press*, 1995, 439462 [0173]
- Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer. **Lewis**. Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems. *Marcel Dekker*, 1990, 1-41 [0174]
- **Cheng, Q.** y col. Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, vol. 49, 111-117 [0209]
- **Cheng, Q.** y col. Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, vol. 49, 111-117 [0212] [0213]
- **Cheng, Q.** y col. Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, vol. 49, 111-117 [0214]
- **Cheng, Q.; D. Nelson; S. W. Zhu; V. A. Fischetti.** Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, vol. 49, 111-117 [0215]
- McLean, N. W; I. J. Rosenstein. Characterization and selection of a *Lactobacillus species* to recolonize the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. *J. Med. Microbiol.*, 2000, vol. 49, 543-552 [0215]
- **Nelson, D.; L. Loomis; V. A. Fischetti.** Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 2001, vol. 98, 4107-4112 [0215]

REIVINDICACIONES

5 1. Una composición que comprende una lisina mutante hiperactiva de PlyGBS con una actividad destructora mayor frente a células de estreptococos del grupo B (GBS) en comparación con la proteína PlyGBS, teniendo la lisina mutante de PlyGBS una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por: PlyGBS 90-1 (SEQ ID NO: 5), PlyGBS 80 (SEQ ID NO: 3), PlyGBS 90-8 (SEQ ID NO: 4) y PlyGBS 94 (SEQ ID NO: 8).

10 2. Una lisina mutante de PlyGBS con una actividad destructora mayor frente a células de estreptococos del grupo B (GBS) en comparación con la proteína PlyGBS en la que la lisina mutante de PlyGBS se selecciona del grupo constituido por: PlyGBS 80 (SEQ ID NO: 3), PlyGBS 90-8 (SEQ ID NO: 4), PlyGBS 90-1 (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS 94 (SEQ ID NO: 8).

15 3. La lisina mutante de PlyGBS según la reivindicación 2, en la que la lisina mutante de PlyGBS se selecciona del grupo constituido por: PlyGBS 90-8 (SEQ ID NO: 4), PlyGBS 90-1 (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS 94 (SEQ ID NO: 8).

4. La lisina mutante de PlyGBS según una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en la que la lisina mutante de PlyGBS es PlyGBS 90-1 (SEQ ID NO: 5).

20 5. Una composición que comprende la lisina mutante de PlyGBS según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 y glicerol.

25 6. Uso de una lisina mutante de PlyGBS con una actividad destructora mayor frente a bacterias de estreptococos del grupo B (GBS) en comparación con la proteína PlyGBS en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una infección, en el que la lisina mutante es un polipéptido seleccionado del grupo constituido por: PlyGBS 90-1 (SEQ ID NO: 5), PlyGBS 80 (SEQ ID NO: 3), PlyGBS 90-8 (SEQ ID NO: 4) y PlyGBS 94 (SEQ ID NO: 8).

30 7. El uso según la reivindicación 6, en el que la lisina mutante de PlyGBS se selecciona del grupo constituido por: PlyGBS 90-8 (SEQ ID NO: 4), PlyGBS 90-1 (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS 94 (SEQ ID NO: 8).

8. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, en el que el medicamento se prepara para su administración a un pH de aproximadamente 5,0.

35 9. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el medicamento comprende NaCl a una concentración de aproximadamente 50-100 mM.

40 10. Una lisina mutante de PlyGBS con una actividad destructora mayor frente a células de estreptococos del grupo B (GBS) en comparación con la proteína PlyGBS en la que la lisina mutante de PlyGBS se selecciona del grupo constituido por: PlyGBS 80 (SEQ ID NO: 3), PlyGBS 90-8 (SEQ ID NO: 4), PlyGBS 90-1 (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS 94 (SEQ ID NO: 8) para su uso como un medicamento.

45 11. Una lisina mutante de PlyGBS con una actividad destructora mayor frente a células de estreptococos del grupo B (GBS) en comparación con la proteína PlyGBS en la que la lisina mutante de PlyGBS se selecciona del grupo constituido por: PlyGBS 80 (SEQ ID NO: 3), PlyGBS 90-8 (SEQ ID NO: 4), PlyGBS 90-1 (SEQ ID NO: 5) y PlyGBS 94 (SEQ ID NO: 8) para su uso en el tratamiento de una infección.

