

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 357**

51 Int. Cl.:

C12N 9/50 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2009 E 09782176 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **15.06.2011 EP 2331687**

54 Título: **Agentes antimicrobianos**

30 Prioridad:

26.08.2008 GB 0815484

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

12.02.2013

73 Titular/es:

**KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN, K.U.
LEUVEN R&D (100.0%)
Minderbroedersstraat 8a Bus 5105
3000 Leuven, BE**

72 Inventor/es:

**BRIERS, YVES;
LAVIGNE, ROB y
VOLCKAERT, GUIDO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 395 357 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

Agentes antimicrobianos

La presente invención se refiere a variantes de endolisina modificadas con acción antibacteriana mejorada contra bacterias Gram negativas. Dichas variantes de endolisina modificadas comprenden una endolisina y un péptido catiónico fusionado a la endolisina, potenciado así la cationicidad de dicha endolisina. La presente invención también se refiere a un microorganismo transformado con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de endolisina modificada con cationicidad potenciada. La invención también se refiere a un procedimiento para la producción de una variante de endolisina usando, como organismo de producción, un microorganismo transformado con un ácido nucleico que codifica una variante de endolisina de acuerdo con la presente invención.

En particular la presente invención se refiere a variantes de endolisina que comprenden una endolisina a la cual se fusiona un tramo peptídico catiónico con actividad desestabilizadora de LPS, comprendiendo dicho tramo peptídico catiónico de 5 a 100 restos de aminoácidos y siendo al menos el 70 % de los restos de aminoácidos, comprendidos en dicho tramo peptídico, arginina y/o lisina y siendo del 0 % al 30 % serina y/o glicina. Además, la presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican dicha variante de endolisina modificada, a vectores que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico y a células huésped que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico o dichos vectores. Adicionalmente, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir dicha variante de endolisina. Por otro lado, la presente invención se refiere a dicha variante de endolisina modificada para su uso como un medicamento, en particular para el tratamiento o prevención de infecciones bacterianas Gram negativas, como medio de diagnóstico, desinfectante o como sustancia cosmética. La presente invención también se refiere a la eliminación, reducción o prevención de contaminación de bacterias Gram negativas de productos alimenticios, de equipos de tratamiento de alimentos, de instalaciones de tratamiento de alimentos, de superficies que se ponen en contacto con productos alimenticios, de dispositivos médicos, de superficies en hospitales y salas quirúrgicas. Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso de dicha variante de endolisina como un medio de diagnóstico en el diagnóstico médico, alimentario o ambiental para animales o ambiental.

Las endolisinas son peptidoglicano hidrolasas codificadas por bacteriófagos (o virus bacterianos). Se sintetizan durante la expresión génica tardía en el ciclo lítico de multiplicación de fagos y median la liberación de los viriones progenie de las células infectadas a través de la degradación del péptidoglicano bacteriano. Son $\beta(1,4)$ -glicosidasas (lisozimas), transglicosidasas, amidasas o endopeptidasas. La aplicación antimicrobiana de las endolisinas ya la sugirió por Gasson (documento GB224361 1) en 1991. Aunque la capacidad destructora de las endolisinas se conoce desde hace tiempo, el uso de estas enzimas como agentes antibacterianos se ignoraba debido al éxito y predominio de los antibióticos. Únicamente después de la aparición de bacterias resistentes a antibióticos múltiples este sencillo concepto de combatir patógenos humanos con endolisinas recibió interés. Surgió una necesidad apremiante de desarrollar clases de agentes antibacterianos totalmente nuevas y las endolisinas usadas como 'enzibióticos' - un término híbrido de 'enzimas' y 'antibióticos' - cumplió perfectamente esta necesidad. En el año 2001, Fischetti y colaboradores demostraron por primera vez el potencial terapéutico de las endolisinas del bacteriófago C1 contra estreptococos del grupo A (Nelson y col., 2001). Desde entonces muchas publicaciones han admitido a las endolisinas como una alternativa atractiva y complementaria para el control de infecciones bacterianas, particularmente ocasionadas por bacterias Gram positivas. Posteriormente, diferentes endolisinas contra otros patógenos Gram positivos, tales como *Streptococcus pneumoniae* (Loeffler y col., 2001), *Bacillus anthracis* (Schuch y col., 2002), *S. agalactiae* (Cheng y col., 2005) y *Staphylococcus aureus* (Rashel y col., 2007) han demostrado su eficacia como enzibióticos. Actualmente, el reto más importante de la terapia con endolisinas reside en la insensibilidad de las bacterias Gram negativas hacia la acción exógena de las endolisinas, ya que la membrana externa del peptidoglicano blindo el acceso de las endolisinas. Esto normalmente impide la expansión de una serie de endolisinas eficaces contra importantes patógenos Gram negativos.

Las bacterias Gram negativas poseen una membrana externa, con su típica bicapa asimétrica característica. La bicapa de la membrana externa consiste en una monocapa interna que contiene fosfolípidos (principalmente fosfatidil etanolamina) y una monocapa externa principalmente compuesta por un solo glicolípido, lipopolisacárido (LPS). En el reino bacteriano existe una inmensa diversidad de estructuras LPS y la estructura LPS puede modificarse en respuesta a las condiciones ambientales reinantes. La estabilidad de la capa LPS y la interacción entre diferentes moléculas LPS se consigue principalmente por la interacción electrostática de iones divalentes (Mg^{2+} , Ca^{2+}) con los componentes aniónicos de la molécula LPS (grupos fosfato en el lípido A y el núcleo interno y grupos carboxilo de KDO). Por lo tanto, los sitios de unión a cationes son esenciales para la integridad de la membrana externa (Vaara, 1992). Agentes policatiónicos tales como polímeros de poli-L-lisina (de al menos 20 restos) aumentan la permeabilidad de la membrana externa por desplazamiento de estos cationes divalentes estabilizantes. Además, ejercen un mecanismo denominado 'captación autopromovida' (Hancock y Wong, 1984). Debido a su voluminosidad, desestabilizan la función de barrera normal de la membrana externa y crean grietas transitorias, promoviendo su propia captación (Vaara y Vaara, 1983). Adicionalmente, la densa y ordenada compactación del resto hidrófobo del lípido A, favorecido por la ausencia de ácidos grasos insaturados, forma una estructura rígida con alta viscosidad. Esto le hace menos permeable a moléculas lipófilas y confiere estabilidad adicional a la membrana externa (ME).

Sin embargo, la progresiva resistencia microbiana a los antibióticos, está creando cada vez más dificultades en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias. En concreto surgen dificultades particulares con infecciones causadas por bacterias Gram negativas de tipo *Pseudomonas aeruginosa* y Enterobacteriáceas.

Por tanto, existe una necesidad de nuevos agentes antimicrobianos contra bacterias Gram negativas.

5 Este propósito lo resuelve la materia objeto definida en las reivindicaciones.

Las siguientes figuras ilustran la presente invención.

10 La Figura 1 es una visión global esquemática que muestra una construcción plasmídica para la producción recombinante de (POLY)ⁿ-gp144 ((POLY)ⁿ-KZ144). Previamente, se construyó pEXP5CT/POLY-gp144 (pEXP5CT/POLYKZ144) mediante una tail PCR (con el sitio de restricción BamHI y un primer casete policatiónico en el cebador tail 5'). El plásmido se linealizó con BamHI, se desforolizó y se ligó con un casete que contenía extremos BamHI salientes. Este casete se origina a partir de la hibridación de dos oligonucleótidos complementarios y codifica 9 restos cargados positivamente. Entre el primer y el segundo casete se crea un resto de arginina positivo adicional, junto con una serina. De manera similar se construyeron variantes más largas pEXP5CT/(POLY)ⁿ-gp144 (pEXP5CT/(POLY)ⁿ-KZ144) mediante ciclos repetidos.

15 La Figura 2 muestra la expresión y secreción de POLY-gp144 por *Pichia pastoris*. Se añade una cantidad de 30 µl de sobrenadante de un cultivo de expresión de X33 de *P. pastoris* [después de 1 día (cuadrados), 3 días (triángulos) y 4 días (círculos)] a 270 µl de células PAOl_p de *P. aeruginosa* permeabilizadas con cloroformo. Las condiciones del tampón eran las condiciones enzimáticas óptimas de POLY-gp144 (KH₂PO₄/K₂HPO₄) I = 120 mM, pH 6,2). Posteriormente, se registró la densidad óptica espectrofotométricamente. Una disminución en la densidad óptica indica la secreción de una enzima muralítica por *P. pastoris*. Como control negativo, se incluyó la cepa X33 de *P. pastoris* sin plásmido de expresión (rombo).

20

25 La Figura 3 muestra, en una representación gráfica, la actividad antibacteriana de las endolisinas phiKZgp144 y ELgp188 no modificadas, de las variantes POLY-gp144 y POLY-gp188 modificadas, que comprenden un tramo peptídico que comprende 9 restos de aminoácidos cargados positivamente, y de las variantes (POLY)²-gp144 y (POLY)²-gp188 modificadas, que comprenden un tramo peptídico que comprende 18 restos de aminoácidos cargados positivamente, en células PAOl_p de *Pseudomonas aeruginosa*. Las barras de error representan las desviaciones típicas de la media.

30 La Figura 4 muestra una imagen de una SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con dodecil sulfato sódico (SDS)) teñida con Coomassie que muestra los resultados de la expresión y purificación de la endolisina PSP3gp10 no modificada y su variante endolisina PKPSP3gp10 modificada. El carril LMW corresponde a un marcador de tamaño (escala LMW). Los otros tres carriles corresponden a fracciones de proteínas de la proteína purificada en tampón de elución (NaH₂PO₄-NaOH 20 mM pH 7,4; NaCl 0,5 M; imidazol 500 mM) después de cromatografía por afinidad con Ni²⁺. El carril FT corresponde al flujo continuo (*Flow Through*) y el carril W a fracciones residuales (*Waste*). En las fracciones de proteínas purificadas solo se visualizan bandas secundarias leves, lo que indica la alta pureza (>90 %) de las proteínas recombinantes.

35

40 Las Figuras 5A a D muestran una representación gráfica de las actividades antibacterianas de la endolisina PSP3gp10 no modificada y de la variante PKPSP3gp10 modificada, en diferentes composiciones en diversas bacterias Gram negativas de crecimiento exponencial después de una incubación a temperatura ambiente y sin agitación. Cada especie de bacteria Gram negativa se incubó durante 30 minutos con una composición que comprendía EDTA 0,5 mM pero no endolisina, con una composición que comprendía la PSP3gp10 no modificada 1,315 µM pero no EDTA, con una composición que comprendía la PKPSP3gp10 no modificada 1,315 µM y EDTA 0,5 mM y con una composición que comprendía la PKPSP3gp10 no modificada 1,315 µM y EDTA 0,5 mM. En la Figura 5A se representa la actividad antibacteriana en células PAOl_p de *P. aeruginosa*, en la Figura 5B la actividad antibacteriana en células Br667 de *P. aeruginosa*, en la Figura 5 la actividad antibacteriana en células WK6 de *E. coli* y en la Figura 5D la actividad antibacteriana en células LT2 de *Salmonella typhimurium*. El símbolo "Δ" proporciona la diferencia de actividad entre las muestras PSP3gp10 y PKPSP3gp10 respectivas. Las barras de error representan las desviaciones típicas de la media.

45

50 La Figura 6 muestra una imagen de una SDS-PAGE teñida con Coomassie que muestra los resultados de la expresión y purificación de la endolisina P2gp09 no modificada y su variante endolisina PKP2gp09 modificada. El carril LMW corresponde a un marcador de tamaño (escala LMW). Los otros tres carriles corresponden a fracciones de proteínas de la proteína purificada en tampón de elución (NaH₂PO₄-NaOH 20 mM pH 7,4; NaCl 0,5 M; imidazol 500 mM) después de cromatografía por afinidad con Ni²⁺. El carril FT corresponde al flujo continuo y el carril W a fracciones residuales. En las fracciones de proteínas purificadas solo se visualizan bandas secundarias leves, lo que indica la alta pureza (>95 %) de las proteínas recombinantes.

55

Las Figuras 7 A a F muestran una representación gráfica de las actividades antibacterianas de la P2gp09 no modificada y de la PKP2gp09 modificada, en diferentes composiciones en diversas bacterias Gram negativas

de crecimiento exponencial después de una incubación a temperatura ambiente y sin agitación. Cada especie de bacteria Gram negativa se incubó durante 30 minutos con una composición que comprendía EDTA 0,5 mM pero no endolisina, con una composición que comprendía la P2gp09 no modificada 1,315 μ M pero no EDTA, con una composición que comprendía la PKP2gp09 modificada 1,315 μ M pero no EDTA, con una composición que comprendía la P2gp09 no modificada 1,315 μ M y EDTA 0,5 mM y con una composición que comprendía la PKP2gp09 modificada 1,315 μ M y EDTA 0,5 mM. En la Figura 7A se representa la actividad antibacteriana en células PAO1p de *P. aeruginosa*, en la Figura 7B se representa la actividad antibacteriana en células Br667 de *P. aeruginosa*, en la Figura 7 C la actividad antibacteriana en células WK6 de *E. coli*, en la Figura 7D la actividad antibacteriana en células de *Burkholderia pseudomallei*, en la Figura 7E la actividad antibacteriana en células G1 de *Pseudomonas putida* y en la Figura 7F la actividad antibacteriana en células LT2 de *Salmonella typhimurium* (SGSC N° 2317). El símbolo “ Δ ” proporciona la diferencia de actividad entre las muestras P2gp09 y PKP2gp09 respectivas. Las barras de error representan las desviaciones típicas de la media.

La Figura 8 muestra una imagen de una SDS-PAGE teñida con Coomassie que muestra los resultados de la expresión y purificación de la endolisina OBPgpLYS no modificada y de su variante endolisina PKOBPgpLYS modificada. El carril LMW corresponde a un marcador de tamaño (escalera LMW). Los otros tres carriles corresponden a fracciones de proteínas de la proteína purificada en tampón de elución (NaH_2PO_4 -NaOH 20 mM pH 7,4; NaCl 0,5 M; imidazol 20 mM) después de cromatografía por afinidad con Ni^{2+} . El carril FT corresponde al flujo continuo y el carril W a fracciones residuales. En las fracciones de proteínas purificadas solo se visualizan bandas secundarias leves, lo que indica la alta pureza (>90 %) de las proteínas recombinantes

Las Figuras 9A a F muestran en una representación gráfica de las actividades antibacterianas de diferentes composiciones de la endolisina OBPgpLYS no modificada y su variante PKOBPgpLYS modificada en diversas bacterias Gram negativas de crecimiento exponencial después de incubación a temperatura ambiente y sin agitación. Cada especie de bacteria Gram negativa se incubó durante 30 minutos con una composición que comprendía EDTA 0,5 mM pero no endolisina, con una composición que comprendía OBPgpLYS no modificada 1,315 μ M pero no EDTA, con una composición que comprendía OBPgpLYS no modificada 1,315 μ M y EDTA 0,5 mM y con una composición que comprendía PKOBPgpLYS no modificada 1,315 μ M y EDTA 0,5 mM. En la Figura 9A se representa la actividad antibacteriana en células WK6 de *Escherichia coli*, en la Figura 9B la actividad antibacteriana en células LT2 de *Salmonella typhimurium* (SGSC N° 2317), en la Figura 9C la actividad antibacteriana en células PAO1p de *Pseudomonas aeruginosa*, en la Figura 9D la actividad antibacteriana en células Br667 de *Pseudomonas aeruginosa*, en la Figura 9E la actividad antibacteriana de células G1 de *Pseudomonas putida* y en la Figura 9F la actividad antibacteriana de células de *Burkholderia pseudomallei*. El símbolo “ Δ ” proporciona la diferencia de actividad entre las muestras OBPgpLYS y PKOBPgpLYS respectivas. Las barras de error representan las desviaciones típicas de la media.

El término “proteína”, como se usa en el presente documento, se refiere al término sinónimo “polipéptido”. El término “proteína”, como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero lineal de restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos en una secuencia específica. Los restos de aminoácidos de una proteína pueden modificarse, por ejemplo, mediante uniones covalentes de diversos grupos tales como carbohidratos y fosfato. Otras sustancias pueden asociarse más débilmente con las cadenas polipeptídicas, tales como de tipo hemo o de lípidos, dando lugar a proteínas conjugadas, también incluidas en el término “proteína” como se usa en el presente documento. El plegamiento de las cadenas polipeptídicas se ha aclarado de diversas maneras, particularmente con respecto a la presencia de hélices alfa y láminas beta plegadas. El término “proteína”, como se usa en el presente documento, se refiere a las cuatro clases de proteínas que son todas alfa, todas beta, alfa/beta y alfa más beta.

La expresión “proteína de fusión”, como se usa en el presente documento, se refiere a un producto de expresión resultante de la fusión de dos secuencias de ácido nucleico. Tal proteína puede producirse, por ejemplo, en sistemas de expresión de ADN recombinante. Además, la expresión “proteína de fusión”, como se usa en el presente documento, se refiere a una fusión de una primera secuencia de aminoácidos, en particular una endolisina, autolisina y/u otra peptidoglicano hidrolasa, con una segunda o más secuencias de aminoácidos. La segunda o más secuencias de aminoácidos es preferentemente un tramo peptídico, en particular un péptido catiónico y/o policatiónico. Preferentemente, dicha segunda y/o más secuencias de aminoácidos es extraña a, y sustancialmente no homóloga con, cualquier dominio de la primera secuencia de aminoácidos.

En el presente documento, las expresiones “variante de endolisina modificada” y “variante de endolisina” son sinónimas. Ambos términos se refieren a una proteína de fusión que comprende una endolisina y un tramo peptídico, en particular un péptido catiónico y/o policatiónico.

La expresión “tramo peptídico”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tipo de péptido unido a una proteína, tal como una endolisina, autolisina y/o peptidoglicano hidrolasa. En particular, la expresión “tramo peptídico”, como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido catiónico y/o a un péptido policatiónico. Sin embargo, un tramo peptídico, en el significado de la presente invención, no se refiere a etiquetas de His, etiquetas de Strep, etiquetas de Avi, etiquetas de Myc, etiquetas de Gst, etiquetas de JS, etiquetas de cisteína,

etiquetas de FLAG ni a otras etiquetas conocidas en la técnica, tiorredoxina o proteínas de unión a maltosa (MBP, *Maltose Binding Proteins*). El término “etiqueta”, a diferencia de lo que ocurre con la expresión “tramo peptídico”, como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido que puede ser útil para facilitar la expresión y/o purificación por afinidad de un polipéptido, para inmovilizar un polipéptido a una superficie o para servir como un marcador o resto identificador para la detección de un polipéptido, por ejemplo, mediante la unión a anticuerpos en diferentes formatos de ensayo de tipo ELISA, siempre y cuando la función útil que realice la etiqueta, para una de las facilitaciones indicadas anteriormente, no esté causada por la carga positiva de dicho péptido. Sin embargo, la etiqueta de His también puede, dependiendo del pH respectivo, estar cargada positivamente, aunque se use como una herramienta de purificación por afinidad, ya que se une a cationes divalentes inmovilizados y no se use como un tramo peptídico de acuerdo con la presente invención.

El término “péptido”, como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos cortos que constan de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 restos de aminoácidos, más preferente de aproximadamente 4 a aproximadamente 50 restos de aminoácidos, más preferentemente de aproximadamente 5 a 30 restos de aminoácidos, en el que el grupo amino de un resto de aminoácido está unido al grupo carboxilo del otro resto de aminoácido mediante un enlace peptídico. Un péptido puede tener una función específica. Un péptido puede ser de origen natural o puede ser un péptido producido y diseñado sintéticamente. El péptido puede, por ejemplo, derivar o extraerse de una proteína natural por escisión enzimática o química, o puede prepararse usando técnicas de síntesis peptídica convencionales (por ejemplo, síntesis en fase sólida) o técnicas de biología molecular (véase Sambrook, J. y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Los péptidos preferidos, producidos sintéticamente, son péptidos catiónicos o policatiónicos.

Como se usa en el presente documento, la expresión “péptido catiónico” se refiere a un péptido que tiene restos de aminoácidos cargados positivamente. Preferentemente un péptido catiónico tiene un valor de pKa de 9,0 o superior. Normalmente, al menos cuatro de los restos de aminoácidos del péptido catiónico pueden estar cargados positivamente, por ejemplo, lisina o arginina. “Cargado positivamente” se refiere a las cadenas laterales de los restos de aminoácidos que tienen una carga positiva neta a condiciones que se aproximan a las fisiológicas. La expresión “péptido catiónico”, como se usa en el presente documento, también se refiere a péptidos policatiónicos.

La expresión “péptido policatiónico”, como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido diseñado y producido sintéticamente compuesto principalmente por restos de aminoácidos cargados positivamente, en particular restos de lisina, arginina y/o histidina, más preferentemente restos de lisina y/o arginina. Un péptido está compuesto por restos de aminoácidos cargados positivamente si al menos aproximadamente el 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o aproximadamente el 100 % de los restos de aminoácidos son restos de aminoácidos cargados positivamente, en particular, restos de lisina y/o arginina. Los restos de aminoácidos que no son restos de aminoácidos cargados positivamente pueden ser restos de aminoácidos con carga neutra y/o negativa y/o pueden ser restos de aminoácidos hidrófobos. Preferentemente, los restos de aminoácidos que no son restos de aminoácidos cargados positivamente son restos de aminoácidos con carga neutra, en particular serina y/o glicina.