50

55

60

65

Fig. 1

ID. SEC. N°	Descripción	Secuencia
1	PlyGBS	MATYQEYKSR SNGNAYDIDG SFGAQCWDGY ADYCKYLGLP YANCTNTGYA RDIWEQRHEN GILNYFDEVE VMQAGDVAIF MVVDGVTTPYS HVAIFDSDAG GGYGWFLGQN QGGANGAYNL VKIPYSATYP TAFRPKSFKN AVTVTDNTGL NKGDFIDVS AYQQADLTTT CQQAGTTKI IKVSESIAWL SDRHQQQANT SDPIGYHFG RFGGDSALAQ READLFLSNL PSKKVSYLVI DYEDSASADK QANTNAVIAF MDKIASAGYK PIYYSYKPF LNNIDYQKII AKYPSNSIWA GYPDYEV RTE PLWEFFPSMD GVRWWQFTSV GVAGGLDKNI VLLADDSSKM DIPKVDKPE LTFYQKLATN TKLENSNVPY YEATLSTDY VESKPNASSA DKEFIKAGTR VRVYEKVN GW SRINHPESAQ WVEDNYLVNA TDM
2	PlyGBS 86-6 mutante	MATYQEYKSR SNGNAYDIDG SFGAQCWDGY ADYCKYLGLP YANCTNTGYA RDIWEQRHEN GILNYFDEVE VMQAGDVAIF MVVDGVTTPYS HVAIFDSDAG GGYGWFLGQN QGGANGAYNL VKIPYSATYP TAFRPKSFKN AVTVTDNTGL NKGDFIDVS AYQQADLTTT CQQAGTTKI IKVSESIAWL SDRHQQQANT SDPIGYHFG RFGGDSALAQ READLFLSNL PSKKVSYLVI DYEDSASADK QANTNAVIAF MDKIASAGYK PIYYSYKPF LNNIDYQKII AKYPSNSIWA GYPDYEV RTE PLWEFFPSMD GVRWWQFTSV GVAGGLDKNI VLLADDSSKM DIPKVDKPE LTFYQKLATN TKLENSNVPY YEATLSTDY VESKPNASSA DKEFIKAGTR VRVYEKVN GW SRINHPESAQ WVEDNYLVNA TDM
3	PlyGBS 80 mutante	MATYQEYKSR SNGNAYDIDG SFGAQCWDGY ADYCKYLGLP YANCTNTGYA RDIWEQRHEN GILNYFDEVE VMQAGDVAIF MVVDGVTTPYS HVAIFDSDAG GGYGWFLGQN QGGANGAYNL VKIPYSATYP TAFRPKSFKN AVTVTDNTGL NKGDFIDVS AYQ
4	PlyGBS 90-8 mutante	MATYQEYKSR SNGNAYDIDG SFGAQCWDGY ADYCKYLGLP YANCTNTGYA RDIWEQRHEN GILNYFDEVE VMQAGDVAIF MVVDGVTTPYS HVAIFDSDAG GGYGWFLGQN QGGANGAYNL VKIPYSATYP TAFRPKSF
5	PlyGBS 90-1 mutante	MATYQEYKSR SNGNAYDIDG SFGAQCWDGY ADYCKYLGLP YANCTNTGYA RDIWEQRHEN GILNYFDEVE VMQAGDVAIF MVVDGVTTPYS HVAIFDSDAG GGYGWFLGQN QGGANGAYNL VKIPYSATYP TAFRPKSFKN ADGHALTIQS RRNG
6	PlyGBS 92 mutante	L NKGDFIDVS AYQQADLTTT CQQAGTTKI IKVSESIAWL SDRHQQQANT SDPIGYHFG RFGGDSALAQ READLFLSNL PSKKVSYLVI DYEDSASADK QANTNAVIAF MDKIASAGYK PIYYSYKPF LNNIDYQKII AKYPSNSIWA GYPDYEV RTE PLWEFFPSMD GVRWWQFTSV GVAGGLDKNI VLLADDSSKM DIPKVDKPE LTFYQKLATN TKLDNSNVPY YEATLSTDY VESK
7	PlyGBS 93 mutante	L NKGDFIDVS AYQQADLTTT CQQAGTTKI IKVSESIAWL SDRHQQQANT SDPIGYHFG RFGGDSALAQ READLFLSNL PSKKVSYLVI DYEDSASADK QANTNAVIAF MDKIASAGYK PIYYSYKPF LNNIDYQKII AKYPSNSIWA GYPDYEV RTE PLWEFFPSMD GVRWWQFTSV GVAGGLDKNI VLLADDSSKM DIPKVDKPE LTFYQKLATN TKLDNSNVPY YEATLSTDY VESKPNASSA DKEFIKAGTR VRVYEKVN GW SRINHPESAQ WVEDNYLVNA TDM
8	PlyGBS 94 mutante	MATYQEYKSR SNGNAYDIDG SFGAQCWDGY ADYCKYLGLP YANCTNTGYA RDIWEQRHEN GILNYFDEVE VMQAGDVAIF MVVDGVTTPYS HVAIFDSDAG GGYGWFLGQN QGGANGAYNL VKIPYSATYP TAFRPKSFKN AVTVTD
9	PlyGBS 95 mutante	MATYQEYKSR SNGNAYDIDG SFGAQCWDGY ADYCKYLGLP YANCTNTGYA RDIWEQRHEN GILNYFDEVE VMQAGDVAIF MVVDGVTTPYS HVAIFDSDAG GGYGWFLGQN QGGANGAYNL VKIPYSATYP TAFRPKSFKN AVTVTD KM DIPKVDKPE LTFYQKLATN TKLDNSNVPY YEATLSTDY VESKPNASSA DKEFIKAGTR VRVYEKVN GW SRINHPESAQ WVEDNYLVNA TDM

Fig. 2

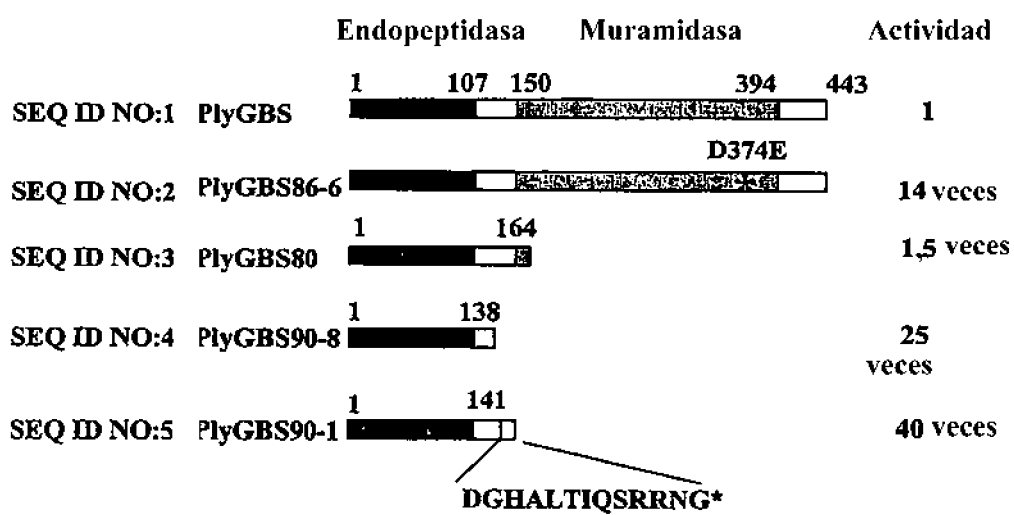


Fig. 3

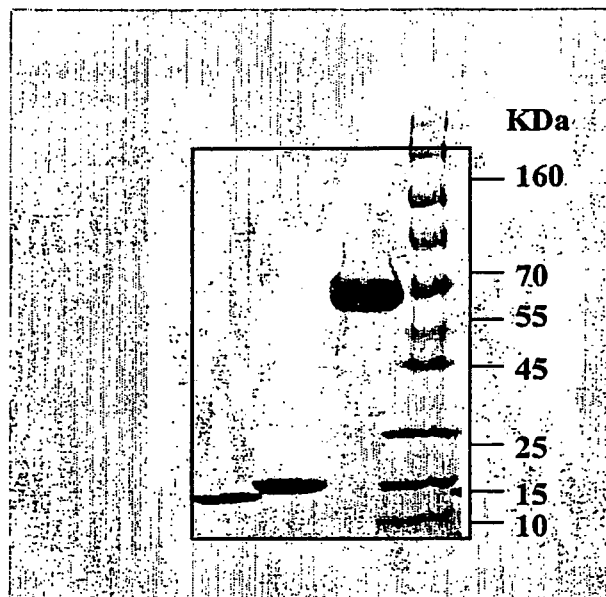


Fig. 4

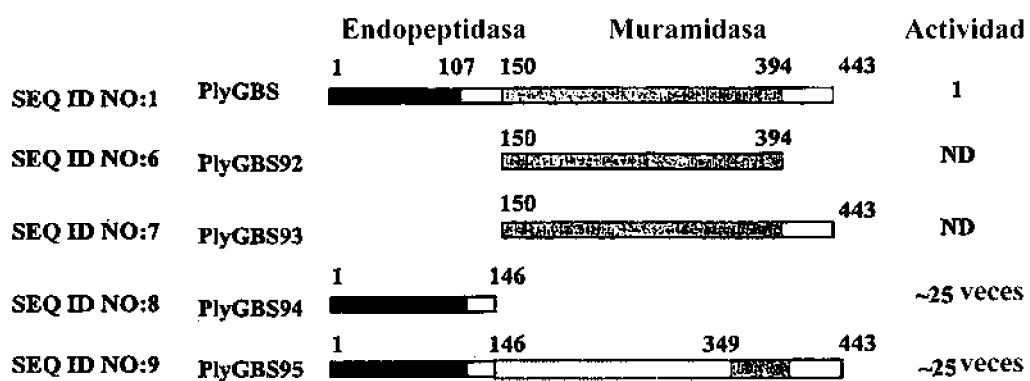


Fig. 5

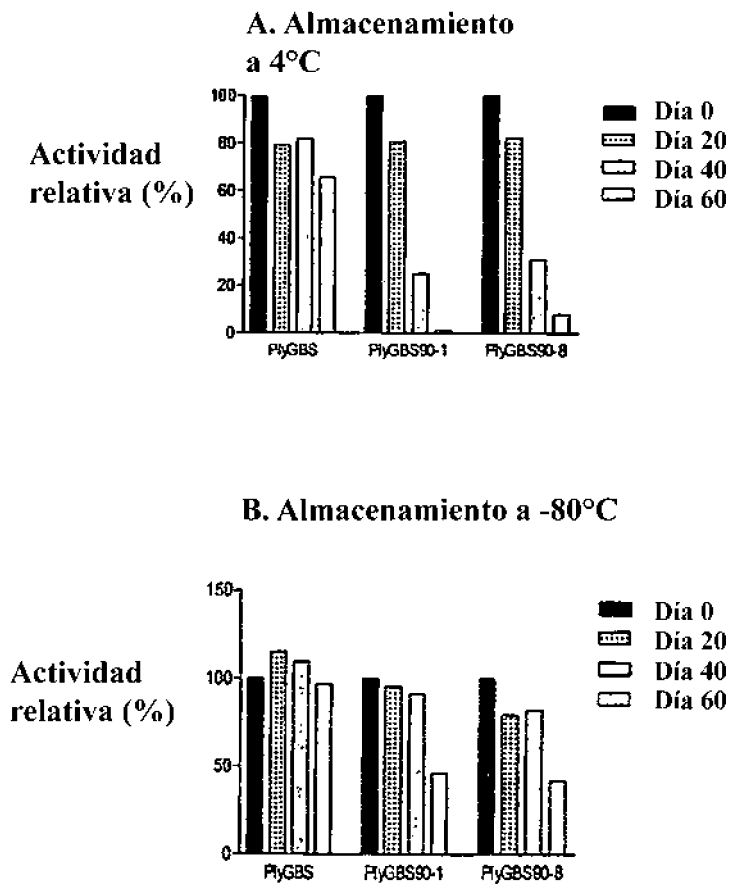


Fig. 6

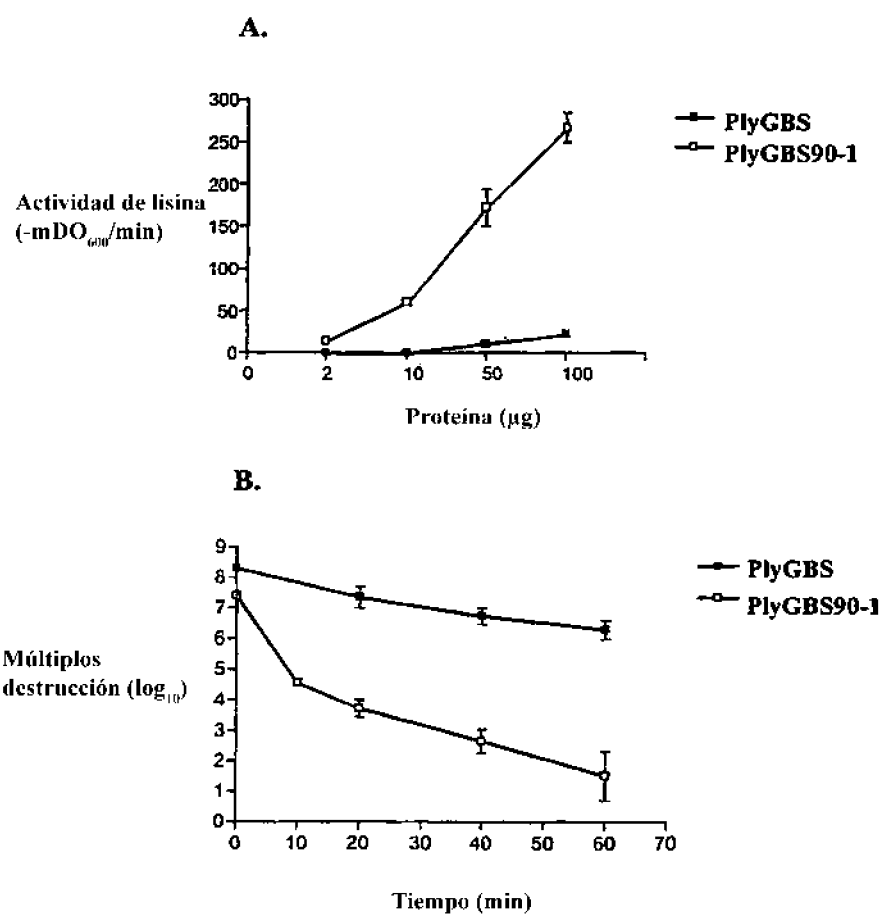


Fig. 7

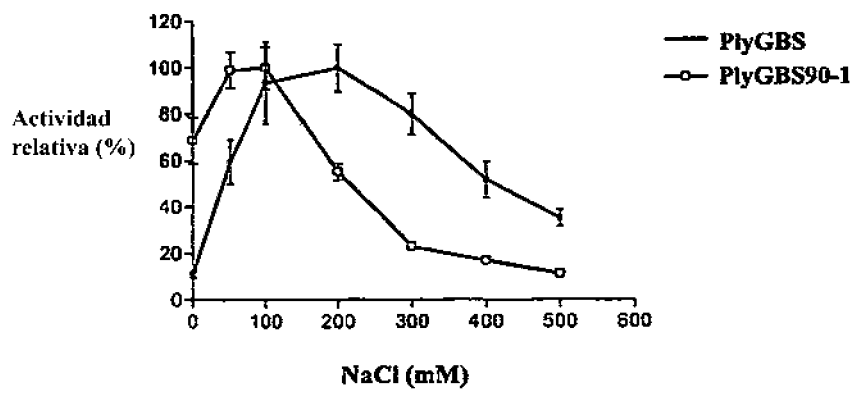


Fig. 8

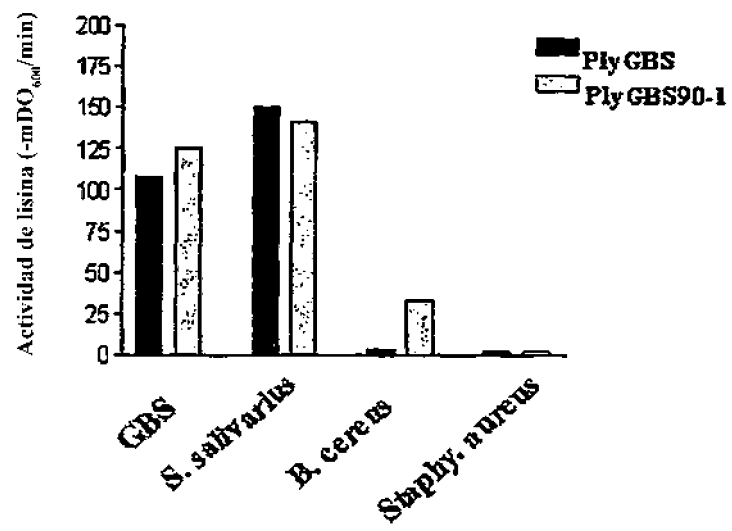
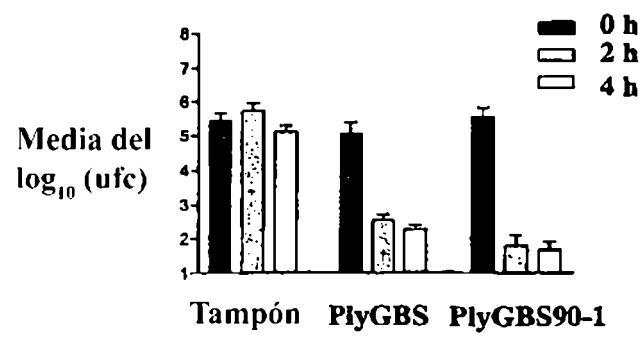


Fig. 9



ES 2 357 626 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> The Rockefeller University cheng, Qi Fischetti, vincent
 <120> LISINAS MUTANTES de PLY-GBS
 5 <130> 12157-16
 <150> 60/710.936
 <151> 2005-08-24
 10 <160> 9
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 443
 15 <212> PRT
 <213> *streptococcus agalactiae*
 20 <400> 1