El término “endolisina”, como se usa en el presente documento, se refiere a una enzima que es adecuada para hidrolizar las paredes celulares bacterianas. Las “endolisinas” comprenden al menos un “dominio enzimáticamente activo” (DEA) que tiene al menos una de las siguientes actividades: endopeptidasa, N-acetil-muramoyl-L-alanina-amidasa (amidasa), N-acetil-muramidasa, N-acetil-glucosaminidasa (lisozima) o transglicosilasas. Además, las endolisinas pueden contener también regiones que son enzimáticamente inactivas, y que se unen a la pared celular de las bacterias huéspedes, los denominados DsUC (dominios de unión a la pared celular). La endolisina puede contener, uno dos o más DsUC. Sin embargo, el término “endolisina”, como se usa en el presente documento, también se refiere a enzimas que tienen al menos un DEA pero no DsUC. Generalmente, el dominio de unión a la pared celular puede unir diferentes componentes a la superficie de las bacterias. Preferentemente, el dominio de unión a la pared celular es un dominio de unión a peptidoglicano y se une al peptidoglicano de la bacteria.

La expresión “pared celular”, como se usa en el presente documento, se refiere a todos los componentes que forman el recinto celular externo de las bacterias Gram negativas, garantizando así su integridad. En particular, la expresión “pared celular”, como se usa en el presente documento, se refiere al peptidoglicano, a la membrana externa de las bacterias Gram negativas con el lipopolisacárido, a la membrana celular bacteriana, pero también a las capas adicionales depositadas sobre el peptidoglicano, tales como por ejemplo, cápsulas, capas o sustancias gelatinosas externas de proteínas.

El término “autolisinas”, como se usa en el presente documento, se refiere a enzimas relacionadas con endolisinas pero codificadas por bacterias e implicadas, por ejemplo, en la división celular y en el metabolismo de la pared celular. Una revisión general sobre las autolisinas puede encontrarse en “*Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases*. Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S. *FEMS Microbiol Rev.* mar 2008; 32(2): 259-86”.

La expresión “DEA”, como se usa en el presente documento, se refiere al dominio enzimáticamente activo de una endolisina. El DEA es responsable de hidrolizar los peptidoglicanos bacterianos. Presenta al menos una actividad enzimática de una endolisina. El DEA también puede estar compuesto por más de un módulo enzimáticamente activo. En el presente documento las expresiones “DEA” y “dominio catalítico” son sinónimas

El término “delección”, como se usa en el presente documento, se refiere a la eliminación de 1, 2, 3, 4, 5 o más restos de aminoácidos de la secuencia de partida respectiva.

El término “inserción” o “adición”, como se usa en el presente documento, se refiere a la inserción o adición de 1, 2, 3, 4, 5 o más restos de aminoácidos a la secuencia de partida respectiva.

- 5 El término “sustitución”, como se usa en el presente documento, se refiere al intercambio de un resto de aminoácido, localizado en una determinada posición, por otro diferente.

La presente invención se refiere a agentes antibacterianos mejorados contra bacterias Gram negativas, en su caso a variantes de endolisina modificadas, que comprenden una endolisina fusionada a un péptido con actividad desestabilizadora de lipopolisacárido (LPS) o, en general, actividad desestabilizadora de membrana. El LPS es un
 10 componente principal de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Aumenta la carga negativa de la membrana celular y protege a la membrana de determinados tipos de ataque químico. A un determinado nivel dicho LPS protege a la membrana de las bacterias Gram negativas y también de las endolisinas añadidas desde fuera de las bacterias. Sin embargo, tramos peptídicos con actividad desestabilizadora de LPS, como por ejemplo, péptidos cargados positivamente, pueden desestabilizar el LPS. Además, dichos tramos peptídicos pueden estar implicados
 15 en el mecanismo de transporte de proteínas de la membrana externa, una desestabilización de las proteínas de la membrana externa estructural y/o en la desestabilización dependiente de lípidos. De manera sorprendente, los inventores de la presente invención, han descubierto que, un tramo peptídico con actividad desestabilizadora de LPS o, en general, actividad desestabilizadora de membrana, promueve el paso de una endolisina fusionada a dicho tramo peptídico a través de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Tras el paso promovido de la
 20 endolisina a través de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, la endolisina puede desestabilizar o disgregar más fácilmente pared celular de la bacteria Gram negativa debido a la degradación de la capa de peptidoglicano seguido de lisis osmótica que se produce cuando la bacteria no puede resistir más la presión celular interna.

Por tanto, la presente invención se refiere a proteínas de fusión compuestas por una endolisina con actividad
 25 degradadora de la pared celular de las bacterias Gram negativas y un tramo peptídico catiónico con actividad desestabilizadora de membrana, comprendiendo dicho tramo peptídico de 5 a 100 restos de aminoácidos y siendo al menos el 70 % de los restos de aminoácidos, comprendidos en dicho tramo peptídico, arginina y lisina y siendo del 0 % al 30 % serina y/o glicina. Dicho tramo peptídico catiónico está fusionado a la enzima en el extremo N y/o C. Dichas proteínas de fusión de acuerdo con la presente invención también se denominan variantes de endolisina
 30 modificadas o simplemente variantes de endolisina o endolisinas modificadas.

La parte endolisina de la variante de endolisina modificada está preferentemente codificada por bacteriófagos
 35 específicos de bacterias Gram negativas, tales como bacterias Gram negativas de grupos, familias, géneros o especies de bacterias que comprenden cepas patógenas para seres humanos o animales como Enterobacteriaceae (*Escherichia*, especialmente *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, especialmente *K. pneumoniae*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Yersinia*), *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*, especialmente *P. aeruginosa*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Shewanella*, *Sphingomonas*, *Comamonas*), *Neisseria*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Brucella*, *Francisella*, *Bordetella*, *Legionella*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Actinobacillus*, *Gardnerella*, *Spirochaetaceae* (*Treponema* y *Borrelia*), *Leptospiraceae*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Spirillum*, *Streptobacillus*, *Bacteroidaceae* (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*), *Acinetobacter*, especialmente *A. baumannii*.

Además, la endolisina tiene, preferentemente, actividad degradadora de la pared celular contra bacterias Gram
 45 negativas de los grupos, familias, géneros o especies de bacterias que comprenden cepas patógenas de seres humanos o animales como Enterobacteriaceae (*Escherichia*, especialmente *E. coli*, *Salmollella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, especialmente *K. pneumoniae*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Yersinia*), *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*, especialmente *P. aeruginosa*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Shewanella*, *Sphingomonas*, *Comamonas*), *Neisseria*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Brucella*, *Francisella*, *Bordetella*, *Legionella*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Actinobacillus*, *Gardnerella*, *Spirochaetaceae* (*Treponema* y *Borrelia*), *Leptospiraceae*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Spirillum*, *Streptobacillus*, *Bacteroidaceae* (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*), *Acinetobacter*,
 50 especialmente *A. baumannii*.

Preferentemente, la parte endolisina deriva de un fago o de una endolisina de tipo silvestre, como se representa en la siguiente tabla:

ES 2 395 357 T3

Fago	Publicación	Endolisina de tipo silvestre	Función prevista de la endolisina
ΦV10	Perry, L.L. y Applegate, B.M.	PhiV10p30	quitinasa
FELS-1	McClelland, M. y Wilson, R.K.	STM0907. Fels0	quitinasa
ε15	Kropinski, A.M. y McConnel, M.R.	epsilon15p25	quitinasa
YUA	Ceysens. P. (Laboratorio de Tecnología Genética)	YuA20	transglicosilasa lítica (C) / dominio transmembrana 1 (N)
B3	Braid, M.D. y Kitts, C.L.	ORF23	transglicosilasa lítica (C) / 2 dominios transmembrana (N)
BCEPμ	Summer, E.J. y Young, R.	BcepMu22	transglicosilasa lítica (M) / 1 dominio transmembrana (N)
F116	Byrne, M. y Kropinski, A.M.	F116p62	muraminidasa (similar a T4)
FELS-2	McClelland, M. y Wilson, R.K.	STM2715.S.Fels2	muraminidasa (similar a T4)
ES18	Casjens, S.R. y Hendrix, R.W.	gp76	muraminidasa (similar a T4)
SETP3	De Lappe, N y Cormican, M.	SPSV3_gp23	muraminidasa (similar a T4)
ΦECO32	Savalia, D y Severinov, K	phi32_17	muraminidasa (similar a T4)
HK022	Juhala, R y Hendrix, R.W.	HK022p54	muraminidasa (similar a lambda)
HK97	Juhala, R y Hendrix, R.W.	HK97p58	muraminidasa (similar a lambda)
HK620	Clark, A.J. y Dhillon, T.S.	HK620p36	muraminidasa (similar a lambda)
E1	Pickard, D. y Dougan, G	VIP0007	muraminidasa (similar a lambda)
SF6	Casjens, S y Clark, A.J.	Sf6p62	muraminidasa (similar a lambda)
SFV	Allison, G.E. y Verma, N.K.	R (SfVp40)	muraminidasa (similar a lambda)
BCEPC6B	Summer, EJ y Young, R.	gp22	muraminidasa (similar a lambda)
BCEPNAZGUL	Summer, EJ y Young, R.	Nazgul38	muraminidasa (similar a lambda)
P2	Christie, G.E. y Calender, R.	K (P2p09)	muraminidasa (similar a lambda)
WΦ	Christie, G.E. y Esposito, D.	K (Wphi09)	muraminidasa (similar a lambda)
RV5	Kropinski, A.M. y Johnson	rv5_gp085	muraminidasa (similar a lambda)
JS98	Zuber, S y Denou, E.	EpJS98_gp116	muraminidasa (similar a T4)
13A	Savalia, D y Molineux, I.	gp3.5	muramoil-L-alanina amidasa
BA14	Savalia, D y Molineux, I.	gp3.5	muramoil-L-alanina amidasa
ECODS1	Savalia, D y Molineux, I.	gp3.5	muramoil-L-alanina amidasa
K1F	Scholl, D y Merrill, C	CKV1F_gp16	muramoil-L-alanina amidasa
T3	Pajunen, M.I. y Mollieux, I.J.	T3p18	muramoil-L-alanina amidasa
GH-1	Kropinski, A.M. y Kovalyova, I.V.	gh-1p12	muramoil-L-alanina amidasa
K11	Molineux, I. y Savalia, D.	gp3.5	muramoil-L-alanina amidasa
BIP-1	Liu, M y Miller, J.F.	bip-1p02	lisozima (N) / dominio de unión a PG (C)
BMP-1	Liu, M y Miller, J.F.	bmp-1p02	lisozima (N) / dominio de unión a PG (C)
BPP-1	Liu, M y Miller, J.F.	bpp2	lisozima (N) / dominio de unión a PG (C)
ΦCTX	Nakayama, K y Hayashi, T.	ORF12	dominio de unión a PG (N) / muramidasa (C)
BCEP43	Summer, EJ y Young, R.	Bcep43-27	dominio de unión a PG (N) / muramidasa (C)
BCEP781	Summer, EJ y Young, R.	Bcep781-27	dominio de unión a PG (N) / muramidasa (C)

(continuación)

Fago	Publicación	Endolisina de tipo silvestre	Función prevista de la endolisina
BCEP1	Summer, EJ y Young, R.	Bcep1-28	dominio de unión a PG (N) / muramidasa (C)
BCEPNY3	Summer, EJ y Young, R.	BcepNY3gene26	dominio de unión a PG (N) / muramidasa (C)
ΦE12-2	DeShazer, D y Nierman, W.C.	gp45	dominio de unión a PG (N) / muramidasa (C)
Φ52237	DeShazer, D y Nierman, W.C.	gp28	dominio de unión a PG (N) / muramidasa (C)
ΦP27	Recktenwald, J y Schmidt, H.	P27p30	endopeptidasa
RB49	Monod, C y Krisch, H.M.	RB49p102	endopeptidasa
Φ1	Arbiol, C. y Comeau, A.M.	phi1-p102	endopeptidasa
T5	Pankova, N.V. y Ksenzenko, V.N.	lys (T5.040)	endopeptidasa
201phi2-1	Thomas <i>y col.</i> , 2008		dominio de unión a PG (N) / dominio catalítico desconocido (C)
Aeh1	Monod, C y Krisch, H.M.	Aeh1p339	muraminidasa (similar a T4)
YYZ-2008	Kropinski, A.M.	YYZgp45	muraminidasa (similar a lambda)

También se prefiere la parte endolisina derivada de endolisinas de los fagos ΦKZ y EL de *Pseudomonas aeruginosa* del fago OBP de *Pseudomonas putida*, del fago LUZ24, o de la lisozima de T4, muraminidasa de gp61 y endolisina PSP3.

Más preferentemente, la parte endolisina se selecciona del grupo que consiste en phiKZgp144 de acuerdo con la SEC ID N°: 1, ELgp188 de acuerdo con la SEC ID N°: 2, endolisina de *Salmonella* de acuerdo con la SEC ID N°: 3, endolisina del fago T4 de Enterobacteria de acuerdo con la SEC ID N°: 4, endolisina de *Acinetobacter baumannii* de acuerdo con la SEC ID N°: 5, endolisina del Fago K1F de *E.coli* de acuerdo con la SEC ID N°: 6, OBPpLYS de acuerdo con la SEC ID N°: 7, endolisina PSP3 de *Salmonella* (PSP3gp10) de acuerdo con la SEC ID N°: 8 y la endolisina del Fago P2 de *E.coli* (P2gp09) de acuerdo con la SEC ID N°: 9.

En otra realización preferida de la presente invención las endolisinas o las variantes de endolisina modificadas de acuerdo con la presente invención comprenden modificaciones y/o alteraciones de la secuencias de aminoácidos. Dichas alteraciones y/o modificaciones pueden comprender mutaciones tales como deleciones, inserciones y adiciones, sustituciones o combinaciones de las mismas y/o cambios químicos de los restos de aminoácidos por ejemplo, biotiniación, acetilación, PEGilación, cambios químicos de los grupos amino-, SH- o carboxilo. Dichas endolisinas modificadas y/o alteradas presentan la actividad lítica de la endolisina de tipo silvestre respectiva. Sin embargo, dicha actividad puede ser mayor o menor que la actividad de la endolisina de tipo silvestre respectiva. Dicha actividad puede ser aproximadamente el 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o aproximadamente el 200 % de la actividad de la endolisina de tipo silvestre respectiva o incluso más. La actividad puede medirla un experto en la técnica mediante ensayos bien conocidos por el experto en la técnica, tal como, por ejemplo el ensayo de lisis en placa o el ensayo lisis en líquidos, descritos, por ejemplo, en Briers *y col.*, *J. Biochem. Biophys Methods* 70: 531-533, (2007).

El péptido catiónico con actividad desestabilizadora de LPS comprende los aminoácidos lisina y/o arginina cargados positivamente. Además, puede comprender la histidina, un aminoácido cargado positivamente. Preferentemente, más del 80 %, preferentemente más del 90 %, preferentemente el 100 % de los aminoácidos en dicho péptido son aminoácidos cargados positivamente. Ventajosamente, el péptido catiónico está fusionado en el extremo N y/o en el extremo C de las variantes de endolisina, potenciando así la cationicidad de las últimas proteínas. En otra realización de la invención, el péptido catiónico fusionado a la endolisina tiene una longitud de al menos 5, más preferentemente al menos 9, aminoácidos.

En una realización preferida la variante de endolisina comprende una endolisina y un péptido fusionado a la misma comprendiendo dicho péptido de aproximadamente 5 a aproximadamente 20, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 restos de aminoácidos y al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 80 %, por ejemplo al menos el 90 % de dichos restos de aminoácidos son restos de arginina o de lisina. En otra realización preferida la variante de endolisina comprende una endolisina y un péptido fusionado a la misma comprendiendo dicho péptido de aproximadamente 5 a aproximadamente 20, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 restos de aminoácidos y dichos restos de aminoácidos son restos de arginina o de lisina.

Preferentemente, el tramo peptídico catiónico de la variante de endolisina modificada está fusionado al extremo N y/o al extremo C de la endolisina. En una realización preferida particular, dicho tramo peptídico catiónico solo está fusionado en el extremo N de la endolisina. Sin embargo, también se prefieren variantes de endolisina modificadas que tienen un tramo peptídico catiónico tanto en el extremo N como en el extremo C. Dichos tramos peptídicos catiónicos en el extremo N y en el extremo C pueden ser tramos peptídicos iguales o diferentes.

El tramo peptídico catiónico de la variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención está preferentemente unido de manera covalente a la enzima. Preferentemente, dicho tramo peptídico consiste al menos en 5, más preferentemente al menos en 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o al menos en 100 restos de aminoácidos. Especialmente se prefiere un tramo peptídico que comprende de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 restos de aminoácidos, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 o de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 restos de aminoácidos. Se prefiere más un tramo peptídico catiónico que comprenda de aproximadamente 6 a aproximadamente 42 restos de aminoácidos, de aproximadamente 6 a aproximadamente 39 restos de aminoácidos, de aproximadamente 6 a aproximadamente 38 restos de aminoácidos, de aproximadamente 6 a aproximadamente 31 restos de aminoácidos, de aproximadamente 6 a aproximadamente 25 restos de aminoácidos, de aproximadamente 6 a aproximadamente 24 restos de aminoácidos, de aproximadamente 6 a aproximadamente 22 restos de aminoácidos, de aproximadamente 6 a aproximadamente 21 restos de aminoácidos, de aproximadamente 6 a aproximadamente 20 restos de aminoácidos, de aproximadamente 6 a aproximadamente 19 restos de aminoácidos, de aproximadamente 6 a aproximadamente 16 restos de aminoácidos, de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 restos de aminoácidos, de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 restos de aminoácidos, de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 restos de aminoácidos o de aproximadamente 6 a aproximadamente 9 restos de aminoácidos.

En un aspecto de la presente invención más de aproximadamente el 70, 75, 80, 85, 90, 95 o el 99 % de los restos de aminoácidos en dicho tramo peptídico catiónico son restos de aminoácidos cargados positivamente, concretamente restos de lisina y/o arginina. Especialmente los tramos peptídicos preferidos consisten en aproximadamente el 100 % de restos de aminoácidos cargados positivamente, en particular restos de arginina y/o lisina, en el que preferentemente de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 70 % de dichos restos de aminoácidos cargados positivamente son restos de lisina y aproximadamente del 30 % a aproximadamente el 40 % de dichos restos de aminoácidos cargados positivamente son restos de arginina. Se prefiere más un tramo peptídico que consiste aproximadamente en el 100 % de restos de aminoácidos cargados positivamente, en particular restos de arginina y/o lisina, en el que preferentemente de aproximadamente el 64 % a aproximadamente el 68 % de dichos restos de aminoácidos cargados positivamente son lisina y aproximadamente del 30 % a aproximadamente el 36 % de dichos restos de aminoácidos cargados positivamente son arginina. También se prefieren tramos peptídicos que consisten solo en arginina o solo en lisina.

Se prefieren especialmente tramos peptídicos catiónicos y/o policatiónicos que comprenden al menos un motivo de acuerdo con la SEC ID N°: 10 (KRKKRK). En particular se prefieren tramos peptídicos catiónicos que comprenden al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 motivos de acuerdo con la SEC ID N°: 10 (KRKKRK). Se prefieren más, tramos peptídicos catiónicos que comprenden al menos un motivo KRK (lis-arg-lis), preferentemente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 o 33 motivos KRK.

En otra realización preferida de la presente invención el tramo peptídico catiónico comprende, junto con los restos de aminoácidos cargados positivamente de lisina y/o arginina, restos de aminoácidos con carga neutra, concretamente restos de glicina y/o serina. Los tramos peptídicos catiónicos preferidos consisten en aproximadamente del 70 % a aproximadamente el 100 %, o aproximadamente del 80 % a aproximadamente el 95 % o aproximadamente del 85 % a aproximadamente el 90 % de restos de aminoácidos cargados positivamente, concretamente restos de lisina y/o arginina y/o de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 30 %, o de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 %, o de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 20 % de restos de aminoácidos con carga neutra, concretamente restos de glicina y/o serina. Además, dicho tramo peptídico catiónico puede comprender los restos de histidina cargados positivamente y/o adicionalmente restos de aminoácidos con carga neutra. Se prefieren tramos polipeptídicos que consisten en aproximadamente del 4 % a aproximadamente el 8 % de restos de serina, de aproximadamente el 33 % a aproximadamente el 36 % de restos de arginina y de aproximadamente el 56 % a aproximadamente el 63 % de restos de lisina. Se prefieren especialmente tramos polipeptídicos que comprenden al menos un motivo de acuerdo con la SEC ID N°: 32 (KRXKR), en la que X es cualquier otro aminoácido distinto de lisina, arginina e histidina. Especialmente se prefieren tramos polipeptídicos que comprenden al menos un motivo de acuerdo con la SEC ID N°: 33 (KRSKR). Se prefieren más tramos catiónicos que comprenden al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o aproximadamente 20 motivos de acuerdo con la SEC ID N°: 32 (KRXKR) o SEC ID N°: 33 (KRSKR).

También se prefieren tramos polipeptídicos que consisten en aproximadamente del 9 a aproximadamente el 16 % de restos de glicina, de aproximadamente el 4 a aproximadamente el 11 % de restos de serina, de aproximadamente el 26 a aproximadamente el 32 % de restos de arginina y de aproximadamente el 47 a aproximadamente el 55 % de restos de lisina.

ES 2 395 357 T3

endolisina modificada a través de la membrana externa de las bacterias Gram negativas se debe al potencial de la membrana externa o a la actividad desestabilizadora de LPS de dicho tramo peptídico.