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

ES 2 357 626 T3

5 Thr Lys Thr Ile Ile Lys Val Ser Glu Ser Ile Ala Trp Leu Ser Asp
 180 185 190
 Arg His Gln Gln Gln Ala Asn Thr Ser Asp Pro Ile Gly Tyr Tyr His
 195 200 205
 10 Phe Gly Arg Phe Gly Gly Asp Ser Ala Leu Ala Gln Arg Glu Ala Asp
 210 215 220
 Leu Phe Leu Ser Asn Leu Pro Ser Lys Lys Val Ser Tyr Leu Val Ile
 225 230 235 240
 15 Asp Tyr Glu Asp Ser Ala Ser Ala Asp Lys Gln Ala Asn Thr Asn Ala
 245 250 255
 20 Val Ile Ala Phe Met Asp Lys Ile Ala Ser Ala Gly Tyr Lys Pro Ile
 260 265 270
 Tyr Tyr Ser Tyr Lys Pro Phe Thr Leu Asn Asn Ile Asp Tyr Gln Lys
 275 280 285
 25 Ile Ile Ala Lys Tyr Pro Asn Ser Ile Trp Ile Ala Gly Tyr Pro Asp
 290 295 300
 30 Tyr Glu Val Arg Thr Glu Pro Leu Trp Glu Phe Phe Pro Ser Met Asp
 305 310 315 320
 35 Gly Val Arg Trp Trp Gln Phe Thr Ser Val Gly Val Ala Gly Gly Leu
 325 330 335
 40 Asp Lys Asn Ile Val Leu Leu Ala Asp Asp Ser Ser Lys Met Asp Ile
 340 345 350
 45 Pro Lys Val Asp Lys Pro Gln Glu Leu Thr Phe Tyr Gln Lys Leu Ala
 355 360 365
 Thr Asn Thr Lys Leu Asp Asn Ser Asn Val Pro Tyr Tyr Glu Ala Thr
 370 375 380
 50 Leu Ser Thr Asp Tyr Tyr Val Glu Ser Lys Pro Asn Ala Ser Ser Ala
 385 390 395 400
 55 Asp Lys Glu Phe Ile Lys Ala Gly Thr Arg Val Arg Val Tyr Glu Lys
 405 410 415
 Val Asn Gly Trp Ser Arg Ile Asn His Pro Glu Ser Ala Gln Trp Val
 420 425 430
 60 Glu Asp Asn Tyr Leu Val Asn Ala Thr Asp Met
 435 440

65 <210> 2
 <211> 443
 <212> PRT

ES 2 357 626 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia modificada de *streptococcus agalactiae*

5

<400> 2

Met Ala Thr Tyr Gln Glu Tyr Lys Ser Arg Ser Asn Gly Asn Ala Tyr
1 5 10

Asp Ile Asp Gly Ser Phe Gly Ala Gln Cys Trp Asp Gly Tyr Ala Asp
20 25 30

Tyr Cys Lys Tyr Leu Gly Leu Pro Tyr Ala Asn Cys Thr Asn Thr Gly
35 40 45

Tyr Ala Arg Asp Ile Trp Glu Gln Arg His Glu Asn Gly Ile Leu Asn
50 55 60

Tyr Phe Asp Glu Val Glu Val Met Gln Ala Gly Asp Val Ala Ile Phe
65 70 75 80

Met Val Val Asp Gly Val Thr Pro Tyr Ser His Val Ala Ile Phe Asp
85 90 95

Ser Asp Ala Gly Gly Gly Tyr Gly Trp Phe Leu Gly Gln Asn Gln Gly
100 105 110

Gly Ala Asn Gly Ala Tyr Asn Leu Val Lys Ile Pro Tyr Ser Ala Thr
115 120 125

Tyr Pro Thr Ala Phe Arg Pro Lys Ser Phe Lys Asn Ala Val Thr Val
130 135 140

Thr Asp Asn Thr Gly Leu Asn Lys Gly Asp Tyr Phe Ile Asp Val Ser
145 150 155 160

Ala Tyr Gln Gln Ala Asp Leu Thr Thr Thr Cys Gln Gln Ala Gly Thr
165 170 175

Thr Lys Thr Ile Ile Lys Val Ser Glu Ser Ile Ala Trp Leu Ser Asp
180 185 190

Arg His Gln Gln Gln Ala Asn Thr Ser Asp Pro Ile Gly Tyr Tyr His
195 200 205

Phe Gly Arg Phe Gly Gly Asp Ser Ala Leu Ala Gln Arg Glu Ala Asp
210 215 220

60

65

ES 2 357 626 T3

Leu Phe Leu Ser Asn Leu Pro Ser Lys Lys Val Ser Tyr Leu Val Ile
 225 230 235 240

5

 Asp Tyr Glu Asp Ser Ala Ser Ala Asp Lys Gln Ala Asn Thr Asn Ala
 245 250 255

10

 Val Ile Ala Phe Met Asp Lys Ile Ala Ser Ala Gly Tyr Lys Pro Ile
 260 265 270

15

 Tyr Tyr Ser Tyr Lys Pro Phe Thr Leu Asn Asn Ile Asp Tyr Gln Lys
 275 280 285

20

 Ile Ile Ala Lys Tyr Pro Asn Ser Ile Trp Ile Ala Gly Tyr Pro Asp
 290 295 300

25

 Tyr Glu Val Arg Thr Glu Pro Leu Trp Glu Phe Phe Pro Ser Met Asp
 305 310 315 320

30

 Gly Val Arg Trp Trp Gln Phe Thr Ser Val Gly Val Ala Gly Gly Leu
 325 330 335

35

 Asp Lys Asn Ile Val Leu Leu Ala Asp Asp Ser Ser Lys Met Asp Ile
 340 345 350

40

 Pro Lys Val Asp Lys Pro Gln Glu Leu Thr Phe Tyr Gln Lys Leu Ala
 355 360 365

45

 Thr Asn Thr Lys Leu Glu Asn Ser Asn Val Pro Tyr Tyr Glu Ala Thr
 370 375 380

50

 Leu Ser Thr Asp Tyr Tyr Val Glu Ser Lys Pro Asn Ala Ser Ser Ala
 385 390 395 400

55

 Asp Lys Glu Phe Ile Lys Ala Gly Thr Arg Val Arg Val Tyr Glu Lys
 405 410 415

60

 Val Asn Gly Trp Ser Arg Ile Asn His Pro Glu Ser Ala Gln Trp Val
 420 425 430

65

 Glu Asp Asn Tyr Leu Val Asn Ala Thr Asp Met
 435 440

<210> 3

<211> 163

55 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> secuencia modificada de *streptococcus agalactiae*

65

ES 2 357 626 T3

<400> 3

5 Met Ala Thr Tyr Gln Glu Tyr Lys Ser Arg Ser Asn Gly Asn Ala Tyr
1 5 10

Asp Ile Asp Gly Ser Phe Gly Ala Gln Cys Trp Asp Gly Tyr Ala Asp
20 25 30

10 Tyr Cys Lys Tyr Leu Gly Leu Pro Tyr Ala Asn Cys Thr Asn Thr Gly
35 40 45

15 Tyr Ala Arg Asp Ile Trp Glu Gln Arg His Glu Asn Gly Ile Leu Asn
50 55 60

Tyr Phe Asp Glu Val Glu Val Met Gln Ala Gly Asp Val Ala Ile Phe
65 70 75 80

20 Met Val Val Asp Gly Val Thr Pro Tyr Ser His Val Ala Ile Phe Asp
85 90 95

25 Ser Asp Ala Gly Gly Tyr Gly Trp Phe Leu Gly Gln Asn Gln Gly
100 105 110

30 Gly Ala Asn Gly Ala Tyr Asn Leu Val Lys Ile Pro Tyr Ser Ala Thr
115 120 125

Tyr Pro Thr Ala Phe Arg Pro Lys Ser Phe Lys Asn Ala Val Thr Val
130 135 140

35 Thr Asp Asn Thr Gly Leu Asn Lys Gly Asp Tyr Phe Ile Asp Val Ser
145 150 155 160

40 Ala Tyr Gln

<210> 4

<211> 138

45 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia modificada de *Streptococcus agalactiae*