Especialmente se prefieren variantes de endolisina modificadas seleccionadas del grupo que consiste en las siguientes variantes de endolisina modificadas:

Variante de endolisina modificada	SEC ID Nº: (variante de endolisina modificada)	Parte endolisina	Tramo peptídico (extremo N salvo que se indique otra cosa)
POLY-gp144	SEC ID Nº: 35	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 11
(POLY) ² -gp144	SEC ID Nº: 36	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 21
(POLY) ³ -gp144	SEC ID Nº: 37	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 27
(POLY) ⁴ -gp144	SEC ID Nº: 38	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 30
POLY-gp188	SEC ID Nº: 39	SEC ID Nº: 2	SEC ID Nº: 11
(POLY) ² -gp188	SEC ID Nº: 40	SEC ID Nº: 2	SEC ID Nº: 21
(POLY) ³ -gp188	SEC ID Nº: 41	SEC ID Nº: 2	SEC ID Nº: 27
(POLY) ⁴ -gp188	SEC ID Nº: 42	SEC ID Nº: 2	SEC ID Nº: 30
pKKZ144pET32b	SEC ID Nº: 43	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 14
KRK_6_pET32b	SEC ID Nº: 44	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 10
KRK_12_pET32b	SEC ID Nº: 45	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 15
KRK_14_pET32b	SEC ID Nº: 46	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 16
R9_pET32b	SEC ID Nº: 47	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 12
K8_pET32b	SEC ID Nº: 48	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 13
pK2KZ144_pET32b_mod3	SEC ID Nº: 49	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 28
PKPSP3gp10	SEC ID Nº: 53	SEC ID Nº: 8	SEC ID Nº: 11
PKP2gp09	SEC ID Nº: 57	SEC ID Nº: 9	SEC ID Nº: 11
PKOBPgpLYS	SEC ID Nº: 61	SEC ID Nº: 7	SEC ID Nº: 11
pK2KZ144pET32b	SEC ID Nº: 62	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 22
pK3KZ144pET32b	SEC ID Nº: 63	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 27
pK4KZ144pET32b	SEC ID Nº: 64	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 30
KRK_19_pET32b	SEC ID Nº: 66	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 18
KRK_21_pET32b	SEC ID Nº: 67	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 23
KRK_25_pET32b	SEC ID Nº: 68	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 26
KRK_39_pET32b	SEC ID Nº: 69	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 29
K19_pET32b	SEC ID Nº: 70	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 20
K16_pET32b	SEC ID Nº: 71	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 17
pKKZ-144_K2_pET32b	SEC ID Nº: 72	SEC ID Nº: 1	Extremo N: SEC ID Nº: 11 Extremo C: SEC ID Nº: 21
pK2KZ144_pET32b_mod1	SEC ID Nº: 73	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 24
pK2KZ144_pET32b_mod2	SEC ID Nº: 74	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 25
smi01_KRK9	SEC ID Nº: 75	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 11
smi02_KRK9	SEC ID Nº: 76	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 11
smi03_KRK9	SEC ID Nº: 77	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 11
smi04_KRK9	SEC ID Nº: 78	SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 11

Por ejemplo, para la purificación, las variantes de endolisina modificadas de acuerdo con la presente invención y por tanto en particular las variantes de endolisina modificadas especialmente preferidas de acuerdo con las SEC ID N°: 35 a 49, 53, 61 a 64 y 66 a 78, pueden comprender adicionalmente una etiqueta. La etiqueta preferida es una etiqueta de His₆, preferentemente en el extremo C de la variante de endolisina modificada. Dicha etiqueta puede estar unida a la variante de endolisina modificada por restos de aminoácidos adicionales debido, por ejemplo, a razones de clonación. Preferentemente dicha etiqueta puede estar unida a la variante de endolisina modificada al menos por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 restos de aminoácidos adicionales. En una realización preferida la variante de endolisina modificada comprende una etiqueta de His₆ en el extremo C unida a la variante de endolisina modificada por los restos de aminoácidos adicionales lisina y glicina (Lys-Gly) o leucina y ácido glutámico (Leu-Glu).

En particular, se prefieren las variantes de endolisina modificadas, como se usan en los ejemplos como se describe a continuación. Las variantes de endolisina modificadas de acuerdo con las SEC ID N°: 35 a 42, 53, 57 y 61, como se usan en los ejemplos, comprenden una etiqueta de His₆ en el extremo C unida a la variante de endolisina modificada respectiva por los restos de aminoácidos adicionales lisina y glicina (Lys-Gly). Las variantes de endolisina modificadas de acuerdo con las SEC ID N°: 43 a 49 y 75, como se usan en los ejemplos, comprenden una etiqueta de His₆ en el extremo C unida a la variante de endolisina modificada respectiva por los restos de aminoácidos adicionales leucina y ácido glutámico (Leu-Glu).

Las proteínas de fusión se construyen uniendo al menos dos secuencias de ácido nucleico usando técnicas de clonación convencionales como describen, por ejemplo, Sambrook y col. 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Dichas proteína pueden producirse, por ejemplo, en sistemas de expresión de ADN recombinante. Dichas proteínas de fusión de acuerdo con la presente invención pueden obtenerse fusionando los ácidos nucleicos a endolisina y al tramo peptídico respectivo.

Como algunas proteínas de fusión pueden ser tóxicas después de la expresión en bacterias, o no homogéneas debido a la degradación de las proteínas, la estrategia podría ser expresar estas proteínas de fusión fusionadas o unidas a otras proteínas adicionales. Un ejemplo de estas otras proteínas adicionales es la tiorredoxina, que se demostró que mediaba la expresión de péptidos tóxicos antimicrobianos en *E. coli* (mediando la TrxA la fusión de la expresión del péptido antimicrobiano CM4 a partir de genes múltiples unidos en *Escherichia coli*. Zhou L, Zhao Z, Li B, Cai Y, Zhang S. *Protein Expr Purif.* 2009 abril; 64(2):225-230).

Para la función antimicrobiana de las proteínas de fusión puede ser necesario eliminar la proteína de fusión adicional por escisión proteolítica. Pueden necesitarse kits disponibles en el mercado, tal como el sistema de expresión de pET32 (Novagen), para modificar, por ejemplo, el extremo N de la fusión dependiendo de la proteasa usada, como a partir de MGS a AMGS (SEC ID N°: 31), en el que los restos de alanina restantes son el resultado de un sitio de escisión de enteroquinasa introducido.

En otra realización preferida de la presente invención los tramos peptídicos catiónicos de la variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención comprenden modificaciones y/o alteraciones de las secuencias de aminoácidos. Dichas alteraciones y/o modificaciones pueden comprender mutaciones tales como deleciones, inserciones y adiciones, sustituciones o combinaciones de las mismas y/o cambios químicos de los restos de aminoácidos, por ejemplo, biotiniación, acetilación, PEGgización, cambios químicos de los grupos amino-, SH- o carboxilo.

La presente invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención. Adicionalmente la presente invención se refiere a un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Dicho vector puede proporcionar la expresión constitutiva o inducible de dicha variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención.

La invención también se refiere a un procedimiento para obtener dichas variantes de endolisina modificadas a partir de un microorganismo, tal como una célula huésped adecuada modificada genéticamente que exprese dichas variantes de endolisina modificadas. Dicha célula huésped puede ser un microorganismo, tal como una bacteria o una levadura o un hongo, o una célula animal, como por ejemplo, una célula de mamífero, en particular una célula humana. En una realización de la presente invención la célula de levadura es una célula de *Pichia pastoris*. El huésped debe seleccionarse debido solo a razones biotecnológicas, por ejemplo, rendimiento, solubilidad, costes, etc., pero también ha de seleccionarse desde un punto de vista médico, por ejemplo, células de bacterias o de levaduras no patógenas, o de ser humano.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para transformar genéticamente una célula huésped adecuada para obtener la expresión de las variantes de endolisina modificadas de acuerdo con la invención en el que la célula huésped se modifica genéticamente introduciendo un material genético que codifica dichas variantes de endolisina modificadas en la célula huésped y obtener su traducción y expresión por procedimientos de modificación por ingeniería genética bien conocidos por un experto en la materia.

En el presente documento también se describe una composición, preferentemente una composición farmacéutica, que comprende una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención y/o un huésped

transformado con una molécula de ácido nucleico o un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención.

La composición puede comprender adicionalmente agentes permeabilizantes de la membrana externa de las bacterias Gram negativas tales como quelantes metálicos como por ejemplo EDTA, TRIS, ácido láctico, lactoferrina, polimixina, ácido cítrico y/u otras sustancias como describe, por ejemplo, Vaara (Agents that increase the permeability of the outer membrane. Vaara M. Microbiol Rev. sep 1992; 56(3): 395-441). También se prefieren composiciones que comprendan combinaciones de los agentes permeabilizantes mencionados anteriormente. Especialmente se prefiere una composición que comprenda aproximadamente de 10 μ M a aproximadamente 100 mM de EDTA, más preferentemente de aproximadamente 50 μ M a aproximadamente 10 mM de EDTA, más preferentemente de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 10 mM de EDTA, más preferentemente de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 2 mM de EDTA, más preferentemente de aproximadamente 0,5 mM a 1 mM de EDTA. Sin embargo, también se prefieren composiciones que comprendan de aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 0,5 mM de EDTA. También se prefiere una composición que comprenda de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 2 mM de EDTA, más preferentemente aproximadamente 1 mM de EDTA y adicionalmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mM de TRIS.

La presente invención también se refiere a una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención y/o a un huésped transformado con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención, para su uso como un medicamento.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención y/o a un huésped transformado con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención, en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de un trastorno, enfermedad o afección asociado con bacterias Gram negativas patógenas. En particular el tratamiento y/o prevención del trastorno, enfermedad o afección puede producirse por bacterias Gram negativas de grupos bacterianos, familias, géneros o especies que comprenden cepas patógenas para seres humanos o animales como *Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, especialmente *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, especialmente *K. pneumoniae*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Yersinia*), *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*, especialmente *P. aeruginosa*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Shewanella*, *Sphingomonas*, *Comamonas*), *Neisseria*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Brucella*, *Francisella*, *Bordetella*, *Legionella*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Actinobacillus*, *Gardnerella*, *Spirochaetaceae* (*Treponema* y *Borrelia*), *Leptospiraceae*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Spirillum*, *Streptobacillus*, *Bacteroidaceae* (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*), *Acinetobacter*, especialmente *A. baumannii*. Preferentemente, dicho trastorno, enfermedad o afección puede producirse por *Pseudomonas*, en particular *Pseudomonas aeruginosa* y/o *Pseudomonas putida*, *Burkholderia*, en particular *Burkholderia pseudomallei* y/o *Burkholderia solanacearum*, *Salmonella*, en particular *Salmonella typhimurium* y/o *Salmonella enteritidis*, *Acinetobacter*, en particular *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* y/o *Klebsiella*, en particular *Klebsiella pneumoniae*.

En el presente documento también se describe un medicamento que comprende una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención y/o un huésped transformado con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención.

En el presente documento también se describe un procedimiento para el tratamiento de un trastorno, enfermedad o afección en un sujeto que necesita el tratamiento y/o la prevención, cuyo procedimiento comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención y/o una cantidad eficaz de un huésped transformado con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención o una composición como se ha descrito anteriormente. El sujeto puede ser un ser humano o un animal.

Preferentemente dicho procedimiento de tratamiento puede ser para el tratamiento y/o la prevención de infecciones causadas por bacterias Gram negativas, en particular por las bacterias Gram negativas indicadas anteriormente. En particular dicho procedimiento de tratamiento puede ser para el tratamiento y/o la prevención de infecciones de la piel, de tejidos blandos, del sistema respiratorio, los pulmones, el tracto digestivo, los ojos, los oídos, los dientes, la nasofaringe, la boca, los hueso, la vagina o heridas por bacteriemia y/o endocarditis causadas por bacterias Gram negativas, en particular por las bacterias Gram negativas indicadas anteriormente.

La dosificación y la vía de administración usadas en un procedimiento de tratamiento (o profilaxis), como se ha descrito anteriormente, dependen de la enfermedad/sitio de infección específicos que vayan a tratarse. La vía de administración puede ser, por ejemplo, oral, tópica, nasofaríngea, parenteral, por inhalación, intravenosa, intramuscular, intratecal, intraespinal, endobronquial, intrapulmonar, intraósea, intracardial, intraarticular, rectal, vaginal o cualquier otra vía de administración.

Para la aplicación de una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención y/o de una cantidad eficaz de un huésped transformado con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención o de una composición como se ha descrito anteriormente, en un sitio de infección (o en un sitio expuesto a infección), puede usarse una formulación que proteja a los compuestos activos de las influencias ambientales, tales como proteasas, oxidación, respuesta inmunitaria, etc., hasta que alcance el sitio de infección. Por lo tanto, la formulación puede ser una cápsula, gragea, píldora, polvo, supositorio, emulsión, suspensión, gel, loción, crema, pomada, solución inyectable, jarabe, pulverización, inhalante o cualquier otra formulación galénica razonable desde el punto de vista médico. Preferentemente, la formulación galénica puede comprender transportadores, estabilizantes, saporíferos, tampones u otros reactivos adecuados. Por ejemplo, para la aplicación tópica la formulación puede ser una loción, crema, gel, pomada o parche, para la aplicación nasofaríngea la formulación puede ser aplicar una solución salina mediante un pulverizador nasal. Para la administración oral, en caso del tratamiento y/o prevención de un sitio de infección específico, por ejemplo, en el intestino, puede ser necesario proteger a la variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención del duro medio digestivo del tracto gastrointestinal hasta alcanzar el sitio de infección. Por tanto, como transportadores pueden usarse bacterias, que sobrevivan a las etapas iniciales de la digestión en el estómago y que secreten posteriormente en el medio intestinal una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención.

En una realización específica de la presente invención, se usa una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención y/o un huésped transformado con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención, como un medicamento para el tratamiento y/o prevención de un trastorno, enfermedad o afección causada por *Pseudomonas*, particularmente *Pseudomonas aeruginosa*, en particular afecciones intestinales, en particular en niños, infección de las meninges, por ejemplo meningitis hemorrágica, infecciones del oído medio, la piel (*Ecthyma gangraenosum*), en particular quemaduras, tracto urinario, rinitis, neumonía bacterémica, en particular cuando el paciente padece de fibrosis quística o tumores hematológicos, tales como leucemia, o pacientes con neutropenia de terapia inmunosupresora, septicemia, en particular por cateterización intravenosa o urinaria prolongada, procedimientos quirúrgicos invasivos y quemaduras graves, endocarditis, en particular cuando el paciente usa fármacos intravenosos o en un paciente con complicaciones de cirugía cardíaca, infecciones oculares muy destructivas, en particular después del uso de soluciones oftalmológicas contaminadas o quemaduras faciales graves, osteocondritis, en particular como resultado de traumatismo grave o heridas por punción a través de ropa contaminada.

En otra realización específica de la presente invención el trastorno, la enfermedad o la afección la produce *Burkholderia pseudomallei*, en particular, enfermedad de Whitmore, neumonía crónica, septicemia, en particular cuando el paciente presenta una lesión traumática en la piel.

En otra realización específica de la presente invención el trastorno, la enfermedad o la afección la produce *Salmonella thyphimurium* y *Salmonella enteritidis*, en particular, gastroenteritis aguda y procesos purulentos locales, particularmente osteomielitis, endocarditis, colecistitis y especialmente producida por *Salmonella thyphimurium meningitis*, en particular cuando el paciente es menor de dos años.

En otra realización específica de la presente invención el trastorno, la enfermedad o la afección la produce *Acinetobacter baumannii*, en particular bronquitis, neumonía, infecciones de heridas y septicemia, en particular como resultado de cateterización intravenosa.

En otra realización específica de la presente invención el trastorno, la enfermedad o la afección la produce *Escherichia coli*, en particular infecciones extraintestinales, particularmente apendicitis, colecistitis purulenta, peritonitis, meningitis purulenta e infecciones del tracto urinario, infecciones intraintestinales por *E. coli*, particularmente enteritis epidémica y enfermedades infecciosas similares a disentería, septicemia, enterotoxemia, mastitis y disentería.

En otra realización específica de la presente invención el trastorno, la enfermedad o la afección la produce *Klebsiella pneumoniae*, en particular neumonía, bacteriemia, meningitis e infecciones del tracto urinario.

Preferentemente, se usa una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención para el tratamiento médico, si la infección a tratar (o prevenir) está causada por cepas bacterianas multiresistentes, en particular por cepas resistentes contra uno o más de los siguientes antibióticos: estreptomina, tetraciclina, cefalotina, gentamicina, cefotaxime, cefalosporina, ceftazidime o imipenem. Adicionalmente, puede usarse una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención en procedimientos de tratamiento administrándola en combinación con agentes antibacterianos convencionales, tales como antibióticos, lantibióticos, bacteriocinas o endolisinas, etc.

En el presente documento también se describe un envase farmacéutico que comprende uno o más compartimentos, en el que al menos un compartimento comprende una o más variantes de endolisina modificadas de acuerdo con la presente invención y/o uno o más huéspedes transformados con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención o una

composición como se ha descrito anteriormente.

Adicionalmente, se describe un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica, comprendiendo dicho procedimiento mezclar una o más variantes de endolisina modificadas de acuerdo con la presente invención y/o uno o más huéspedes transformados con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención, con un diluyente, excipiente o transportador farmacéuticamente aceptable.

Como se ha descrito anteriormente, la composición también puede ser una composición cosmética. Diversas especies bacterianas pueden producir irritaciones en superficies corporales del paciente, como la piel, que se exponen al medioambiente. Para prevenir tales irritaciones o para eliminar apariciones menos importantes de dichos patógenos bacterianos, pueden emplearse preparaciones cosméticas especiales que comprendan cantidades suficientes de la variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención, para degradar las bacterias Gram negativas patógenas ya existentes o las recién instaladas.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a la variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención para su uso como un medio de diagnóstico en el diagnóstico médico, alimentario o alimentario para animales o ambiental, en particular como un medio de diagnóstico para el diagnóstico de infecciones bacterianas causadas, en particular, por bacterias Gram negativas. A este respecto, la variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención, puede usarse como una herramienta para degradar específicamente las bacterias patógenas, en particular bacterias patógenas Gram negativas. La degradación de las células bacterianas por la variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención, puede fortalecerse mediante la adición de detergentes como Triton X-100 u otros aditivos como polimixina B que debilitan la envoltura de las células bacterianas. La degradación celular específica es necesaria como una etapa inicial para la detección específica posterior de bacterias usando procedimientos, como PCR, hibridación de ácidos nucleicos o NASBA (Amplificación Basada en Secuencias de Ácidos Nucleicos), basados en ácidos nucleicos, procedimientos inmunológicos como IMS, inmunofluorescencia o técnicas de tipo ELISA, u otros procedimientos basados en el contenido celular de las células bacterianas, como ensayos enzimáticos que usan proteínas específicas para distintos grupos o especies bacterianas (por ejemplo, β -galactosidasa para enterobacterias, coagulasa para cepas positivas a coagulasa).

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de la variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención, para la eliminación, reducción y/o prevención de contaminación de bacterias Gram negativas de productos alimenticios, de equipos de tratamiento de alimentos, de instalaciones de tratamiento de alimentos, de superficies que se ponen en contacto con productos alimenticios, tales como estanterías y zonas de almacén de alimentos y en cualquier otra situación en la que las bacterias patógenas, patógenas facultativas u otras no deseables puedan posiblemente infectar material alimenticio, dispositivos médicos y cualquier tipo de superficies en hospitales y salas quirúrgicas.

En particular, una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención, puede usarse profilácticamente como desinfectante. Dicho desinfectante puede usarse antes o después de cirugía, o por ejemplo, durante hemodiálisis. Así mismo, bebés prematuros, personas inmunocomprometidas o sujetos que necesiten dispositivos protésicos, pueden tratarse con una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención. Dicho tratamiento puede realizarse profilácticamente o durante infección aguda. En el mismo contexto, pueden tratarse infecciones nosocomiales, especialmente por cepas resistentes a antibióticos como *Pseudomonas aeruginosa* (FQRP), especies de *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* tales como *E. coli*, especies de *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* y *Yersinia*, profilácticamente o durante fases agudas con una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, como desinfectante, también puede usarse una variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención, en combinación con otros ingredientes útiles en una solución desinfectante como detergentes, tensioactivos, disolventes, antibióticos, lantibióticos o bacteriocinas.

Para el uso de la variante de endolisina modificada de acuerdo con la presente invención, como un desinfectante, por ejemplo, en hospitales, cirugía dental, veterinaria, cocinas o baños, la variante de endolisina modificada puede prepararse en una composición en forma, por ejemplo, de un líquido, polvo, gel o ingrediente de una toallita húmeda o en un producto laminar de desinfección. Adicionalmente, dicha composición puede comprender transportadores, aditivos, agentes de dilución y/o excipientes adecuados, respectivamente, para su uso y forma respectivos, pero también agentes, como EDTA, que refuercen la actividad antimicrobiana o agentes que potencien la actividad antimicrobiana de las proteínas de fusión. También puede usarse la proteína de fusión con agentes desinfectantes habituales, como alcoholes, aldehídos, agentes oxidantes, fenólicos, compuestos de amonio cuaternario o luz UV. Para desinfectar, por ejemplo, superficies, objetos y/o dispositivos, la variante de endolisina modificada puede aplicarse sobre dichas superficies, objetos y/o dispositivos. La aplicación puede realizarse, por ejemplo, humedeciendo, mediante pulverización o vertido, cualquier medio, tal como un paño o un trapo, con la composición desinfectante. Las proteínas de fusión pueden usarse a diversas concentraciones dependiendo de la aplicación y del "tiempo de reacción" respectivos, con objeto de obtener total actividad antimicrobiana.

Otro ámbito de aplicabilidad de la presente invención será obvio a partir de la descripción detallada proporcionada en lo sucesivo en el presente documento, sin embargo, debe entenderse que, aunque la descripción detallada y los ejemplos específicos, indiquen realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan solo a modo ilustrativo, ya que, para los expertos en la materia, a partir de esta descripción detallada, serán obvios diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención. Debe entenderse que, tanto la descripción general realizada anteriormente, como la descripción detallada, que se realiza a continuación, son solo ilustrativas y explicativas y no limitativas de la invención, como se reivindica.

Los siguientes ejemplos explican la presente invención pero no se consideran limitantes. Salvo que se indique de otra manera, se usaron procedimientos biológicos moleculares convencionales, descritos, por ejemplo, por Sambrook y col., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

Ejemplo 1: Clonación, expresión y purificación de las variantes de endolisina ELgpp188 y phiKZgp 144 modificadas.

Las endolisinas, phiKZgp144, como se representa en la SEC ID N°: 1 y ELgpp188, como se representa en la SEC ID N°: 2, son endolisinas modulares originadas de los fagos Φ .KZ y EL de *Pseudomonas aeruginosa* con una unión peptidoglicano en el extremo N y un dominio catalítico en el extremo C (Briers y col., 2007).

Para la amplificación por PCR, de la fase de lectura abierta (ORF, *open reading frame*) de phiKZgp144 y ELgpp188, se aplicó, un cebador 5' convencional (para phiKZgp144: 5' ATGAAAGTATTACGCAAA 3' (SEC ID N°: 83); para ELgpp188 5' ATGAACTCCGGACGAAG 3' (SEC ID N°: 65)) y se usaron los cebadores 3' convencionales de acuerdo con la SEC ID N°: 81 y 82 (para phiKZgp144: TTTCTATGTGCTGCAAC (SEC ID N°: 81); para ELgpp188: ATACGAAATAACGTGACGA (SEC ID N°: 82)).

Para ampliar el extremo 5' de la fase de lectura abierta que codifica phiKZgp144 o ELgpp188 con un fragmento génico que codifica nueve restos (Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys - SEC ID N°: 11) cargados positivamente, se aplicó una tail PCR con un cebador 5' ampliado (para phiKZgp144: 5' ATGGGATCCAAACGCAAGAAACGTAAGAAA CGCAAAAAAGTATTACGCAAG 3' (SEC ID N°: 79); para ELgpp188: 5' ATGGGATCCAAACGCAAGAAACGTAAGAAA CGCAAAAACTCCGGACGAAG 3' (SEC ID N°: 80)) y los cebadores 3' convencionales de acuerdo con la SEC ID N°: 81 y 82. El producto de la PCR se clonó en el vector de expresión pEXP5CT/TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se incorporaron tripletes de arginina junto con tripletes de lisina para impedir el empobrecimiento de ARNt y reducir el riesgo de desplazamientos de fases (los únicos dos tripletes disponibles para lisina son AAA y AAG, lo que conduce a largos tramos de A). La inserción de casetes policatiónicos adicionales en el sitio de restricción denominado BamHI alargan la cola con restos extra catiónicos. Esta inserción crea un triplete de arginina y serina en cada sitio de unión (Figura 1). Se fusionaron hasta cuatro tramos peptídicos policatiónicos tanto a phiKZgp144 como a ELgpp188, denominados (POLY)ⁿ-gp144 o (POLY)ⁿ-gp188 (n=1, 2, 3, 4), que comprendían, respectivamente, en el extremo N, 9, 19, 29 y 39 restos de aminoácidos cargados positivamente. Por consiguiente, se expresaron las siguientes construcciones en células pLysS BL21 (λ DE3) de *E. coli* (células de crecimiento exponencial a 37 °C, inducción usando IPTG 1 mM, expresión durante 4 h a 37 °C):

Variante de endolisina modificada	SEC ID N°:	Número de restos de aminoácidos cargados positivamente
POLY-gp144	SEC ID N°: 35	9
(POLY) ² -gp144	SEC ID N°: 36	19
(POLY) ³ -gp144	SEC ID N°: 37	29
(POLY) ⁴ -gp144	SEC ID N°: 38	39
POLY-gp188	SEC ID N°: 39	9
(POLY) ² -gP188	SEC ID N°: 40	19
(POLY) ³ -gp 188	SEC ID N°: 41	29
(POLY) ⁴ -gP188	SEC ID N°: 42	39

Las variantes de endolisina modificadas POLY-gp144 (SEC ID N°: 35), (POLY)²-gp144 (SEC ID N°: 36), POLYgp188 (SEC ID N°: 39) y (POLY)²-gp188 (SEC ID N°: 40) se han usado para investigaciones posteriores. Dichas proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad con Ni²⁺ usando la etiqueta His 6x en el extremo C (Akta Fast Protein Liquid Chromatography usando columnas de Ni-NTA His-trap 1 ml). Los rendimientos totales por litro de cultivo de expresión de *E. coli* se determinaron por medición espectrofotométrica de la concentración de proteína y el volumen total de la solución de reserva purificada. La purificación de los derivados de gp188 se realizó en condiciones más rigurosas (imidazol 65 mM) en comparación con la de los derivados de gp144 (imidazol 50 mM) para garantizar una

alta pureza. Los rendimientos totales por litro de cultivo de expresión de *E. coli* se muestran en la tabla 1.

Tabla 1 - Rendimientos de purificación recombinante de derivados de endolisina por litro de cultivo de expresión de *E. coli*

Fusión	Endolisinas	
	phiKZgp144	ELgp188
POLY	2 mg	48 mg
(POLY) ²	0,5 mg	0,06 mg

5 Las soluciones de reserva purificadas tenían una pureza de ~90 %. El análisis por espectrometría de masas de las soluciones purificadas de los derivados de POLY reveló restos de la proteína subunitaria ribosomal 50S de *E. coli* L2 y uridina-516 pseudouridilato sintasa 16S de ARNr. Todos los derivados de phiKZgp144 mostraron formación multimérica que pudo convertirse a monómeros mediante la adición de β-mercaptoetanol, indicando que los enlaces entre disulfuro producen multimerización.

10 Ejemplo 2: Actividad antibacteriana de las variantes phiKZgp144 y ELgp188 modificadas.

Se diluyeron células PAO1p de *P. aeruginosa* de crecimiento exponencial (~10⁶/ml) (Pirnay JP y col. (2003), J Clin Microbiol., 41(3): 1192-1202) 100 x (la densidad final fue ~10⁶/ml) y se incubaron a temperatura ambiente con cada 10 µg de proteína no dializada (endolisinas no modificadas phiKZgp144 (SEC ID N°: 1) y ELgp 188 (SEC ID N°: 2) y variantes de endolisina modificadas POLY-gp144 (SEC ID N°: 35), (POLY)²-gp144 (SEC ID N°: 36), POLY-gp188 (SEC ID N°: 39) y (POLY)²-gp188 (SEC ID N°: 40) a una concentración final de 100 µg/ml en tampón (NaH₂PO₄-NaOH 20 mM, pH 7,4; NaCl 0,5 M; imidazol 0,5 M). Después de 1 hora, las suspensiones celulares se diluyeron en tampón PBS (10e-5, 10e-4 y 10e-3) y se sembraron en placas (medio LB convencional, se incubaron durante una noche a 37 °C). Adicionalmente, un control negativo, que contenía células en tampón PBS, se sembró en placas. Las colonias residuales se contaron después de una noche en incubación. Basándose en el recuento celular, la actividad antibacteriana se calculó como la inactivación relativa (%) (=100-(N_i/N_o)*100, siendo N_o = número de células no tratado y N_i = número de células tratadas) y en unidades logarítmicas (=log₁₀N_o/N_i) (Tabla 2). Todas las muestras se copiaron seis veces. Se representaron las medias/desviaciones típicas. Se realizó análisis estadístico usando un ensayo de la t de Student.

En comparación con el control negativo, las endolisinas no modificadas, phiKZgp144 y ELgp188, no reducen significativamente los números de células. Esta observación ilustra la eficacia de la membrana externa como una barrera para la endolisina para degradar la pared celular de las bacterias Gram negativas. En cambio, como se muestra en la Tabla 2, la incubación con las endolisinas modificadas, POLY-gp144, (POLY)²-gp144, POLY-gp188 y (POLY)²-gp188, produce una reducción significativa (α = 0,05) del número de células bacterianas (99,85 ± 0,09 % para POLY-gp144 y 98,0 ± 0,2 % para POLY-gp188). Un aumento de la longitud del tramo peptídico policatiónico tiende adicionalmente a fortalecer la actividad antibacteriana, especialmente en caso de phiKZgp 144 (en 1 hora, se consigue una reducción de hasta 99,98 ± 0,02 % o 3,7 ± 0,3 unidades logarítmicas para (POLY)²-gp144).

Además, los experimentos demostraron que las endolisinas de phiKZgp144 modificadas tenían una mayor actividad antibacteriana que las endolisinas de ELgp188 modificadas.

Tabla 2 - Efecto antibacteriano de las variantes de endolisinas phiKZgp144 y ELgp188 modificadas y no modificadas.

Células de crecimiento exponencial	Endolisinas			
	phiKZgp144		ELgp188	
	%	log	%	log
endolisina no modificada	0 ± 15	0,00 ± 0,06	10 ± 13	0,05 ± 0,06
POLY	99,85 ± 0,09	2,9 ± 0,3	98,0 ± 0,2	1,7 ± 0,1
(POLY) ²	99,98 ± 0,02	3,7 ± 0,3	98,9 ± 0,4	2,0 ± 0,2

Por tanto, el ejemplo demuestra que la adición de un tramo peptídico corto, de nueve restos catiónicos en el extremo N, a phiKZgp144 (SEC ID N°: 1) ya es suficiente para destruir en 1 hora casi el 99,9 % de las células. La poly-L-Lisina tiene también actividad antibacteriana intrínseca, aunque hasta ahora esta propiedad solo se atribuye a polímeros de al menos 20 restos (Vaara y Vaara, 1983a, 1983b). Sin embargo, la acción coordinada del tramo peptídico policatiónico y la endolisina destruye las células.

En un experimento adicional, la endolisina POLY-gp144 modificada se dializó con $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, pH 7 y se usó en lugar de la solución de proteína no dializada, como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, el nivel de inactivación aumentó adicionalmente de $2,9 \pm 0,3$ unidades logarítmicas a $3,9 \pm 0,2$ unidades logarítmicas.

5 **Ejemplo 3: Expresión de las variantes phiKZgp144 y ELgp188 modificadas en *Pichia pastoris* como huésped para la producción no tóxica recombinante.**

Se clonó la fase de lectura abierta que codifica POLY-gp144 (SEC ID N°: 35) en el vector lanzadera pPICZ α A (Invitrogen), que posteriormente se integró en el genoma de *P. pastoris* por recombinación homóloga (como indica el fabricante; células X33 de *P. pastoris*, Invitrogen). La expresión génica se indujo con metanol (1 %) en medio BMMY y el sobrenadante se analizó para determinar la presencia de actividad enzimática después de 1, 3 y 4 días. Luego se añadió una cantidad de 30 μl de sobrenadante del cultivo de expresión de *P. pastoris* a células PAO1p de *P. aeruginosa* permeabilizadas con cloroformo 270 μl (Pirnay JP y col. (2003), J Clin Microbiol., 41(3): 1192-1202) después de 1, 3 y 4 días (condición del tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ I = 120 mM pH 6,2). Posteriormente, se registró la densidad óptica espectrofotométricamente (Figura 2). Una disminución en la densidad óptica indica la secreción de una enzima muralítica por *P. pastoris*. Como control negativo, se incluyó plásmido de expresión sin células X33 de *P. pastoris*. Por tanto, la lisis del sustrato tras la adición de la muestra de sobrenadantes es una medición del éxito de la producción recombinante y secreción de POLY-gp144 (SEC ID N°: 35) por *P. pastoris*. Después de 1 día, pudo detectarse una actividad enzimática limitada. Después de tres días se observó actividad máxima y después del cuarto día no se observó aumento de actividad significativo. No se observó ningún efecto tóxico sobre la densidad celular de *P. pastoris*.

20 Durante la expresión por *P. pastoris* la señal de secreción α del vector produce secreción de la proteína recombinante al medio circundante, lo que permite una purificación simple dado que solo se secreta un número limitado de otras proteínas. Un sitio de restricción BamHI en el extremo 5' de las fases de lectura abierta permite la adición de más casetes que codifican tramos peptídicos policatiónicos adicionales.

25 **Ejemplo 4: Otras variantes phiKZgp144 de endolisina modificadas con diferentes tramos peptídicos policatiónicos**

Para ensayar y comparar el potencial de las variantes peptídicas policatiónicas de phiKZgp144 y otras endolisinas, se sintetizaron genes codificantes que tenían diferentes péptidos policatiónicos en el extremo N terminal de la proteína. La variación del tramo peptídico atañe a la longitud, composición e inserción de secuencias de unión. Por otro lado se produjeron tramos peptídicos policatiónicos que tenían extremos N múltiples en el motivo KRK. Por otro lado se produjeron tramos peptídicos policatiónicos que sólo consistían en arginina (R) o lisina (K). Adicionalmente, para potenciar la traducción de largos tramos peptídicos policatiónicos, se produjeron tramos peptídicos policatiónicos que comprendían una secuencia de unión.

35 Los productos diferentes se clonaron en el vector de expresión pET32b (Novagen, Darmstadt, Alemania). Se usó pET32b para reducir la posible toxicidad del péptido policatiónico contra el huésped *E. coli*. Durante el proceso de purificación, una proteína de fusión codificada en el vector (tiorredoxina) ocultó el péptido policatiónico y pudo eliminarse.

40 Por consiguiente, en células BL21 (DE3) de *E. coli*, se expresaron las siguientes variantes de endolisina modificadas a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica de $\text{DO}_{600 \text{ nm}}=0,6$. Después se indujo la expresión de proteína con IPTG 1 mM (concentración final) y la expresión se preformó durante cuatro horas. Después las células de *E. coli* se recogieron por centrifugación durante 20 minutos a 6.000 g y la alteración celular y purificación de proteína se realizó de acuerdo con el kit de purificación S-tag (Novagen, Darmstadt, Alemania):

Variante de endolisina modificada	Longitud del tramo peptídico	Secuencia del tramo peptídico
phiKZgp144 (SEC ID N°: 1)	0	-
pKKZ144pET32b (SEC ID N°: 43)	10	KRKKRKKRKK (SEC ID N°: 14)
KRK_6_pET32b (SEC ID N°: 44)	6	KRKKRK (SEC ID N°: 10)
KRK_12_pET32b (SEC ID N°: 45)	12	KRKKRKKRKKRKK (SEC ID N°: 15)
KRK_14_pET32b (SEC ID N°: 46)	14	KRKKRKKRKKRKKR (SEC ID N°: 16)
R9_pET32b (SEC ID N°: 47)	9	RRRRRRRRR (SEC ID N°: 12)
K8_pET32b (SEC ID N°: 48)	8	KKKKKKKK (SEC ID N°: 13)

(continuación)

Variante de endolisina modificada	Longitud del tramo peptídico	Secuencia del tramo peptídico
pK2KZ144_pET32b_mod3 (SEC ID N°: 49)	38	KRKKRKKRKRKRGSGSGKRKKRKKRKRKGS (SEC ID N°: 28)

Todas las proteínas se purificaron usando el kit de purificación de *rEK S-Tag™* (Novagen, Darmstadt, Alemania). Usando el vector pET32b, las proteínas expresadas no eran tóxicas al huésped dando como resultado altos rendimientos de proteína producida. Las soluciones de reserva purificadas mostraron una alta pureza.

Se diluyeron células PAO1p de *P. aeruginosa* de crecimiento exponencial ($\sim 10^6$ /ml) (Pirnay JP y col. (2003), J Clin Microbiol., 41(3): 1192-1202) 100 x (la densidad final fue $\sim 10^6$ /ml) y se incubaron a temperatura ambiente con cada 10 μ g de proteína no dializada como se ha indicado anteriormente a una concentración final de 100 μ g/ml en tampón (NaH₂PO₄-NaOH 20 mM, pH 7,4; NaCl 0,5 M; imidazol 0,5 M). Después de 1 hora las suspensiones celulares se diluyeron 1:100 y se sembraron en placas en LB. Adicionalmente, un control negativo se sembró en placas usando tampón (NaH₂PO₄-NaOH 20 mM pH 7,4; NaCl 0,5 M; imidazol 0,5 M). Se contaron las colonias residuales después de una noche de incubación a 37°C. Basándose en el recuento celular se calculó la actividad antibacteriana como la inactivación relativa (%) ($=100-(N_i/N_o)*100$ siendo N_o = número de células no tratadas y N_i = número de células tratadas) (Tabla 3). Todas las muestras se copiaron al menos cuatro veces.

Tabla 3: Efecto antibacteriano de las endolisinas phiKZgp144 y ELgp188 modificadas y no modificadas

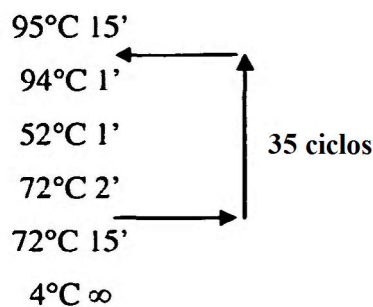
Variante de endolisina modificada	Secuencia del tramo peptídico	Reducción [%]
phiKZgp144 (SEC ID N°: 1)		0
pKKZ144pET32b (SEC ID N°: 43)	KRKKRKKRKK (SEC ID N°: 14)	99 - 99,9
KRK_6_pET32b (SEC ID N°: 44)	KRKKRK (SEC ID N°: 10)	99,9
KRK_12_pET32b (SEC ID N°: 45)	KRKKRKKRKKRK (SEC ID N°: 15)	99 - 99,9
KRK_14_pET32b (SEC ID N°: 46)	KRKKRKKRKKRKKR (SEC ID N°: 16)	99,9
R9_pET32b (SEC ID N°: 47)	RRRRRRRR (SEC ID N°: 12)	99
K8_pET32b (SEC ID N°: 48)	KKKKKKKK (SEC ID N°: 13)	99
pK2KZ144_pET32b_mod3 (SEC ID N°: 49)	KRKKRKKRKRKRGSGSGKRKKRKKRKRKGS (SEC ID N°: 28)	99,9

En comparación con el control negativo, la endolisina phiKZgp144 no modificada no reduce significativamente los números de células. Junto a esto, las variantes phiKZgp144 modificadas que llevan un péptido policatiónico de extremos N múltiples del motivo KRK potencian enormemente el efecto antimicrobiano. Sin embargo, según se mide, también las variantes que tienen un tramo peptídico homómero de lisina o arginina muestran una reducción significativa de células en comparación con la phiKZgp144 no modificada. Además, también la variante que tiene un tramo peptídico policatiónico de 38 restos de aminoácidos y que comprende una secuencia de unión potencia enormemente el efecto antimicrobiano.

Ejemplo 5: Variantes de endolisina modificadas del fago PSP3 de *Salmonella typhimurium*

De acuerdo con la SEC ID N°: 8, la endolisina PSP3gp10 es una endolisina globular con 165 restos de aminoácidos originados a partir del fago PSP3 de *Salmonella typhimurium* con un dominio muramidasa de tipo lambda catalítico. Según se predice por análisis BLASTp y Pfam la endolisina PSP3gp10 comprende su dominio catalítico en el intervalo de aproximadamente el resto de aminoácido 34 a aproximadamente el resto de aminoácido 152.

Como molde para la amplificación de la fase de lectura abierta (ORF) de la endolisina PSP3gp10, se usó el ADN genómico purificado del fago PSP3 en una reacción *PCR Hot Start Taq polimerasa* (Qiagen, Alemania) usando los siguientes parámetros PCR:



Para dicha PCR se usó un cebador en 5' convencional (5' ATGGGATCCCCGGTCATTAATACTCACCAG 3' (SEC ID N°: 50)) y un cebador en 3' convencional (5' TGCCATCACCCCGCCAGCCGTG 3' (SEC ID N°: 51)). Para ampliar el extremo 5' de la ORF que codifica la PSP3gp10 con un fragmento génico que codifica el péptido policatiónico de 9 unidades *Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys* (SEC ID N°: 11) se aplicó una tail PCR (*PCR Hot Start Taq polimerasa* con los mismos parámetros) con un cebador en 5' ampliado (5' ATGGGATCC**AAACGCAAGA**AACTAA **GAAACGCA**ACC GGTCATTAATACTCACCAG 3' (SEC ID N°: 52)) y el cebador en 3' convencional de acuerdo con la SEC ID N°: 51. Tanto el fragmento de la PCR original de la PSP3gp10 no modificada como el fragmento ampliado con PK se ligaron en el vector de expresión pEXPST/TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) siguiendo el protocolo de clonación TA del fabricante.

La expresión de recombinante de PSP3gp10 de acuerdo con la SEC ID N°: 8 y PKPSP3gp10 de acuerdo con la SEC ID N°: 53 se realizó en células pLys BL21 (λ DE3) de *E. coli* de crecimiento exponencial (Invitrogen) después de inducción con IPTG (isopropiltiogalactósido) 1 mM a 37 °C durante un periodo de 4 horas. Ambas proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad con Ni²⁺ (Akta FPLC, GE Healthcare) usando la etiqueta His 6x en el extremo C, codificado por el vector de expresión pEXPST/TOPO®. Se realizó cromatografía de afinidad con Ni²⁺ en 4 etapas posteriores, todas a temperatura ambiente:

1. Equilibrado de la columna *HP Histrap* de 1 ml (GE Healthcare) con 10 volúmenes de columna de tampón de lavado (imidazol 60 mM, NaCl 0,5 mM y NaH₂P0₄-NaOH 20 mM en pH 7,4) a un caudal de 0,5 ml/min.
2. Carga del lisado total (con la endolisina buscada) sobre la columna *HP Histrap* de 1 ml a un caudal de 0,5 ml/min.
3. Lavado de la columna con 15 volúmenes de columna de tampón de lavado a un caudal de 1 ml/min.
4. Elución de la endolisina unida de la columna con 10 volúmenes de columna de tampón de elución (imidazol 500 mM, NaCl 5 mM y NaH₂P0₄-NaOH 20 mM en pH 7,4) a un caudal de 0,5 ml/min.

En la tabla 4 se muestran los rendimientos totales de ambas proteínas recombinantes purificadas por litro de cultivo de expresión de *E. coli*. Los valores se determinaron por medición espectrofotométrica de la concentración de proteína y el volumen total de la solución de reserva purificada a una longitud de onda de 280 nm. Las soluciones de reserva purificadas que consistían en PSP3gp10 y PKPSP3gp10, respectivamente, en tampón de elución (NaH₂P0₄-NaOH 20 mM pH 7,4; NaCl 0,5 M; imidazol 500 mM) tenían al menos una pureza del 90 % según se determinó visualmente sobre geles de SDS-PAGE.