50

<400> 4

55 Met Ala Thr Tyr Gln Glu Tyr Lys Ser Arg Ser Asn Gly Asn Ala Tyr
1 5 10

Asp Ile Asp Gly Ser Phe Gly Ala Gln Cys Trp Asp Gly Tyr Ala Asp
20 25 30

60 Tyr Cys Lys Tyr Leu Gly Leu Pro Tyr Ala Asn Cys Thr Asn Thr Gly
35 40 45

65 Tyr Ala Arg Asp Ile Trp Glu Gln Arg His Glu Asn Gly Ile Leu Asn

ES 2 357 626 T3

50 55 60
 5 Tyr Phe Asp Glu Val Glu Val Met Gln Ala Gly Asp Val Ala Ile Phe
 65 70 75 80
 10 Met Val Val Asp Gly Val Thr Pro Tyr Ser His Val Ala Ile Phe Asp
 85 90 95
 15 Ser Asp Ala Gly Gly Gly Tyr Gly Trp Phe Leu Gly Gln Asn Gln Gly
 100 105 110
 20 Tyr Pro Thr Ala Phe Arg Pro Lys Ser Phe
 130 135

<210> 5

<211> 154

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> secuencia modificada de *Streptococcus agalactiae*

<400> 5

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

ES 2 357 626 T3

<210> 6

<211> 245

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> *streptococcus agalactiae* modificado

10 <400> 6

15 Leu Asn Lys Gly Asp Tyr Phe Ile Asp Val Ser Ala Tyr Gln Gln Ala
1 5 10 15

20 Asp Leu Thr Thr Thr Cys Gln Gln Ala Gly Thr Thr Lys Thr Ile Ile
20 25 30

25 Lys Val Ser Glu Ser Ile Ala Trp Leu Ser Asp Arg His Gln Gln Gln
35 40 45

30 Ala Asn Thr Ser Asp Pro Ile Gly Tyr Tyr His Phe Gly Arg Phe Gly
50 55 60

35 Gly Asp Ser Ala Leu Ala Gln Arg Glu Ala Asp Leu Phe Leu Ser Asn
65 70 75 80

40 Leu Pro Ser Lys Lys Val Ser Tyr Leu Val Ile Asp Tyr Glu Asp Ser
85 90 95

45 Ala Ser Ala Asp Lys Gln Ala Asn Thr Asn Ala Val Ile Ala Phe Met
100 105 110

50 Asp Lys Ile Ala Ser Ala Gly Tyr Lys Pro Ile Tyr Tyr Ser Tyr Lys
115 120 125

55 Pro Phe Thr Leu Asn Asn Ile Asp Tyr Gln Lys Ile Ile Ala Lys Tyr
130 135 140

60 Pro Asn Ser Ile Trp Ile Ala Gly Tyr Pro Asp Tyr Glu Val Arg Thr
145 150 155 160

65 Glu Pro Leu Trp Glu Phe Phe Pro Ser Met Asp Gly Val Arg Trp Trp
165 170 175

70 Gln Phe Thr Ser Val Gly Val Ala Gly Gly Leu Asp Lys Asn Ile Val
180 185 190

75 Leu Leu Ala Asp Asp Ser Ser Lys Met Asp Ile Pro Lys Val Asp Lys
195 200 205

65

ES 2 357 626 T3

Pro Gln Glu Leu Thr Phe Tyr Gln Lys Leu Ala Thr Asn Thr Lys Leu
 210 215 220
 5 Asp Asn Ser Asn Val Pro Tyr Tyr Glu Ala Thr Leu Ser Thr Asp Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Val Glu Ser Lys
 10 245
 <210> 7
 <211> 294
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia modificada de *Streptococcus agalactiae*
 20
 <400> 7
 Leu Asn Lys Gly Asp Tyr Phe Ile Asp Val Ser Ala Tyr Gln Gln Ala
 25 1 5 10 15
 Asp Leu Thr Thr Thr Cys Gln Gln Ala Gly Thr Thr Lys Thr Ile Ile
 20 25 30
 30 Lys Val Ser Glu Ser Ile Ala Trp Leu Ser Asp Arg His Gln Gln Gln
 35 35 40 45
 Ala Asn Thr Ser Asp Pro Ile Gly Tyr Tyr His Phe Gly Arg Phe Gly
 50 55 60
 Gly Asp Ser Ala Leu Ala Gln Arg Glu Ala Asp Leu Phe Leu Ser Asn
 40 65 70 75 80
 Leu Pro Ser Lys Lys Val Ser Tyr Leu Val Ile Asp Tyr Glu Asp Ser
 45 85 90 95
 Ala Ser Ala Asp Lys Gln Ala Asn Thr Asn Ala Val Ile Ala Phe Met
 50 100 105 110
 Asp Lys Ile Ala Ser Ala Gly Tyr Lys Pro Ile Tyr Tyr Ser Tyr Lys
 55 115 120 125
 Pro Phe Thr Leu Asn Asn Ile Asp Tyr Gln Lys Ile Ile Ala Lys Tyr
 60 130 135 140
 Pro Asn Ser Ile Trp Ile Ala Gly Tyr Pro Asp Tyr Glu Val Arg Thr
 65 145 150 155 160
 Glu Pro Leu Trp Glu Phe Phe Pro Ser Met Asp Gly Val Arg Trp Trp
 165 170 175