Tabla 4 - Rendimientos de endolisina PSP3gp10 recombinante purificada y su variante PKPSP3gp 10 modificada por litro de cultivo de expresión de *E. coli*.

Endolisinas	Rendimiento de expresión
PSP3gp10 (SEC ID N°: 8)	2,15 mg
PKPSP3gp10 (SEC ID N°: 53)	5,56 mg

Para determinar el espectro contra bacterias Gram negativas de la endolisina PKPSP3gp10 de acuerdo con la SEC ID N°: 53, se ensayó una combinación de endolisina PKPSP3gp10 1,315 μ M y EDTA 0,5 mM en las cepas clínicas PAO1p y Br667 de *P. aeruginosa*, WK6 de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (véase la Tabla 5). Las células bacterianas de crecimiento exponencial (DO_{600nm} de 0,6) de cada cepa se diluyeron 100 veces a una densidad final de aproximadamente 10⁶/ml, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente sin agitación con endolisina PSP2gp10 no modificada (SEC ID N°: 8) y endolisina PKPSP3gp10 modificada (SEC ID N°: 53) cada una en combinación sin y con EDTA 0,5 mM. Para la incubación, cada endolisina se usó en tampón (NaH₂P0₄-NaOH 20 mM pH 7,4; NaCl 0,5 M; imidazol 0,5 M) y la incubación se realizó a una concentración final de endolisina de 1,315 μ M. Como control cada cepa también se incubó durante 30 minutos con EDTA 0,5 mM (en el mismo tampón que el indicado anteriormente) pero sin endolisina.

Tabla 5 - Listado de cepas Gram-negativas usadas

Cepa Gram-negativa	Fuente	Referencia
PAO1p de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aislado de quemadura, Queen Astrid Hospital, Bruselas	Pirnay y col.,
Br667 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aislado de quemadura, Queen Astrid Hospital, Bruselas	Pirnay y col., 2003*
WK6 de <i>Escherichia coli</i>	Cepa de expresión de laboratorio convencional	Profesor C. Michiels
LT2 de <i>Salmonella typhimurium</i>	SGSC N°: 2317	Profesor C. Michiels

*Pirnay JP y col. (2003). Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a unit burn: persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. J Clin Microbiol. 41(3): 1192-1202

5 Después de la incubación, las suspensiones celulares se diluyeron tres veces (respectivamente 10^{-5} - 10^{-4} - 10^{-3} células/ml) y 100 µl de cada dilución se sembraron en placas en medio LB. Después de una noche de incubación a 37 °C se realizó el recuento de las colonias residuales. Basándose en el recuento de células se calculó la actividad antibacteriana como la inactivación relativa en unidades logarítmicas ($=\log_{10}N_0/N_i$ siendo N_0 = número de células no tratadas y N_i = número de células tratadas) (Tabla 6).

Tabla 6 - Actividad antibacteriana de endolisina ((PSP3gp10) no modificada y su variante de endolisina (PKPSP3gp10) modificada con y sin EDTA- Na_2 en diferentes especies Gram-negativas de crecimiento exponencial

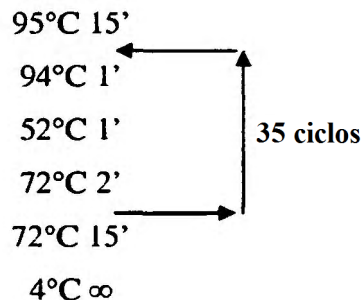
	EDTA 0,5 mM	PSP3gp10 1,315 µM	PKPSP3 gp10 1,315 µM	PSP3gp10 1,315 µM + EDTA 0,5 mM	PKPSP3gp10 1,315 µM + EDTA 0,5 mM
PAO1p de <i>P. aeruginosa</i>	0,146+/- 0,002	0,383 +/- 0,015	0,344 +/- 0,163	3,552 +/- 0,536	> 4,146
Br667 de <i>P. aeruginosa</i>	0,223 +/- 0,038	0,375 +/- 0,056	0,353 +/- 0,086	0,571 +/- 0,035	0,891 +/- 0,118
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,104 +/- 0,049	0,283 +/- 0,038	0,327 +/- 0,057	0,690 +/- 0,036	0,850 +/- 0,032
WK6 de <i>Escherichia coli</i>	0,393 +/- 0,035	0,190+/- 0,029	0,205+/- 0,088	0,387 +/- 0,014	0,584 +/- 0,024

10 Todas las muestras de copiaron tres veces. Se representan las medias +/- desviaciones típicas. La reducción máxima observada es dependiente del nivel de detección de 10 células/ml y de la densidad celular inicial. Para PAO1p, el EDTA actúa sinérgicamente tanto con la endolisina PSP3gp10 no modificada como con su variante PKPPSP3gp10 modificada

15 **Ejemplo 6: Variantes de endolisina modificadas del fago P2 de *Escherichia coli***

De acuerdo con la SEC ID N°: 9, la endolisina P2gp09 es una endolisina globular de 165 restos de aminoácidos originada a partir del fago P2 de *Escherichia coli* con un dominio muramidasa de tipo lambda catalítico. Según se predice por análisis BLASTp y Pfam la endolisina P2gp09 comprende su dominio catalítico en el intervalo de aproximadamente el resto de aminoácido 34 a aproximadamente el resto de aminoácido 152.

20 Se usó el ADN genómico purificado del fago P2 como molde para la amplificación de la fase de lectura abierta (ORF) de P2gp09 en una reacción PCR convencional con Pfu polimerasa (Fermentas) usando los siguientes parámetros PCR:



Para dicha PCR se usó un cebador en 5' convencional (5' ATGGGATCCCCGGTAATTAACACGCATC 3' (SEC ID N°: 54)) y un cebador en 3' convencional (5' AGCCGGTACGCCGCCAGCGGTACGC 3' (SEC ID N°: 55)). Para ampliar el extremo 5' de la ORF que codifica P2gp09 con un fragmento génico que codifica el péptido policatiónico de 9 unidades *Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys* (SEC ID N°: 11) se aplicó una tail PCR (con los mismos parámetros que la PCR convencional anterior) con un cebador en 5' ampliado (5' ATGGGATCCAAACGCAAGAAACGTAAGAAACGC AAACCGGTAATTAACACGCATC 3' (SEC ID N°: 56)) y el cebador en 3' convencional de acuerdo con la SEC ID N°: 55. Tanto el fragmento de la PCR de P2gp09 no modificada original como el fragmento ampliado se ligaron en el vector de expresión pEXP5CT/TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) siguiendo el protocolo de clonación TA del fabricante.

Se realizó expresión recombinante de P2gp09 de acuerdo con la SEC ID N°: 9 y de PKP2gp09 de acuerdo con la SEC ID N°: 57 en células pLysS BL21 (λ DE3) de *E. coli* de crecimiento exponencial (Invitrogen) después de inducción con IPTG 1 mM (isopropiltiogalactósido) a 37 °C durante un periodo de 4 horas. Ambas proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad con Ni²⁺ (Akta FPLC, GE Healthcare) usando la etiqueta His 6x en el extremo C, codificado por el vector de expresión pEXP5CT/TOPO®. Se realizó cromatografía de afinidad con Ni²⁺ en cuatro etapas posteriores, todas a temperatura ambiente:

1. Equilibrado de la columna *HP Histrap* de 1 ml (GE Healthcare) con 10 volúmenes de columna de tampón de lavado (imidazol 60 mM, NaCl 0,5 mM y NaH₂P0₄-NaOH 20 mM en pH 7,4) a un caudal de 0,5 ml/min.
2. Carga del lisado total (con la endolisina buscada) sobre la columna *HP Histrap* de 1 ml a un caudal de 0,5 ml/min.
3. Lavado de la columna con 15 volúmenes de columna de tampón de lavado a un caudal de 1 ml/min.
4. Elución de la endolisina unida de la columna con 10 volúmenes de columna de tampón de elución (imidazol 500 mM, NaCl 5 mM y NaH₂P0₄-NaOH 20 mM en pH 7,4) a un caudal de 0,5 ml/min.

En la Tabla 7 se muestran los rendimientos totales de ambas proteínas recombinantes purificadas por litro de cultivo de expresión de *E. coli*. Los valores se determinaron por medición espectrofotométrica de la concentración de proteína y el volumen total de la solución de reserva purificada a una longitud de onda de 280 nm. Las soluciones de reserva purificadas que consistían en P2gp09 y PKP2gp09, respectivamente, en tampón de elución (NaH₂P0₄-NaOH 20 mM pH 7,4; NaCl 0,5 M; imidazol 500 mM) tenían al menos una pureza del 90 % según se determinó visualmente en geles de SDS-PAGE.

Tabla 7 - Rendimientos de endolisina P2gp09 recombinante purificada y su derivado PKP2gp09 modificado con PK por litro de cultivo de expresión de *E. coli*.

Endolisinas	Rendimiento de expresión
P2gp09 (SEC ID N°: 9)	5,52 mg
PKP2gp09 (SEC ID N°: 57)	3,40 mg

Para determinar el espectro contra bacterias Gram negativas de la endolisina PK2gp09 de acuerdo con la SEC ID N°: 57, se ensayó una combinación de endolisina PK2gp09 1,315 μ M y EDTA 0,5 mM en las cepas clínicas PAO1p y Br667 de *P. aeruginosa* y en WK6 de *Escherichia coli* (véase Tabla 9). Las células bacterianas de crecimiento exponencial (DO_{600nm} de 0,6) de cada cepa se diluyeron 100 veces hasta una densidad final de aproximadamente 10⁶/ml, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente sin agitación con endolisina P2gp09 no modificada (SEC ID N°: 9) y endolisina PKP2gp09 modificada (SEC ID N°: 57) cada una en combinación con y sin EDTA 0,5 mM. Para la incubación, cada endolisina se usó en tampón (NaH₂P0₄-NaOH 20 mM pH 7,4; NaCl 0,5 M; imidazol 0,5 M) y la incubación se realizó a una concentración final de endolisina de 1,315 μ M. Como un control cada cepa también se incubó durante 30 minutos con EDTA 0,5 mM (en el mismo tampón que el indicado anteriormente) pero sin endolisina. Después de la incubación las suspensiones celulares se diluyeron tres veces (respectivamente 10⁵-10⁴-10³ células/ml) y 100 μ l de cada dilución se sembraron en placas en medio LB. Después de una noche de incubación a 37 °C se realizó el recuento de las colonias residuales. Basándose en el recuento celular la actividad antibacteriana se calculó como la inactivación relativa en unidades logarítmicas (=log₁₀N₀/N_i siendo N₀ = número de células no tratadas y N_i = número de células tratadas, ambas contadas después de la incubación) (Tabla 8).

Tabla 8 - Actividad antibacteriana de la endolisina (P2gp09) no modificada y su variante endolisina (P2gp09) modificada con y sin EDTA-Na₂ sobre diferentes especies Gram-negativas de crecimiento exponencial

	EDTA 0,5 mM	P2gp09 1,315 μ M	PKP2gp09 1,315 μ M	Δ	P2gp09 1,315 μ M + EDTA 0,5 mM	PKP2gp09 1,315 μ M + EDTA 0,5 mM	Δ
PAO1p de <i>P. aeruginosa</i>	0,330 +/- 0,146	0,374 +/- 0,084	0,326 +/- 0,069	0,038	2,840 +/- 0,079	3,172 +/- 0,056	0,332
Br667 de <i>P. aeruginosa</i>	0,003 +/- 0,051	0,246 +/- 0,042	0,300 +/- 0,062	0,054	0,582 +/- 0,074	0,952 +/- 0,213	0,370

(continuación)

	EDTA 0,5 mM	P2gp09 1,315 µM	PKP2gp09 1,315 µM	Δ	P2gp09 1,315 µM + EDTA 0,5 mM	PKP2gp09 1,315 µM + EDTA 0,5 mM	Δ
G1 de <i>P. putida</i>	0,072 +/- 0,084	0,419 +/- 0,024	1,014 +/- 0,139	0,595	3,919 +/- 0,118	> 4,386	>0,467
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	0,206 +/- 0,151	0,769 +/- 0,110	1,163 +/- 0,073	0,394	3,890 +/- 0,056	4,255 +/- 0,001	0,365
WK6 de <i>Escherichia coli</i>	0,153 +/- 0,046	0,751 +/- 0,053	1,104 +/- 0,039	0,353	0,784 +/- 0,071	1,545 +/- - 0,102	0,749

Todas las muestras de copiaron tres veces. Se representan las medias +/- desviaciones típicas. La reducción máxima observada es dependiente del nivel de detección de 10 células/ml y de la densidad celular inicial.

5 **Tabla 9 - Listado de cepas Gram-negativas usadas**

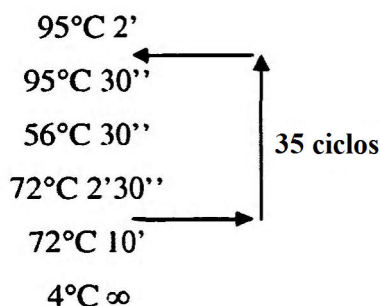
Cepa Gram-negativa	Fuente	Referencia
PAO1p de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aislado de quemadura, Queen Astrid Hospital, Bruselas	Pirnay y col.,
Br667 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aislado de quemadura, Queen Astrid Hospital, Bruselas	Pirnay y col., 2003*
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Aislado clínico UZ Gasthuisberg, Leuven	Profesor J. Verhaegen
WK6 de <i>Escherichia coli</i>	Cepa de expresión de laboratorio convencional	Profesor C. Michiels
G1 de <i>Pseudomonas putida</i>	Aislado de suelo, Moscú	Profesor V.Krylov

*Pirnay JP y col. (2003). Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a unit burn: persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. J Clin Microbiol. 41(3): 1192-1202.

Ejemplo 7: Variantes de endolisina modificadas del fago OBP de *Pseudomonas putida*

10 La endolisina OBPgpLYS de acuerdo con la SEC ID N°: 7 es una endolisina modular de 328 restos de aminoácidos originada a partir del fago OBP de *Pseudomonas putida* con un supuesto dominio de unión a péptidoglicano en el extremo N y un dominio quitinasa catalítico en el extremo C. Según se predice por análisis BLASTp y Pfam la endolisina OBPgpLYS comprende su dominio catalítico en el intervalo de aproximadamente el resto de aminoácido 126 a aproximadamente el resto de aminoácido 292 y el dominio de unión a péptidoglicano en el extremo N en el intervalo de aproximadamente el resto de aminoácido 7 al 96.

15 Como molde para la amplificación de la fase de lectura abierta (ORF) de la endolisina OBPgpLYS se usó ADN genómico purificado del fago OBP en una reacción PCR convencional con *Pfu polimerasa* (Fermentas, Ontario, Canadá) usando los siguientes parámetros PCR:



20 Por lo tanto se usó un cebador en 5' convencional (5' ATGAAAAATAGCGAGAAGAAT 3' (SEC ID N°: 58)) y un cebador en 3' convencional (5' AACTATTCCGAGTGCTTTCTTTGT 3' (SEC ID N°: 59)). Para ampliar el extremo 5' de la ORF que codifica la OBPgpLYS con un fragmento génico que codifica el péptido policatiónico de 9 unidades *Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys* (SEC ID N°: 11) se aplicó una tail PCR (con los mismos parámetros que los de la PCR convencional anterior) con un cebador 5' ampliado (5' ATGGGATCCAAACGCAAGAAACGTAAGAAACGCAAAAAAATAGCGAG AAGAAT 3' (SEC ID N°: 60)) y el cebador en 3' convencional de acuerdo con la SEC ID N°: 59. Tanto el fragmento de la PCR original de OBPgpLYS no modificada como el fragmento ampliado se ligaron en el vector de expresión pEXPSCT/TOPO® (Invitrogen,

25

Carlsbad, CA, Estados Unidos) siguiendo el protocolo de clonación TA del fabricante.

Se realizó la expresión recombinante de OBPgpLYS de acuerdo con la SEC ID N°: 7 y PKOBPgpLYS de acuerdo con la SEC ID N°: 61 en células pLysS BL21 (λ DE3) de *E. coli* (Invitrogen) de crecimiento exponencial (Invitrogen) después de inducción con IPTG 1 mM (isopropiltiogalactósido) a 37 °C durante un periodo de 4 horas. Ambas proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad con Ni²⁺ (Akta FPLC, GE Healthcare) usando la etiqueta His 6x en el extremo C, codificado por el vector de expresión pEXPSCT/TOPO®. Se realizó la cromatografía de afinidad con Ni²⁺ en cuatro etapas posteriores, todas a temperatura ambiente:

1. Equilibrado de la columna *HP Histrap* de 1 ml (GE Healthcare) con 10 volúmenes de columna de tampón de lavado (imidazol 60 mM, NaCl 0,5 mM y NaH₂P0₄-NaOH 20 mM en pH 7,4) a un caudal de 0,5 ml/min.
2. Carga del lisado total (con la endolisina buscada) sobre la columna *HP Histrap* de 1 ml a un caudal de 0,5 ml/min.
3. Lavado de la columna con 15 volúmenes de columna de tampón de lavado a un caudal de 1 ml/min.
4. Elución de la endolisina unida de la columna con 10 volúmenes de columna de tampón de elución (imidazol 500 mM, NaCl 5 mM y NaH₂P0₄-NaOH 20 mM en pH 7,4) a un caudal de 0,5 ml/min.

En la Tabla 10 se muestran los rendimientos totales de ambas proteínas recombinantes purificadas por litro de cultivo de expresión de *E. coli*. Los valores se determinaron por medición espectrofotométrica de la concentración de proteína y el volumen total de la solución de la solución de reserva purificada a una longitud de onda de 280 nm. Las soluciones de reserva purificadas que consistían en OBPgpLYS y PKOBPgpLYS, respectivamente, en tampón de elución (NaH₂P0₄-NaOH 20 mM pH 7,4; NaCl 0,5 M; imidazol 500 mM) tenían al menos una pureza del 90 % según se determina visualmente sobre geles de SDS-PAGE.

Tabla 10 - Rendimientos de la endolisina OBPgpLYS recombinante purificada y su derivado PKOBPgpLYS modificado con PK por litro de cultivo de expresión de *E. coli*.

Endolisinas	Rendimiento de expresión
OBPgpLYS (SEC ID N°: 7)	3,3 mg
PKOBPgpLYS (SEC ID N°: 61)	4,7 mg

Para determinar el espectro contra bacterias Gram negativas de la endolisina PKOBPgpLYS de acuerdo con la SEC ID N°: 61 se ensayó una combinación de endolisina PK OBPgpLYS de 1,315 μ M y EDTA 0,5 mM en la cepa clínica multiresistente Br667 de *P. aeruginosa*, G1 de *Pseudomonas putida* (hospedador del fago OBP) y una serie de otros patógenos Gram-negativos (WK6 de *Escherichia coli*, LT2 de *Salmonella typhimurium* y *Burkholderia pseudomallei*) (véase la Tabla 12). Las células bacterianas de cada cepa de crecimiento exponencial (DO_{600nm} de 0,6) se diluyeron 100 veces hasta una densidad final de aproximadamente 10⁶/ml, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente sin agitación con la endolisina OBPgpLYS no modificada (SEC ID N°: 7) y la endolisina PKOBPgpLYS modificada (SEC ID N°: 61) cada una en combinación con y sin EDTA 0,5 mM. Para la incubación, cada endolisina se usó en tampón (NaH₂P0₄-NaOH 20 mM pH 7,4; NaCl 0,5 M; imidazol 0,5 M) y la incubación se realizó a una concentración final de endolisina de 1,315 μ M. Como control, cada cepa también se incubó durante 30 minutos con EDTA 0,5 mM (en el mismo tampón que el indicado anteriormente) pero sin endolisina. Después de la incubación, las suspensiones celulares se diluyeron tres veces (respectivamente 10⁵-10⁴-10³ células/ml) y 100 μ l de cada dilución se sembraron en placas en medio LB. Después de una noche de incubación a 37 °C se realizó el recuento de las colonias residuales. Basándose en el recuento celular se calculó la actividad antibacteriana como la inactivación relativa en unidades logarítmicas (=log₁₀N₀/N_i siendo N₀ = número de células no tratadas y N_i = número de células tratadas ambas contadas después de la incubación) (Tabla 11). Todas las muestras se copiaron tres veces. Se representan las medias +/- desviaciones típicas. La reducción máxima observada es dependiente del nivel de detección de 10 células/ml y de la densidad celular inicial.

Tabla 11 - Actividad antibacteriana de la endolisina (OBPgpLYS) no modificada y su variante endolisina (PKOBPgpLYS) modificada con y sin EDTA-Na₂ en diferentes especies Gram-negativas de crecimiento exponencial

	EDTA 0,5 mM	OBPgpLYS 1,313 μ M	PKOBPgp LYS 1,313 μ M	OBPgpLYS 1,313 μ M + EDTA 0,5 mM	PKOBPgpLY 1,313 μ M S + EDTA 0,5 mM
PAO1p de <i>P. aeruginosa</i>	0,130 +/- 0,023	2,531 +/- 0,173	3,079 +/- 0,015	4,357 +/- 1,857	> 5,687
Br667 de <i>P. aeruginosa</i>	0,031 +/- 0,023	1,082 +/- 0,083	1,163 +/- 0,063	3,144 +/- 0,223	5,272 +/- 0,573
G1 de <i>P. putida</i>	0,412 +/- 0,055	0,141 +/- 0,027	0,904 +/- 0,079	4,891 +/- 0,000	> 4,891
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	0,220 +/- 0,081	0,997 +/- 0,131	1,806 +/- 0,287	4,08 +/- 0,301	> 4,861
WK6 de <i>Escherichia coli</i>	0,592 +/- 0,113	0,681 +/- 0,032	1,434 +/- 0,018	1,179 +/- 0,200	1,695 +/- 0,147

(continuación)

	EDTA 0,5 mM	OBPgpLYS 1,313 μ M	PKOBPgp LYS 1,313 μ M	OBPgpLYS 1,313 μ M + EDTA 0,5 mM	PKOBPgpLY 1,313 μ M S + EDTA 0,5 mM
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,054 +/- 0,048	0,076 +/- 0,011	0,127 +/- 0,013	0,774 +/- 0,052	0,908 +/-0,037

Tabla 12 - Listado de cepas Gram-negativas usadas

Cepa Gram-negativa	Fuente	Referencia
PAO1p de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aislado de quemadura, Queen Astrid Hospital, Bruselas	Pirnay y col., 2003*
Br667 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aislado de quemadura, Queen Astrid Hospital, Bruselas	Pirnay y col., 2003*
G1 de <i>Pseudomonas putida</i>	Aislado de suelo, Moscú	Profesor V.Krylov
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Aislado clínico UZ Gasthuisberg, Leuven	Profesor J. Verhaegen
WK6 de <i>Escherichia coli</i>	Cepa de expresión de laboratorio convencional	Stratagene
LT2 de <i>Salmonella typhimurium</i>	SGSC N° 2317	Profesor C. Michiels

*Pirnay JP y col. (2003). Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a unit burn: persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. J Clin Microbiol. 41(3): 1192-1202

- 5 Aunque la eficacia global del tratamiento con OBPgpLYS es dependiente de la especie, los resultados en la Tabla 11 muestran un efecto añadido de PKOBPgpLYS en comparación con OBPgpLYS no modificada para todas las especies bacterianas ensayadas, tanto en ausencia como en presencia de EDTA 0,5 mM. Para las especies de *Pseudomonas* y *Burkholderia*, se observó un claro efecto sinérgico con EDTA para la actividad de PKOBPgpLYS.

10 Ejemplo 8: Efecto de diferentes concentraciones del EDTA sobre la actividad bacteriana de OBPgpLYS y PKOBPgpLYS

Para determinar la influencia del EDTA sobre la actividad antibacteriana de las endolisinas no modificadas y modificadas se ensayó la actividad antibacteriana de la endolisina OBPgpLYS no modificada (SEC ID N°: 7) y la de la endolisina PKOBPgpLYS modificada (SEC ID N°: 61) en células PAO1p de *Pseudomonas aeruginosa* (Pirnay JP y col., J Clin Microbiol., 41(3):1192-1202 (2003)) usando diferentes concentraciones de EDTA y endolisinas. Células bacterianas de crecimiento exponencial (DO_{600nm} de 0,6) se diluyeron 100 veces a una densidad final de aproximadamente 10^6 /ml y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente sin agitación con la endolisina OBPgpLYS no modificada (SEC ID N°: 7) y la endolisina PKOBPgpLYS modificada (SEC ID N°: 61). Para la incubación, cada endolisina se usó en tampón (NaH_2PO_4 -NaOH 20 mM, pH 7,4; NaCl 0,5 M; imidazol 0,5 M) a concentraciones finales de endolisina de 0,013 μ M, 0,131 μ M y 1,315 μ M. Por lo cual, se usaron las siguientes concentraciones diferentes de EDTA: 0 mM, 0,05 mM, 0,5 mM y 10 mM. Como control, también se incubó una muestra sin endolisina durante 30 minutos, añadida a un tampón (NaH_2PO_4 -NaOH 20 mM, pH 7,4; NaCl 0,5 M; imidazol 0,5 M) añadido. Después de la incubación las suspensiones celulares se diluyeron tres veces (respectivamente 10^5 - 10^4 - 10^3 células/ml) y 100 μ l de cada dilución se sembraron en placas en medio LB. Después de una noche de incubación a 37 °C, se realizó el recuento de las colonias residuales. Basándose en el recuento de células la actividad antibacteriana se calculó como la inactivación relativa en unidades logarítmicas ($= \log_{10} N_0/N_t$ siendo N_0 = número de células no tratadas y N_t = número de células tratadas, realizándose ambos recuentos después de la incubación) (Tabla 13). Todas las muestras se repitieron tres veces. Se representan las medias +/- desviaciones típicas. La reducción máxima observada (5,69 unidades logarítmicas) es dependiente del nivel de detección de 10 células/ml y de la densidad celular inicial. El símbolo "Δ" proporciona la diferencia de actividad entre las muestras OBPgpLYS y PKOBPgpLYS respectivas.

Tabla 13 - Actividad antibacteriana de la endolisina (OBPgpLYS) no modificada y su variante de endolisina (PKOBPGPLYS) modificada en combinación con diferentes concentraciones de EDTA en crecimiento exponencial de células PAO1p de *Pseudomonas aeruginosa*

	Concentración de EDTA- Na_2 (en mM)			
	0	0,05	0,5	10
Sin endolisina	/	0,028 +/-0,008	0,130 +/-0,023	1,827 +/-0,052
OBPgpLYS 0,013 μ M	0,956 +/-0,110	/	4,626 +/-0,287	/
PKOBPGPLYS 0,013 μ M	0,992 +/-0,181	/	5,204 +/-0,000:	/

(continuación)

	Concentración de EDTA-Na ₂ (en mM)			
	0	0,05	0,5	10
Δ	0,036		0,578	
OBPgpLYS 0,131 μM	2,158 +/-0,027	/	4,599 +/-0,275	/
PKOBPgpLYS 0,131 μM	2,529 +/-0,184	/	5,671 +/-0,000	/
Δ	0,371		1,072	
OBPgpLYS 1.315 μM	2,531 +/-0,173	2,762 +/-0,091	4,357 +/-1857	4,888 +/-0,275
PKOBPgpLYS 1.315 μM	3,079 +/-0,015	4,145 +/-0,015	> 5,687	> 5,687
Δ	0,548	1,383	> 1,330	> 0,799

Como se muestra en la Tabla 13, en comparación con el control negativo, la endolisina OBPgpLYS no modificada, reduce significativamente el número de células con más de 2,5 unidades logarítmicas para 1,315 μM y con +/- 1 unidad logarítmica para 0,013 μM. La endolisina PKOBPgpLYS modificada da como resultado una reducción añadida de 0,5 unidades logarítmicas para células PAO1p de crecimiento exponencial. El efecto antibacteriano observado puede aumentarse a más de una reducción de 5,69 unidades logarítmicas (por debajo del nivel de detección) combinando PKOBPgpLYS con el EDTA-Na₂ permeabilizador de la membrana externa a una concentración de 0,5 y 10 mM de EDTA. La diferencia en cuanto a la actividad entre la OBPgpLYS no modificada y la OBPgpLYS modificada con PK aumenta elevando la cantidad de endolisina añadida (de 0,013 – 1,315 μM de endolisina).

Ejemplo 9: Actividad antibacteriana con variantes phiKZgp144 modificadas en diferentes bacterias Gram-negativas

Para ensayar y comparar el potencial de las variantes peptídicas policatiónicas de phiKZgp144 y otras endolisinas, se sintetizaron genes codificantes que tenían péptidos policationicos el extremo N-terminal de la proteína.

Los productos diferentes se clonaron en el vector de expresión pET32b (Novagen, Darmstadt, Alemania). Se usó pET32b para reducir la posible toxicidad del péptido policationico contra el huésped *E. coli*. Durante el proceso de purificación, una proteína de fusión codificada en el vector (tiorredoxina) ocultó el péptido policationico y pudo eliminarse.

Los genes que codifican smi01 (YP_001712536) y KRK9_smi01 (SEC ID N°: 75) se sintetizaron por completo (Entelechon, Regensburg, Alemania) y se clonaron en pET32b.

Por consiguiente, se expresaron las siguientes variantes de endolisina modificadas en células BL21 (DE3) de *E. coli* a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica de DO600 nm = 0,6: smi01 (YP_001712536), KRK9_smi01 (SEC ID N°: 75), phiKZgp144 (SEC ID N°: 1), pKKZ144pET32b (SEC ID N°: 43) y POLYKZ144 (SEC ID N°: 35). La expresión de proteína se indujo con IPTG 1 mM (concentración final) y la expresión se realizó durante cuatro horas. Después, las células de *E. coli* se recogieron mediante centrifugación durante 20 minutos a 6000 g y, usando el kit de purificación rEK de S-Tag™ (Novagen, Darmstadt, Alemania), se realizó la alteración celular y la purificación de proteína. Usando el vector pET32b, las proteínas expresadas no fueron tóxicas para el huésped dando como resultado altos rendimientos de proteína purificada. Las soluciones de reserva purificadas mostraron una alta pureza.

Para ensayar, y como referencia para comparación, phiKZgp144 y POLYgp144 se sintetizaron y se purificaron como se describe en el EJEMPLO 1.

Células de crecimiento exponencial (~ 10⁶/ml) PAO1p de *P. aeruginosa* (aislado de quemadura, Queen Astrid Hospital, Bruselas; Pirnay JP y col., (2003), J Clin Microbiol., 41(3):1192-1202), *Acinetobacter baumannii* (DSMZ 30007) o *Burkholderia solanaceum* (aislado proporcionado por el Profesor C. Michiels) se diluyeron 100 x (la densidad final fue de ~ 10⁶/ml), se incubaron a temperatura ambiente cada una con 10 μg de proteína no dializada, como se ha indicado anteriormente, a una concentración final de 100 μg/ml en tampón (NaH₂PO₄-NaOH 20 mM, pH 7,4; NaCl 0,5 M; imidazol 0,5 M). Después de una hora las suspensiones celulares se diluyeron 1:100 y se sembraron en placas en LB. Adicionalmente, usando tampón (NaH₂PO₄-NaOH 20 mM, pH 7,4; NaCl 0,5 M; imidazol 0,5 M) un control negativo se sembró en placas. Después de una noche de incubación a 37 °C se realizó el recuento de las colonias residuales. Basándose en el recuento celular la actividad antibacteriana se calculó como la inactivación relativa (%) (= 100-(Ni/No)* 100 siendo No = número de células no tratadas y Ni = número de células tratadas) (Tabla 3). Todas las muestras se copiaron al menos cuatro veces.

Tabla 14 – Efecto antibacteriano de diferentes variantes de endolisina modificadas (números NCBI entre paréntesis) en diferentes especies bacterianas

Proteína	Especie bacteriana	Reducción [%]
smi01 (YP_00172536)	<i>Acinetobacter baumannii</i> DSMZ 30007	0
KRK9_smi01	<i>Acinetobacter baumannii</i> DSMZ 30007	50
phiKZgp144	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0
pKKZ144pET32b	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99-99,9
phiKZgp144	<i>Acinetobacter baumannii</i> DSMZ 30007	0
pKKZ144pET32b	<i>Acinetobacter baumannii</i> DSMZ 30007	99,9
phiKZgp144	<i>Burkholderia solanacearum</i>	0
POLYKZ144	<i>Burkholderia solanacearum</i>	99-99,9

5 En comparación con el control negativo las endolisinas phiKZgp144 y smi01 (YP_001712536) no modificadas no redujeron significativamente los números celulares. Esta observación de nuevo ilustra la eficacia de la membrana externa como una barrera para la endolisina para degradar la pared celular de las bacterias Gram-negativas. A diferencia de lo que se muestra en la Tabla 14 la incubación con las endolisinas KRK9_smi01, pKKZ144pET32b y POLY-gp144 no modificadas produce una reducción significativa sobre el número celular bacteriano en 10 *Acinetobacter baumannii* (50 % para KRK_smi01; 99,9 % para pKKZ144pET32b), *Pseudomonas aeruginosa* (90-99,9 % para pKKZ144pET32b) y *Burkholderia solanaceum* (90-99,9 % para POLYKZ144).

Estos experimentos demuestran la aplicabilidad de la estrategia de fusión catiónica/policitónica para otras endolisinas. Además, los experimentos demuestran que las endolisinas modificadas son activas en una diversidad de bacterias.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> Katholieke Universiteit Leuven
- <120> Agentes antimicrobianos
- <130> TGI-001 PCT
- 20 <150> GB 0815484.1
- <151> 25-08-2008
- <160> 83
- 25 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 260
- 30 <212> PRT
- <213> desconocido
- <220>
- <223> phiKZgp144
- 35 <400> 1

ES 2 395 357 T3

Met Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly
 20 25 30

Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp
 35 40 45

Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu
 50 55 60

Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met
 65 70 75 80

Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala
 85 90 95

Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala
 100 105 110

Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser
 115 120 125

Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile
 130 135 140

Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile
 165 170 175

Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr
 180 185 190

Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg
 195 200 205

Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro
 210 215 220

Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser
 225 230 235 240

Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala
 245 250 255

Ala His Arg Lys
 260

ES 2 395 357 T3

<210> 2
 <211> 292
 <212> PRT
 <213> desconocido

5

<220>
 <223> ELgp188

10

```

Met Asn Phe Arg Thr Lys Asn Gly Tyr Arg Asp Leu Gln Ala Leu Val
 1          5          10          15

Lys Glu Leu Gly Leu Tyr Thr Gly Gln Ile Asp Gly Val Trp Gly Lys
 20          25          30

Gly Thr Ser Ser Ser Thr Glu Thr Leu Leu Arg Gly Tyr Ala Glu Val
 35          40          45

Val Gly Lys Asn Thr Gly Gly Ile Gly Leu Pro Thr Thr Ser Asp Ala
 50          55          60

Ser Gly Tyr Asn Val Ile Thr Ala Leu Gln Arg Asn Leu Ala Phe Leu
 65          70          75          80

Gly Leu Tyr Ser Leu Thr Val Asp Gly Ile Trp Gly Asn Gly Thr Leu
 85          90          95

Ser Gly Leu Asp Lys Ala Phe Glu Val Tyr Lys Glu Arg Tyr Arg Thr
 100         105         110
    
```

ES 2 395 357 T3

Pro Thr Tyr Asp Ile Ala Trp Ser Gly Lys Val Ser Pro Ala Phe Thr
115 120 125

Ala Lys Val Lys Asp Trp Cys Gly Val His Val Pro Asn His Arg Ala
130 135 140

Pro His Trp Leu Met Ala Cys Met Ala Phe Glu Thr Gly Gln Thr Phe
145 150 155 160

Ser Pro Ser Ile Lys Asn Ala Ala Gly Ser Glu Ala Tyr Gly Leu Ile
165 170 175

Gln Phe Met Ser Pro Ala Ala Asn Asp Leu Asn Val Pro Leu Ser Val
180 185 190

Ile Arg Ser Met Asp Gln Leu Thr Gln Leu Asp Leu Val Phe Lys Tyr
195 200 205

Phe Glu Met Trp Met Lys Arg Gly Lys Arg Tyr Thr Gln Leu Glu Asp
210 215 220

Phe Tyr Leu Thr Ile Phe His Pro Ala Ser Val Gly Lys Lys Ala Asp
225 230 235 240

Glu Val Leu Phe Leu Gln Gly Ser Lys Ala Tyr Leu Gln Asn Lys Gly
245 250 255

Phe Asp Val Asp Lys Asp Gly Lys Ile Thr Leu Gly Glu Ile Ser Ser
260 265 270

Thr Leu Tyr Thr Thr Tyr Tyr Lys Gly Leu Leu Pro Glu Asn Arg His
275 280 285

Val Ile Ser Tyr
290

<210> 3
<211> 181
<212> PRT
<213> desconocido

<220>
<223> Endolisina de *Salmonella*

<400> 3

Met Lys Pro Lys Asp Glu Ile Phe Asp Glu Ile Leu Gly Lys Glu Gly
1 5 10 15

Gly Tyr Val Asn His Pro Asp Asp Lys Gly Gly Pro Thr Lys Trp Gly
20 25 30

5

10

ES 2 395 357 T3

Ile Thr Glu Lys Val Ala Arg Ala His Gly Tyr Arg Gly Asp Met Arg
 35 40 45

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

Tyr Gly Pro Arg Phe Asp Arg Val Ala Lys Ala Ser Pro Asp Val Ala
 65 70 75 80

Ala Glu Leu Cys Asp Thr Gly Val Asn Met Gly Pro Ser Val Ala Ala
 85 90 95

Lys Met Leu Gln Arg Trp Leu Asn Val Phe Asn Gln Gly Gly Arg Leu
 100 105 110

Tyr Pro Asp Met Asp Thr Asp Gly Arg Ile Gly Pro Arg Thr Leu Asn
 115 120 125

Ala Leu Arg Val Tyr Leu Glu Lys Arg Gly Lys Asp Gly Glu Arg Val
 130 135 140

Leu Leu Val Ala Leu Asn Cys Thr Gln Gly Glu Arg Tyr Leu Glu Leu
 145 150 155 160

Ala Glu Lys Arg Glu Ala Asp Glu Ser Phe Val Tyr Gly Trp Met Lys
 165 170 175

Glu Arg Val Leu Ile
 180

5 <210> 4
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> desconocido

10 <220>
 <223> Endolisina del fago T4 de Enterobacterias
 <400> 4

Met Asn Ile Phe Glu Met Leu Arg Ile Asp Glu Gly Leu Arg Leu Lys
 1 5 10 15

Ile Tyr Lys Asp Thr Glu Gly Tyr Tyr Thr Ile Gly Ile Gly His Leu
 20 25 30

Leu Thr Lys Ser Pro Ser Leu Asn Ala Ala Lys Ser Glu Leu Asp Lys
 35 40 45

Ala Ile Gly Arg Asn Cys Asn Gly Val Ile Thr Lys Asp Glu Ala Glu

Pro Glu Leu Val Ile Arg Val Phe Gly Ala Val Glu Gly Leu Gly Val
 100 105 110
 Gly Phe Leu Pro Asn Gly Lys Ala Lys Ile Leu Phe Glu Arg His Arg
 115 120 125
 Met Tyr Phe Tyr Leu Cys Gln Ala Leu Gly Lys Thr Phe Ala Asn Ser
 130 135 140
 Gln Val Lys Ile Thr Pro Asn Ile Val Asn Thr Leu Thr Gly Gly Tyr
 145 150 155 160
 Lys Gly Asp Ala Ala Glu Tyr Thr Arg Leu Ser Met Ala Ile Asn Ile
 165 170 175
 His Lys Glu Ser Ala Leu Met Ser Thr Ser Trp Gly Gln Phe Gln Ile
 180 185 190
 Met Gly Glu Asn Trp Lys Asp Leu Gly Tyr Ser Ser Val Gln Glu Phe
 195 200 205
 Val Asp Gln Gln Gln Leu Asn Glu Gly Asn Gln Leu Glu Ala Phe Ile
 210 215 220
 Arg Phe Ile Glu Trp Lys Pro Gly Leu Leu Glu Ala Leu Arg Lys Gln
 225 230 235 240
 Asp Trp Asp Thr Val Phe Thr Leu Tyr Asn Gly Lys Asn Tyr Lys Lys
 245 250 255
 Leu Gly Tyr Gln Ala Lys Phe Gln Lys Glu Trp Asp His Leu Glu Pro
 260 265 270
 Ile Tyr Arg Glu Lys Thr Ala Ala
 275 280

<210> 6
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> desconocido

<220>
 <223> endolisina de K1F de *E. coli*

<400> 6

Met Val Ser Lys Val Gln Phe Asn Pro Arg Ser Arg Thr Asp Ala Ile
 1 5 10 15
 Phe Val His Cys Ser Ala Thr Lys Pro Glu Met Asp Ile Gly Val Glu
 20 25 30

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

5

<210> 7
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> desconocido

10

<220>
 <223> OBPgpLYS
 <400> 7

Met Lys Asn Ser Glu Lys Asn Ala Ser Ile Ile Met Ser Ile Gln Arg
 1 5 10 15
 Thr Leu Ala Ser Leu Ser Leu Tyr Gly Gly Arg Ile Asp Gly Leu Phe
 20 25 30
 Gly Glu Lys Cys Arg Gly Ala Ile Ile Leu Met Leu Asn Lys Val Tyr
 35 40 45
 Pro Asn Phe Ser Thr Asn Lys Leu Pro Ser Asn Thr Tyr Glu Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Phe Thr Phe Leu Gln Thr Ala Leu Ala Gly Val Gly Leu Tyr
 65 70 75 80
 Thr Ile Thr Ile Asp Gly Lys Trp Gly Gly Thr Ser Gln Gly Ala Ile
 85 90 95

ES 2 395 357 T3

Asp Ala Leu Val Lys Ser Tyr Arg Gln Ile Thr Glu Ala Glu Arg Ala
 100 105 110
 Gly Ser Thr Leu Pro Leu Gly Leu Ala Thr Val Met Ser Lys His Met
 115 120 125
 Ser Ile Glu Gln Leu Arg Ala Met Leu Pro Thr Asp Arg Gln Gly Tyr
 130 135 140
 Ala Glu Val Tyr Ile Asp Pro Leu Asn Glu Thr Met Asp Ile Phe Glu
 145 150 155 160
 Ile Asn Thr Pro Leu Arg Ile Ala His Phe Met Ala Gln Ile Leu His
 165 170 175
 Glu Thr Ala Cys Phe Lys Tyr Thr Glu Glu Leu Ala Ser Gly Lys Ala
 180 185 190
 Tyr Glu Gly Arg Ala Asp Leu Gly Asn Thr Arg Pro Gly Asp Gly Pro
 195 200 205
 Leu Phe Lys Gly Arg Gly Leu Leu Gln Ile Thr Gly Arg Leu Asn Tyr
 210 215 220
 Val Lys Cys Gln Val Tyr Leu Arg Glu Lys Leu Lys Asp Pro Thr Phe
 225 230 235 240
 Asp Ile Thr Ser Ser Val Thr Cys Ala Gln Gln Leu Ser Glu Ser Pro
 245 250 255
 Leu Leu Ala Ala Leu Ala Ser Gly Tyr Phe Trp Arg Phe Ile Lys Pro
 260 265 270
 Lys Leu Asn Glu Thr Ala Asp Lys Asp Asp Ile Tyr Trp Val Ser Val
 275 280 285
 Tyr Val Asn Gly Tyr Ala Lys Gln Ala Asn Pro Tyr Tyr Pro Asn Arg
 290 295 300
 Asp Lys Glu Pro Asn His Met Lys Glu Arg Val Gln Met Leu Ala Val
 305 310 315 320
 Thr Lys Lys Ala Leu Gly Ile Val
 325