ES 2 357 626 T3

Gln Phe Thr Ser val Gly Val Ala Gly Gly Leu Asp Lys Asn Ile Val
 180 185 190
 5 Leu Leu Ala Asp Asp Ser Ser Lys Met Asp Ile Pro Lys Val Asp Lys
 195 200 205
 10 Pro Gln Glu Leu Thr Phe Tyr Gln Lys Leu Ala Thr Asn Thr Lys Leu
 210 215 220
 15 Asp Asn Ser Asn Val Pro Tyr Tyr Glu Ala Thr Leu Ser Thr Asp Tyr
 225 230 235 240
 20 Tyr Val Glu Ser Lys Pro Asn Ala Ser Ser Ala Asp Lys Glu Phe Ile
 245 250 255
 25 Lys Ala Gly Thr Arg Val Arg Val Tyr Glu Lys Val Asn Gly Trp Ser
 260 265 270
 30 Arg Ile Asn His Pro Glu Ser Ala Gln Trp Val Glu Asp Asn Tyr Leu
 275 280 285
 Val Asn Ala Thr Asp Met
 290
 35 <210> 8
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia modificada de *Streptococcus agalactiae*
 40 <400> 8
 Met Ala Thr Tyr Gln Glu Tyr Lys Ser Arg Ser Asn Gly Asn Ala Tyr
 1 5 10
 45 Asp Ile Asp Gly Ser Phe Gly Ala Gln Cys Trp Asp Gly Tyr Ala Asp
 20 25 30
 50 Tyr Cys Lys Tyr Leu Gly Leu Pro Tyr Ala Asn Cys Thr Asn Thr Gly
 35 40 45
 55 Tyr Ala Arg Asp Ile Trp Glu Gln Arg His Glu Asn Gly Ile Leu Asn
 50 55 60
 Tyr Phe Asp Glu Val Glu Val Met Gln Ala Gly Asp Val Ala Ile Phe
 65 70 75 80
 60 Met Val Val Asp Gly Val Thr Pro Tyr Ser His Val Ala Ile Phe Asp
 85 90 95
 65 Ser Asp Ala Gly Gly Gly Tyr Gly Trp Phe Leu Gly Gln Asn Gln Gly

ES 2 357 626 T3

100 105 110
 5 Gly Ala Asn Gly Ala Tyr Asn Leu Val Lys Ile Pro Tyr Ser Ala Thr
 115 120 125
 Tyr Pro Thr Ala Phe Arg Pro Lys Ser Phe Lys Asn Ala Val Thr Val
 10 130 135 140
 Thr Asp
 145
 15 <210> 9
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> secuencia modificada de *Streptococcus agalactiae*
 25 <400> 9
 Met Ala Thr Tyr Gln Glu Tyr Lys Ser Arg Ser Asn Gly Asn Ala Tyr
 1 5 10 15
 30 Asp Ile Asp Gly Ser Phe Gly Ala Gln Cys Trp Asp Gly Tyr Ala Asp
 20 25 30
 Tyr Cys Lys Tyr Leu Gly Leu Pro Tyr Ala Asn Cys Thr Asn Thr Gly
 35 35 40 45
 Tyr Ala Arg Asp Ile Trp Glu Gln Arg His Glu Asn Gly Ile Leu Asn
 50 55 60
 40 Tyr Phe Asp Glu Val Glu Val Met Gln Ala Gly Asp Val Ala Ile Phe
 65 70 75 80
 45 Met Val Val Asp Gly Val Thr Pro Tyr Ser His Val Ala Ile Phe Asp
 85 90 95
 50 Ser Asp Ala Gly Gly Gly Tyr Gly Trp Phe Leu Gly Gln Asn Gln Gly
 100 105 110
 55 Gly Ala Asn Gly Ala Tyr Asn Leu Val Lys Ile Pro Tyr Ser Ala Thr
 115 120 125
 Tyr Pro Thr Ala Phe Arg Pro Lys Ser Phe Lys Asn Ala Val Thr Val
 130 135 140
 60 Thr Asp Lys Met Asp Ile Pro Lys Val Asp Lys Pro Gln Glu Leu Thr
 145 150 155 160
 65 Phe Tyr Gln Lys Leu Ala Thr Asn Thr Lys Leu Asp Asn Ser Asn Val
 165 170 175

ES 2 357 626 T3

Pro Tyr Tyr Glu Ala Thr Leu Ser Thr Asp Tyr Tyr Val Glu Ser Lys
180 185 190

5 Pro Asn Ala Ser Ser Ala Asp Lys Glu Phe Ile Lys Ala Gly Thr Arg
195 200 205

10 Val Arg Val Tyr Glu Lys Val Asn Gly Trp Ser Arg Ile Asn His Pro
210 215 220

15 Glu Ser Ala Gln Trp Val Glu Asp Asn Tyr Leu Val Asn Ala Thr Asp
225 230 235 240

20 Met

25

30

35

40

45

50

55

60

65