<210> 8
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> desconocido

<220>
 <223> PSP3gp10

5

10

ES 2 395 357 T3

<400> 8

Met Pro Val Ile Asn Thr His Gln Asn Ile Ala Ala Phe Leu Asp Met
 1 5 10 15

Leu Ala Tyr Ser Glu Gly Thr Ala Asn His Pro Leu Thr Lys Asn Arg
 20 25 30

Gly Tyr Asp Val Ile Val Thr Gly Phe Asp Gly Ser Pro Glu Ile Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Ser Asp His Pro Phe Ala His Gly Arg Pro Pro Lys Val
 50 55 60

Phe Asn Arg Arg Gly Glu Lys Ser Thr Ala Ser Gly Arg Tyr Gln Gln
 65 70 75 80

Leu Tyr Ile Phe Trp Pro His Tyr Lys Lys Gln Leu Ala Leu Pro Asp
 85 90 95

Phe Ser Pro Leu Ser Gln Asp Lys Leu Ala Ile Gln Leu Ile Arg Glu
 100 105 110

Arg Gly Ala Ile Asp Asp Ile Arg Ala Gly Arg Ile Glu Arg Ala Val
 115 120 125

Ser Arg Cys Arg Asn Ile Trp Ala Ser Leu Pro Gly Ala Gly Tyr Gly
 130 135 140

Gln Arg Glu His Ser Leu Glu Lys Leu Val Thr Val Trp Arg Thr Ala
 145 150 155 160

Gly Gly Val Met Ala
 165

5 <210> 9
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> desconocido

10 <220>
 <223> P2gp09

<400> 9

Met Pro Val Ile Asn Thr His Gln Asn Ile Ala Ala Phe Leu Asp Met
 1 5 10 15

15

ES 2 395 357 T3

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

5 <210> 10
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> desconocido

10 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 10

Lys Arg Lys Lys Arg Lys
 1 5

15 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> desconocido

20 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 11

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys

1

5

5 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> desconocido

10 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 12

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

15 <210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> desconocido

20 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 13

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5

25 <210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> desconocido

30 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 14

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys
1 5 10

35 <210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> desconocido

40 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 15

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys
1 5 10

45 <210> 16
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> desconocido

50 <220>

ES 2 395 357 T3

<223> péptido sintético

<400> 16

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg
1 5 10

5

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

10

<213> desconocido

<220>

<223> péptido sintético

15

<400> 17

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5 10 15

20

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> desconocido

25

<220>

<223> péptido sintético

<400> 18

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys
1 5 10 15

30

Arg Lys Lys

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

35

<213> desconocido

<220>

<223> péptido sintético

40

<400> 19

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg Arg

45

<210> 20

<211> 19

<212> PRT

<213> desconocido

50

<220>

<223> péptido sintético

<400> 20

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5 10 15

Lys Lys Lys

- 5 <210> 21
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> desconocido
- <220>
- 10 <223> péptido sintético
- <400> 21

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg
1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys
20

- 15 <210> 22
- <211> 21
- <212> PRT
- <213> desconocido
- 20 <220>
- <223> péptido sintético
- <400> 22

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg
1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Lys
20

- 25 <210> 23
- <211> 21
- <212> PRT
- 30 <213> desconocido
- <220>
- <223> péptido sintético
- 35 <400> 23

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys
1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys
20

- 40 <210> 24
- <211> 22
- <212> PRT
- <213> desconocido

<220>
<223> péptido sintético

5 <400> 24

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser Gly Lys Arg Lys
1 5 10 15

Lys Arg Lys Lys Arg Lys
20

10 <210> 25
<211> 24
<212> PRT
<213> desconocido

15 <220>
<223> péptido sintético

<400> 25

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser Gly Ser Gly Lys
1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys
20

20 <210> 26
<211> 25
<212> PRT
<213> desconocido

25 <220>
<223> péptido sintético

<400> 26

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys
1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys
20 25

30 <210> 27
<211> 31
<212> PRT
35 <213> desconocido

<220>
<223> péptido sintético

40 <400> 27

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys
20 25 30

5 <210> 28
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> desconocido

10 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 28

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser Gly Ser Gly Lys
1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Gly Ser Gly Ser Gly Lys Arg Lys
20 25 30

Lys Arg Lys Lys Arg Lys
35

15 <210> 29
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> desconocido

20 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 29

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys
1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg
20 25 30

Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys
35

25 <210> 30
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> desconocido

30 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 30

ES 2 395 357 T3

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg
1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg
20 25 30

Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys
35 40

5 <210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> desconocido

10 <220>
<223> péptido sintético
<400> 31

Ala Met Ser Gly
1

15 <210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> desconocido

20 <220>
<223> péptido sintético

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> en la que Xaa es cualquier otro resto de aminoácido distinto de lisina, arginina e histidina

<400> 32

Lys Arg Xaa Lys Arg
1 5

30 <210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> desconocido

35 <220>
<223> péptido sintético

40 <400> 33

Lys Arg Ser Lys Arg
1 5

45 <210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> desconocido

50 <220>
<223> péptido sintético

ES 2 395 357 T3

<400> 34

Lys Arg Gly Ser Gly
1 5

5

<210> 35
<211> 271
<212> PRT
<213> desconocido

10

<220>
<223> POLY-gp144

<400> 35

ES 2 395 357 T3

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg
1 5 10 15

Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn
20 25 30

Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn
35 40 45

Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser
50 55 60

Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr
65 70 75 80

Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys
85 90 95

Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr
100 105 110

Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala
115 120 125

Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe
130 135 140

Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met
145 150 155 160

Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro
165 170 175

Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn
180 185 190

Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr
195 200 205

Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr
210 215 220

Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala
225 230 235 240

Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln
245 250 255

Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys
260 265 270

ES 2 395 357 T3

<210> 36
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> desconocido

5

<220>
 <223> (POLY)2-gp144

10

<400> 36

```

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg
 1          5          10          15

Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly
 20          25          30

Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp
 35          40          45

Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val
 50          55          60

Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly
 65          70          75          80

Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro
 85          90          95

Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala
 100         105         110

Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln
 115         120         125

Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile
 130         135         140
    
```

Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly
 145 150 155 160

Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu
 165 170 175

Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu
 180 185 190

Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val
 195 200 205

Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe
 210 215 220

Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu
 225 230 235 240

Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe
 245 250 255

Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu
 260 265 270

Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys
 275 280

<210> 37
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> desconocido

<220>
 <223> (POLY)3-gp144

<400> 37

5

10

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys
 20 25 30

Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln
 35 40 45

Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp
 50 55 60

Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys
 65 70 75 80

Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala
 85 90 95
 Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro
 100 105 110
 Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn
 115 120 125
 Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe
 130 135 140
 Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser
 145 150 155 160
 Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met
 165 170 175
 Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly
 180 185 190
 Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu
 195 200 205
 Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro
 210 215 220
 Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala
 225 230 235 240
 Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe
 245 250 255
 Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly
 260 265 270
 Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val
 275 280 285
 Ala Ala His Arg Lys
 290

<210> 38
 <211> 304
 <212> PRT
 <213> desconocido

<220>
 <223> (POLY)4-gp144

<400> 38

5

10

ES 2 395 357 T3

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg
1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys
20 25 30

Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu
35 40 45

Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu
50 55 60

Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn
65 70 75 80

Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp
85 90 95

Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys
100 105 110

Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn
115 120 125

Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala
130 135 140

Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser
145 150 155 160

Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp
165 170 175

Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly
180 185 190

Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp
195 200 205

Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met
210 215 220

Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu
225 230 235 240

Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr
245 250 255

ES 2 395 357 T3

Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln
 260 265 270

Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile
 275 280 285

Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys
 290 295 300

<210> 39
 <211> 303
 <212> PRT
 <213> desconocido

5

<220>
 <223> POLY-gp188

10

<400> 39

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asn Phe Arg Thr
 1 5 10 15

Lys Asn Gly Tyr Arg Asp Leu Gln Ala Leu Val Lys Glu Leu Gly Leu
 20 25 30

Tyr Thr Gly Gln Ile Asp Gly Val Trp Gly Lys Gly Thr Ser Ser Ser
 35 40 45

Thr Glu Thr Leu Leu Arg Gly Tyr Ala Glu Val Val Gly Lys Asn Thr
 50 55 60

Gly Gly Ile Gly Leu Pro Thr Thr Ser Asp Ala Ser Gly Tyr Asn Val
 65 70 75 80

Ile Thr Ala Leu Gln Arg Asn Leu Ala Phe Leu Gly Leu Tyr Ser Leu
 85 90 95

Thr Val Asp Gly Ile Trp Gly Asn Gly Thr Leu Ser Gly Leu Asp Lys
 100 105 110

Ala Phe Glu Val Tyr Lys Glu Arg Tyr Arg Thr Pro Thr Tyr Asp Ile
 115 120 125

Ala Trp Ser Gly Lys Val Ser Pro Ala Phe Thr Ala Lys Val Lys Asp
 130 135 140

Trp Cys Gly Val His Val Pro Asn His Arg Ala Pro His Trp Leu Met
 145 150 155 160

Ala Cys Met Ala Phe Glu Thr Gly Gln Thr Phe Ser Pro Ser Ile Lys
 165 170 175

ES 2 395 357 T3

Asn Ala Ala Gly Ser Glu Ala Tyr Gly Leu Ile Gln Phe Met Ser Pro
 180 185 190

Ala Ala Asn Asp Leu Asn Val Pro Leu Ser Val Ile Arg Ser Met Asp
 195 200 205

Gln Leu Thr Gln Leu Asp Leu Val Phe Lys Tyr Phe Glu Met Trp Met
 210 215 220

Lys Arg Gly Lys Arg Tyr Thr Gln Leu Glu Asp Phe Tyr Leu Thr Ile
 225 230 235 240

Phe His Pro Ala Ser Val Gly Lys Lys Ala Asp Glu Val Leu Phe Leu
 245 250 255

Gln Gly Ser Lys Ala Tyr Leu Gln Asn Lys Gly Phe Asp Val Asp Lys
 260 265 270

Asp Gly Lys Ile Thr Leu Gly Glu Ile Ser Ser Thr Leu Tyr Thr Thr
 275 280 285

Tyr Tyr Lys Gly Leu Leu Pro Glu Asn Arg His Val Ile Ser Tyr
 290 295 300

<210> 40
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> desconocido

5

<220>
 <223> (POLY)2-gp188

10

<400> 40

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asn Phe Arg Thr Lys Asn Gly Tyr Arg
 20 25 30

Asp Leu Gln Ala Leu Val Lys Glu Leu Gly Leu Tyr Thr Gly Gln Ile
 35 40 45

Asp Gly Val Trp Gly Lys Gly Thr Ser Ser Ser Thr Glu Thr Leu Leu
 50 55 60

Arg Gly Tyr Ala Glu Val Val Gly Lys Asn Thr Gly Gly Ile Gly Leu
 65 70 75 80

Pro Thr Thr Ser Asp Ala Ser Gly Tyr Asn Val Ile Thr Ala Leu Gln

ES 2 395 357 T3

85 90 95

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

Trp Gly Asn Gly Thr Leu Ser Gly Leu Asp Lys Ala Phe Glu Val Tyr
115 120 125

Lys Glu Arg Tyr Arg Thr Pro Thr Tyr Asp Ile Ala Trp Ser Gly Lys
130 135 140

Val Ser Pro Ala Phe Thr Ala Lys Val Lys Asp Trp Cys Gly Val His
145 150 155 160

Val Pro Asn His Arg Ala Pro His Trp Leu Met Ala Cys Met Ala Phe
165 170 175

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

Glu Ala Tyr Gly Leu Ile Gln Phe Met Ser Pro Ala Ala Asn Asp Leu
195 200 205

Asn Val Pro Leu Ser Val Ile Arg Ser Met Asp Gln Leu Thr Gln Leu
210 215 220

Asp Leu Val Phe Lys Tyr Phe Glu Met Trp Met Lys Arg Gly Lys Arg
225 230 235 240

Tyr Thr Gln Leu Glu Asp Phe Tyr Leu Thr Ile Phe His Pro Ala Ser
245 250 255

Val Gly Lys Lys Ala Asp Glu Val Leu Phe Leu Gln Gly Ser Lys Ala
260 265 270

Tyr Leu Gln Asn Lys Gly Phe Asp Val Asp Lys Asp Gly Lys Ile Thr
275 280 285

Leu Gly Glu Ile Ser Ser Thr Leu Tyr Thr Thr Tyr Tyr Lys Gly Leu
290 295 300

Leu Pro Glu Asn Arg His Val Ile Ser Tyr
305 310

<210> 41
<211> 325
<212> PRT
<213> desconocido

<220>
<223> (POLY)3-gp188

<400> 41

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg
 1 5 10 15
 Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys
 20 25 30
 Arg Lys Asn Phe Arg Thr Lys Asn Gly Tyr Arg Asp Leu Gln Ala Leu
 35 40 45
 Val Lys Glu Leu Gly Leu Tyr Thr Gly Gln Ile Asp Gly Val Trp Gly
 50 55 60
 Lys Gly Thr Ser Ser Ser Thr Glu Thr Leu Leu Arg Gly Tyr Ala Glu
 65 70 75 80
 Val Val Gly Lys Asn Thr Gly Gly Ile Gly Leu Pro Thr Thr Ser Asp
 85 90 95
 Ala Ser Gly Tyr Asn Val Ile Thr Ala Leu Gln Arg Asn Leu Ala Phe
 100 105 110
 Leu Gly Leu Tyr Ser Leu Thr Val Asp Gly Ile Trp Gly Asn Gly Thr
 115 120 125
 Leu Ser Gly Leu Asp Lys Ala Phe Glu Val Tyr Lys Glu Arg Tyr Arg
 130 135 140
 Thr Pro Thr Tyr Asp Ile Ala Trp Ser Gly Lys Val Ser Pro Ala Phe
 145 150 155 160
 Thr Ala Lys Val Lys Asp Trp Cys Gly Val His Val Pro Asn His Arg
 165 170 175
 Ala Pro His Trp Leu Met Ala Cys Met Ala Phe Glu Thr Gly Gln Thr
 180 185 190
 Phe Ser Pro Ser Ile Lys Asn Ala Ala Gly Ser Glu Ala Tyr Gly Leu
 195 200 205
 Ile Gln Phe Met Ser Pro Ala Ala Asn Asp Leu Asn Val Pro Leu Ser
 210 215 220
 Val Ile Arg Ser Met Asp Gln Leu Thr Gln Leu Asp Leu Val Phe Lys
 225 230 235 240
 Tyr Phe Glu Met Trp Met Lys Arg Gly Lys Arg Tyr Thr Gln Leu Glu

245	250	255
Asp Phe Tyr Leu Thr Ile Phe His Pro Ala Ser Val Gly Lys Lys Ala		
260	265	270
Asp Glu Val Leu Phe Leu Gln Gly Ser Lys Ala Tyr Leu Gln Asn Lys		
275	280	285
Gly Phe Asp Val Asp Lys Asp Gly Lys Ile Thr Leu Gly Glu Ile Ser		
290	295	300
Ser Thr Leu Tyr Thr Thr Tyr Tyr Lys Gly Leu Leu Pro Glu Asn Arg		
305	310	315
His Val Ile Ser Tyr		
325		

<210> 42
 <211> 336
 <212> PRT
 <213> desconocido

5

<220>
 <223> (POLY)4-gp188

10

<400> 42

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

Leu Thr Val Asp Gly Ile Trp Gly Asn Gly Thr Leu Ser Gly Leu Asp
 130 135 140

Lys Ala Phe Glu Val Tyr Lys Glu Arg Tyr Arg Thr Pro Thr Tyr Asp
 145 150 155 160

Ile Ala Trp Ser Gly Lys Val Ser Pro Ala Phe Thr Ala Lys Val Lys
 165 170 175

Asp Trp Cys Gly Val His Val Pro Asn His Arg Ala Pro His Trp Leu
 180 185 190

Met Ala Cys Met Ala Phe Glu Thr Gly Gln Thr Phe Ser Pro Ser Ile
 195 200 205

Lys Asn Ala Ala Gly Ser Glu Ala Tyr Gly Leu Ile Gln Phe Met Ser
 210 215 220

Pro Ala Ala Asn Asp Leu Asn Val Pro Leu Ser Val Ile Arg Ser Met
 225 230 235 240

Asp Gln Leu Thr Gln Leu Asp Leu Val Phe Lys Tyr Phe Glu Met Trp
 245 250 255

Met Lys Arg Gly Lys Arg Tyr Thr Gln Leu Glu Asp Phe Tyr Leu Thr
 260 265 270

Ile Phe His Pro Ala Ser Val Gly Lys Lys Ala Asp Glu Val Leu Phe
 275 280 285

Leu Gln Gly Ser Lys Ala Tyr Leu Gln Asn Lys Gly Phe Asp Val Asp
 290 295 300

Lys Asp Gly Lys Ile Thr Leu Gly Glu Ile Ser Ser Thr Leu Tyr Thr
 305 310 315 320

Thr Tyr Tyr Lys Gly Leu Leu Pro Glu Asn Arg His Val Ile Ser Tyr
 325 330 335

<210> 43
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> desconocido

<220>
 <223> pKKZ144pET32b

<400> 43

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu
 1 5 10 15

5

10

ES 2 395 357 T3

Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu
 20 25 30
 Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn
 35 40 45
 Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp
 50 55 60
 Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys
 65 70 75 80
 Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn
 85 90 95
 Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala
 100 105 110
 Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser
 115 120 125
 Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp
 130 135 140
 Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly
 145 150 155 160
 Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp
 165 170 175
 Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met
 180 185 190
 Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu
 195 200 205
 Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr
 210 215 220
 Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln
 225 230 235 240
 Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile
 245 250 255
 Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys
 260 265 270

<210> 44
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> desconocido

ES 2 395 357 T3

<220>
 <223> KRK_6_pET32b

5 <400> 44

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys
 20 25 30

Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe
 35 40 45

Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly
 50 55 60

Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro
 65 70 75 80

Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg
 85 90 95

Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val
 100 105 110

Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp
 115 120 125

Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe
 130 135 140

Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr
 145 150 155 160

Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile
 165 170 175

Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu
 180 185 190

Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala
 195 200 205

His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln
 210 215 220

ES 2 395 357 T3

Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro
 225 230 235 240

Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val
 245 250 255

Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys
 260 265

<210> 45
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> desconocido

5

<220>
 <223> KRK_12_pET32b

10

<400> 45

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys
 1 5 10 15

Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln
 20 25 30

Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile
 35 40 45

Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn
 50 55 60

Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu
 65 70 75 80

Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro
 85 90 95

Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val
 100 105 110

Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser
 115 120 125

Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala
 130 135 140

Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu
 145 150 155 160

Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu
 165 170 175

ES 2 395 357 T3

Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys
 180 185 190

Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp
 195 200 205

Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg
 210 215 220

Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys
 225 230 235 240

Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro
 245 250 255

Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala
 260 265 270

His Arg Lys
 275

5 <210> 46
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> desconocido

10 <220>
 <223> RRR_14_pET32b

<400> 46

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys
 1 5 10 15

Lys Arg Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln
 20 25 30

Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp
 35 40 45

Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys
 50 55 60

Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala
 65 70 75 80

Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro
 85 90 95

Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn

	100		105		110	
Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe	115		120		125	
Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser	130		135		140	
Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met	145		150		155	160
Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly		165		170		175
Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu		180		185		190
Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro		195		200		205
Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala		210		215		220
Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe		225		230		235
Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly		245		250		255
Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val		260		265		270
Ala Ala His Arg Lys		275				

<210> 47
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> desconocido

 <220>
 <223> R9_pET32b

 <400> 47

5

10

Ala Met Gly Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Val Leu	1	5	10	15
Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu	20	25	30	

ES 2 395 357 T3

Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn
 35 40 45
 Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp
 50 55 60
 Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys
 65 70 75 80
 Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn
 85 90 95
 Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala
 100 105 110
 Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser
 115 120 125
 Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp
 130 135 140
 Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly
 145 150 155 160
 Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp
 165 170 175
 Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met
 180 185 190
 Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu
 195 200 205
 Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr
 210 215 220
 Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln
 225 230 235 240
 Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile
 245 250 255
 Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys
 260 265 270

<210> 48
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> desconocido

<220>
 <223> K8_pET32b

5

10

ES 2 395 357 T3

<400> 48

Ala Met Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Val Leu Arg
1 5 10 15

Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn
20 25 30

Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn
35 40 45

Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser
50 55 60

Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr
65 70 75 80

Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys
85 90 95

Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr
100 105 110

Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala
115 120 125

Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe
130 135 140

Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met
145 150 155 160

Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro
165 170 175

Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn
180 185 190

Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr
195 200 205

Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr
210 215 220

Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala
225 230 235 240

Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln
245 250 255

Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys
260 265 270

ES 2 395 357 T3

<210> 49
 <211> 302
 <212> PRT
 5 <213> desconocido

 <220>
 <223> pK2KZ144_pET32b_mod3

 10 <400> 49

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser
 1 5 10 15

 Gly Ser Gly Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser Gly
 20 25 30

 Ser Gly Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys
 35 40 45

 Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu
 50 55 60

 Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr
 65 70 75 80

 Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp
 85 90 95

 Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser
 100 105 110

 Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser
 115 120 125

 Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly
 130 135 140

 Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe
 145 150 155 160

 Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln
 165 170 175

 Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys
 180 185 190

ES 2 395 357 T3

Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg
 195 200 205

Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile
 210 215 220

Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu
 225 230 235 240

Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly
 245 250 255

Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn
 260 265 270

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

Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys
 290 295 300

- 5
 - <210> 50
 - <211> 30
 - <212> ADN
 - <213> secuencia artificial
- 10
 - <220>
 - <223> cebador directo de PSP3gp10
 - <400> 50
atgggatccc cggtcattaa tactcaccag 30
- 15
 - <210> 51
 - <211> 22
 - <212> ADN
 - <213> secuencia artificial
- 20
 - <220>
 - <223> cebador inverso de PSP3gp10
 - <400> 51
tgccatcacc cggccagccg tg 22
- 25
 - <210> 52
 - <211> 57
 - <212> ADN
 - <213> secuencia artificial
- 30
 - <220>
 - <223> cebador directo de PKPSP3gp10
 - <400> 52
atgggatcca aacgcaagaa acgtaagaaa cgcaaaccgg tcattaatac tcaccag 57
- 35
 - <210> 53
 - <211> 176
 - <212> PRT
 - <213> desconocido
- 40
 - <220>

ES 2 395 357 T3

<223> PKPSP3gp10

<400> 53

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

5

<210> 54

<211> 28

<212> ADN

10 <213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador directo de SP2gp09

15

<400> 54

atgggatccc cggtaattaa cacgcatc 28

<210> 55

<211> 25

20 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador inverso de P2gp09

25

<400> 55

ES 2 395 357 T3

agccggtacg cgcagcagcg tacgc 25

5 <210> 56
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador directo de PKP2gp09

<400> 56
 atgggatcca aacgcaagaa acgtaagaaa cgcaaaccgg taattaacac gcat 54

15 <210> 57
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> desconocido

20 <220>
 <223> PKP2gp09

<400> 57

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Pro Val Ile Asn
1 5 10 15

Thr His Gln Asn Ile Ala Ala Phe Leu Asp Met Leu Ala Val Ser Glu
20 25 30

Gly Thr Ala Asn His Pro Leu Thr Lys Asn Arg Gly Tyr Asp Val Ile
35 40 45

Val Thr Gly Leu Asp Gly Lys Pro Glu Ile Phe Thr Asp Tyr Ser Asp
50 55 60

His Pro Phe Ala His Gly Arg Pro Ala Lys Val Phe Asn Arg Arg Gly
65 70 75 80

Glu Lys Ser Thr Ala Ser Gly Arg Tyr Gln Gln Leu Tyr Leu Phe Trp
85 90 95

Pro His Tyr Arg Lys Gln Leu Ala Leu Pro Asp Phe Ser Pro Leu Ser
100 105 110

Gln Asp Arg Leu Ala Ile Gln Leu Ile Arg Glu Arg Gly Ala Leu Asp
115 120 125

Asp Ile Arg Ala Gly Arg Ile Glu Arg Ala Ile Ser Arg Cys Arg Asn
130 135 140

Ile Trp Ala Ser Leu Pro Gly Ala Gly Tyr Gly Gln Arg Glu His Ser
145 150 155 160

Leu Glu Lys Leu Val Thr Val Trp Arg Thr Ala Gly Gly Val Pro Ala
165 170 175

25 <210> 58

ES 2 395 357 T3

<211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5 <220>
 <223> cebador directo de OBPgpLYS
 <400> 58
 atgaaaaata gcgagaagaa t 21
 10 <210> 59
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cebador inverso de OBPgpLYS
 <400> 59
 20 aactattccg agtgcttct ttgt 24
 <210> 60
 <211> 54
 <212> ADN
 25 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo de PKOBPgpLYS
 30 <400> 60
 atgggatcca aacgcaagaa acgtaagaaa cgcaaaaaaa atagcgagaa gaat 54
 <210> 61
 <211> 339
 35 <212> PRT
 <213> desconocido
 <220>
 <223> PKOBPgpLYS
 40 <400> 61

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Asn Ser Glu
1 5 10 15

Lys Asn Ala Ser Ile Ile Met Ser Ile Gln Arg Thr Leu Ala Ser Leu

ES 2 395 357 T3

			20			25			30						
Ser	Leu	Tyr	Gly	Gly	Arg	Ile	Asp	Gly	Leu	Phe	Gly	Glu	Lys	Cys	Arg
		35					40					45			
Gly	Ala	Ile	Ile	Leu	Met	Leu	Asn	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Phe	Ser	Thr
50							55				60				
Asn	Lys	Leu	Pro	Ser	Asn	Thr	Tyr	Glu	Ala	Glu	Ser	Val	Phe	Thr	Phe
65					70					75					80
Leu	Gln	Thr	Ala	Leu	Ala	Gly	Val	Gly	Leu	Tyr	Thr	Ile	Thr	Ile	Asp
				85					90						95
Gly	Lys	Trp	Gly	Gly	Thr	Ser	Gln	Gly	Ala	Ile	Asp	Ala	Leu	Val	Lys
			100					105							110
Ser	Tyr	Arg	Gln	Ile	Thr	Glu	Ala	Glu	Arg	Ala	Gly	Ser	Thr	Leu	Pro
		115					120					125			
Leu	Gly	Leu	Ala	Thr	Val	Met	Ser	Lys	His	Met	Ser	Ile	Glu	Gln	Leu
130						135					140				
Arg	Ala	Met	Leu	Pro	Thr	Asp	Arg	Gln	Gly	Tyr	Ala	Glu	Val	Tyr	Ile
145					150					155					160
Asp	Pro	Leu	Asn	Glu	Thr	Met	Asp	Ile	Phe	Glu	Ile	Asn	Thr	Pro	Leu
				165					170						175
Arg	Ile	Ala	His	Phe	Met	Ala	Gln	Ile	Leu	His	Glu	Thr	Ala	Cys	Phe
			180					185						190	
Lys	Tyr	Thr	Glu	Glu	Leu	Ala	Ser	Gly	Lys	Ala	Tyr	Glu	Gly	Arg	Ala
		195					200					205			
Asp	Leu	Gly	Asn	Thr	Arg	Pro	Gly	Asp	Gly	Pro	Leu	Phe	Lys	Gly	Arg
	210					215						220			
Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Thr	Gly	Arg	Leu	Asn	Tyr	Val	Lys	Cys	Gln	Val
225					230					235					240
Tyr	Leu	Arg	Glu	Lys	Leu	Lys	Asp	Pro	Thr	Phe	Asp	Ile	Thr	Ser	Ser
				245					250						255
Val	Thr	Cys	Ala	Gln	Gln	Leu	Ser	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu
			260					265						270	
Ala	Ser	Gly	Tyr	Phe	Trp	Arg	Phe	Ile	Lys	Pro	Lys	Leu	Asn	Glu	Thr
		275					280					285			

ES 2 395 357 T3

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

Ala Lys Gln Ala Asn Pro Tyr Tyr Pro Asn Arg Asp Lys Glu Pro Asn
 305 310 315 320

His Met Lys Glu Arg Val Gln Met Leu Ala Val Thr Lys Lys Ala Leu
 325 330 335

Gly Ile Val

<210> 62
 <211> 283
 <212> PRT
 <213> desconocido

<220>
 <223> pK2KZ144pET32b

<400> 62

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys
 1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg
 20 25 30

Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr
 35 40 45

Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln
 50 55 60

Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val
 65 70 75 80

Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile
 85 90 95

Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala
 100 105 110

Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser
 115 120 125

Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu
 130 135 140

Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr

5

10

ES 2 395 357 T3

```

145          150          155          160
Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val
165          170          175
Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala
180          185          190
Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro
195          200          205
Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe
210          215          220
Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu
225          230          235
Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile
245          250          255
Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn
260          265          270
Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys
275          280
    
```

5
 <210> 63
 <211> 294
 <212> PRT
 <213> desconocido

10
 <220>
 <223> pK3KZ144pET32b

<400> 63

```

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys
1          5          10
Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys
20          25          30
Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys
35          40          45
Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro
50          55          60
Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln
65          70          75          80
    
```

ES 2 395 357 T3

Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp
 85 90 95
 Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile
 100 105 110
 Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met
 115 120 125
 Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr
 130 135 140
 Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr
 145 150 155 160
 Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr
 165 170 175
 Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr
 180 185 190
 Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu
 195 200 205
 Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu
 210 215 220
 Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala
 225 230 235 240
 Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His
 245 250 255
 Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp
 260 265 270
 Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys
 275 280 285
 Val Ala Ala His Arg Lys
 290

<210> 64
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> desconocido

<220>
 <223> pK4KZ144pET32b

<400> 64

5

10

ES 2 395 357 T3

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys
1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys
20 25 30

Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val
35 40 45

Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu
50 55 60

Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly
65 70 75 80

Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu
85 90 95

Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser
100 105 110

Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala
115 120 125

Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn
130 135 140

Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu
145 150 155 160

Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly
165 170 175

Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr
180 185 190

Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys
195 200 205

Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn
210 215 220

Met Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp
225 230 235 240

Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu
245 250 255

Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala
 260 265 270

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

Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg
 290 295 300

Lys
 305

5 <210> 65
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador directo gp188
 <400> 65

Ala Thr Gly Ala Ala Cys Thr Thr Cys Cys Gly Gly Ala Cys Gly Ala
 1 5 10 15

Ala Gly

15 <210> 66
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> desconocido

20 <220>
 <223> KRK_19_pET32b
 <400> 66

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys
 1 5 10 15

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly
 20 25 30

Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp
 35 40 45

Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val
 50 55 60

Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly
 65 70 75 80

Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro

25

ES 2 395 357 T3

				85						90				95			
Tyr	Lys	Thr	Ile	Pro	Met	Pro	Thr	Ala	Asn	Lys	Ser	Arg	Ala	Ala	Ala		
			100					105					110				
Thr	Pro	Val	Met	Asn	Ala	Val	Glu	Asn	Ala	Thr	Gly	Val	Arg	Ser	Gln		
		115					120					125					
Leu	Leu	Leu	Thr	Phe	Ala	Ser	Ile	Glu	Ser	Ala	Phe	Asp	Tyr	Glu	Ile		
	130					135					140						
Lys	Ala	Lys	Thr	Ser	Ser	Ala	Thr	Gly	Trp	Phe	Gln	Phe	Leu	Thr	Gly		
145					150					155					160		
Thr	Trp	Lys	Thr	Met	Ile	Glu	Asn	Tyr	Gly	Met	Lys	Tyr	Gly	Val	Leu		
				165					170					175			
Thr	Asp	Pro	Thr	Gly	Ala	Leu	Arg	Lys	Asp	Pro	Arg	Ile	Ser	Ala	Leu		
			180					185					190				
Met	Gly	Ala	Glu	Leu	Ile	Lys	Glu	Asn	Met	Asn	Ile	Leu	Arg	Pro	Val		
		195					200					205					
Leu	Lys	Arg	Glu	Pro	Thr	Asp	Thr	Asp	Leu	Tyr	Leu	Ala	His	Phe	Phe		
	210					215					220						
Gly	Pro	Gly	Ala	Ala	Arg	Arg	Phe	Leu	Thr	Thr	Gly	Gln	Asn	Glu	Leu		
225					230					235					240		
Ala	Ala	Thr	His	Phe	Pro	Lys	Glu	Ala	Gln	Ala	Asn	Pro	Ser	Ile	Phe		
				245					250					255			
Tyr	Asn	Lys	Asp	Gly	Ser	Pro	Lys	Thr	Ile	Gln	Glu	Val	Tyr	Asn	Leu		
			260					265					270				
Met	Asp	Gly	Lys	Val	Ala	Ala	His	Arg	Lys								
		275					280										

<210> 67
 <211> 284
 <212> PRT
 <213> desconocido

5

<220>
 <223> KRK_21_pET32b

10

<400> 67

Ala	Met	Gly	Ser	Lys	Arg	Lys	Lys	Arg	Lys	Lys	Arg	Lys	Lys	Arg	Lys
1				5					10						15

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp
 20 25 30
 Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly
 35 40 45
 Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn
 50 55 60
 Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile
 65 70 75 80
 Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro
 85 90 95
 Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala
 100 105 110
 Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg
 115 120 125
 Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr
 130 135 140
 Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly
 165 170 175
 Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser
 180 185 190
 Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg
 195 200 205
 Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His
 210 215 220
 Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn
 225 230 235 240
 Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser
 245 250 255
 Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr
 260 265 270
 Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys
 275 280

ES 2 395 357 T3

5 <210> 68
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> desconocido
 <220>
 <223> KRK_25_pET32b
 10 <400> 68

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

Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu
 210 215 220

Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr
 225 230 235 240

Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln
 245 250 255

Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile
 260 265 270

Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys
 275 280 285

<210> 69
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> desconocido

5

<220>
 <223> KRK_39_pET32b

10

<400> 69

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys
 1 5 10 15

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys
 20 25 30

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys
 35 40 45

Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu
 50 55 60

Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr
 65 70 75 80

Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp
 85 90 95

Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser
 100 105 110

Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser
 115 120 125

Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly
 130 135 140

ES 2 395 357 T3

Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe
145 150 155 160

Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln
165 170 175

Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys
180 185 190

Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg
195 200 205

Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile
210 215 220

Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu
225 230 235 240

Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly
245 250 255

Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn
260 265 270

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

Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys
290 295 300

<210> 70
<211> 282
5 <212> PRT
<213> desconocido

<220>
10 <223> K19_pET32b

<400> 70

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys
1 5 10 15

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly
20 25 30

Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp
35 40 45

Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val
50 55 60

Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly
 65 70 75 80
 Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro
 85 90 95
 Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala
 100 105 110
 Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln
 115 120 125
 Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile
 130 135 140
 Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly
 145 150 155 160
 Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu
 165 170 175
 Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu
 180 185 190
 Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val
 195 200 205
 Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe
 210 215 220
 Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu
 225 230 235 240
 Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe
 245 250 255
 Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu
 260 265 270
 Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys
 275 280

<210> 71
 <211> 279
 <212> PRT
 <213> desconocido
 <220>
 <223> K16_pET32b
 <400> 71

5

10

Ala Met Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5 10 15

Lys Lys Lys Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val
20 25 30

Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys
35 40 45

Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe
50 55 60

Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr
65 70 75 80

Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr
85 90 95

Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val
100 105 110

Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu
115 120 125

Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys
130 135 140

Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys
145 150 155 160

Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro
165 170 175

Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala
180 185 190

Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg
195 200 205

Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly
210 215 220

Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr
225 230 235 240

His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys
245 250 255

Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly
 260 265 270

Lys Val Ala Ala His Arg Lys
 275

<210> 72
 <211> 294
 <212> PRT
 <213> desconocido

<220>
 <223> pKKZ-144_K2_pET32b

<400> 72

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu
 1 5 10 15

Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu
 20 25 30

Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn
 35 40 45

Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp
 50 55 60

Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys
 65 70 75 80

Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn
 85 90 95

Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala
 100 105 110

Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser
 115 120 125

Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp
 130 135 140

Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly
 145 150 155 160

Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp
 165 170 175

Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met

5

10

180	185	190	
Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu			
195	200	205	
Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr			
210	215	220	
Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln			
225	230	235	240
Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile			
245	250	255	
Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys			
260	265	270	
Leu Glu Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys			
275	280	285	
Lys Arg Lys Lys Arg Lys			
290			

<210> 73
 <211> 285
 <212> PRT
 <213> desconocido

5

<220>
 <223> pK2KZ144_pET32b_mod1

10

<400> 73

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser																	
1			5					10						15			
Gly Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly																	
			20					25						30			
Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys																	
		35				40							45				
Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe																	
50						55							60				
Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly																	
65					70					75						80	
Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro																	
				85						90						95	

Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg
 100 105 110
Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val
 115 120 125
Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp
 130 135 140
Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe
 145 150 155 160
Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr
 165 170 175
Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile
 180 185 190
Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu
 195 200 205
Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala
 210 215 220
His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln
 225 230 235 240
Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro
 245 250 255
Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val
 260 265 270
Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys
 275 280 285

<210> 74
 <211> 287
 <212> PRT
 <213> desconocido

 <220>
 <223> pK2KZ144_pET32b_mod2

 <400> 74

5

10

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser
 1 5 10 15
Gly Ser Gly Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg
 20 25 30

ES 2 395 357 T3

Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn
 35 40 45

Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn
 50 55 60

Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser
 65 70 75 80

Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr
 85 90 95

Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys
 100 105 110

Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr
 115 120 125

Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala
 130 135 140

Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe
 145 150 155 160

Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met
 165 170 175

Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro
 180 185 190

Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn
 195 200 205

Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr
 210 215 220

Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr
 225 230 235 240

Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala
 245 250 255

Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln
 260 265 270

Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys
 275 280 285

<210> 75
 <211> 292
 <212> PRT
 <213> desconocido

ES 2 395 357 T3

<220>
 <223> smi01_KRK9

5 <400> 75

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Glu Tyr Asp
 1 5 10 15

Met Ile Leu Lys Phe Gly Ser Lys Gly Asp Ala Val Ala Thr Leu Gln
 20 25 30

Lys Gln Leu Ala Lys Met Gly Tyr Lys Gly Val Lys Asp Lys Pro Leu
 35 40 45

Ser Val Asp Gly His Phe Gly Glu Ser Thr Glu Phe Ala Val Ile Gln
 50 55 60

Leu Gln Arg Lys Phe Gly Leu Val Ala Asp Gly Lys Val Gly Asp Lys
 65 70 75 80

Thr Arg Gln Ala Leu Ala Gly Asp Ser Val Ser Lys Phe Leu Lys Asp
 85 90 95

Glu Asp Tyr Lys Lys Ala Ala Ile Arg Leu Lys Val Pro Glu Leu Val
 100 105 110

Ile Arg Val Phe Gly Ala Val Glu Gly Leu Gly Val Gly Phe Leu Pro
 115 120 125

Asn Gly Lys Ala Lys Ile Leu Phe Glu Arg His Arg Met Tyr Phe Tyr
 130 135 140

Leu Cys Gln Ala Leu Gly Lys Thr Phe Ala Asn Ser Gln Val Lys Ile
 145 150 155 160

Thr Pro Asn Ile Val Asn Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Lys Gly Asp Ala
 165 170 175

Ala Glu Tyr Thr Arg Leu Ser Met Ala Ile Asn Ile His Lys Glu Ser
 180 185 190

Ala Leu Met Ser Thr Ser Trp Gly Gln Phe Gln Ile Met Gly Glu Asn
 195 200 205

Trp Lys Asp Leu Gly Tyr Ser Ser Val Gln Glu Phe Val Asp Gln Gln
 210 215 220

Gln Leu Asn Glu Gly Asn Gln Leu Glu Ala Phe Ile Arg Phe Ile Glu
225 230 235 240

Trp Lys Pro Gly Leu Leu Glu Ala Leu Arg Lys Gln Asp Trp Asp Thr
245 250 255

Val Phe Thr Leu Tyr Asn Gly Lys Asn Tyr Lys Lys Leu Gly Tyr Gln
260 265 270

Ala Lys Phe Gln Lys Glu Trp Asp His Leu Glu Pro Ile Tyr Arg Glu
275 280 285

Lys Thr Ala Ala
290

<210> 76
<211> 176
<212> PRT
<213> desconocido

5

<220>
<223> smi02_KRK9

10

<400> 76

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Gly Asn Ile
1 5 10 15

Phe Glu Met Leu Arg Ile Asp Glu Gly Leu Arg Leu Lys Ile Tyr Lys
20 25 30

Asp Thr Glu Gly Tyr Tyr Thr Ile Gly Ile Gly His Leu Leu Thr Lys
35 40 45

Ser Pro Ser Leu Asn Ala Ala Lys Ser Glu Leu Asp Lys Ala Ile Gly
50 55 60

Arg Asn Cys Asn Gly Val Ile Thr Lys Asp Glu Ala Glu Lys Leu Phe
65 70 75 80

Asn Gln Asp Val Asp Ala Ala Val Arg Gly Ile Leu Arg Asn Ala Lys
85 90 95

Leu Lys Pro Val Tyr Asp Ser Leu Asp Ala Val Arg Arg Cys Ala Leu
100 105 110

Ile Asn Met Val Phe Gln Met Gly Glu Thr Gly Val Ala Gly Phe Thr
115 120 125

Asn Ser Leu Arg Met Leu Gln Gln Lys Arg Trp Asp Glu Ala Ala Val
130 135 140

Asn Leu Ala Lys Ser Arg Trp Tyr Asn Gln Thr Pro Asn Arg Ala Lys
 145 150 155 160

Arg Val Ile Thr Thr Phe Arg Thr Gly Thr Trp Asp Ala Tyr Lys Asn
 165 170 175

<210> 77
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> desconocido

5

<220>
 <223> smi03_KRK9

10

<400> 77

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Val Ser Lys
 1 5 10 15

Val Gln Phe Asn Pro Arg Ser Arg Thr Asp Ala Ile Phe Val His Cys
 20 25 30

Ser Ala Thr Lys Pro Glu Met Asp Ile Gly Val Glu Thr Ile Arg Met
 35 40 45

Trp His Lys Gln Gln Ala Trp Leu Asp Val Gly Tyr His Phe Ile Ile
 50 55 60

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

Ser His Val Lys Asp Trp Asn Ser Arg Ser Val Gly Val Cys Leu Val
 85 90 95

Gly Gly Ile Asn Ala Lys Gly Gln Phe Glu Ala Asn Phe Thr Pro Ala
 100 105 110

Gln Met Asn Ser Leu Arg Asn Lys Leu Asp Asp Leu Lys Val Met Tyr
 115 120 125

Pro Gln Ala Glu Ile Arg Ala His His Asp Val Ala Pro Lys Ala Cys
 130 135 140

Pro Ser Phe Asp Leu Gln Arg Trp Leu Ser Thr Asn Glu Leu Val Thr
 145 150 155 160

Ser Asp Arg Gly

<210> 78
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> desconocido

15

<220>
 <223> smi04_KRK9

20

ES 2 395 357 T3

<400> 78

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Gly Lys Pro
1 5 10 15

Lys Asp Glu Ile Phe Asp Glu Ile Leu Gly Lys Glu Gly Gly Tyr Val
20 25 30

Asn His Pro Asp Asp Lys Gly Gly Pro Thr Lys Trp Gly Ile Thr Glu
35 40 45

Lys Val Ala Arg Ala His Gly Tyr Arg Gly Asp Met Arg Asn Leu Thr
50 55 60

Arg Gly Gln Ala Leu Glu Ile Leu Glu Thr Asp Tyr Trp Tyr Gly Pro
65 70 75 80

Arg Phe Asp Arg Val Ala Lys Ala Ser Pro Asp Val Ala Ala Glu Leu
85 90 95

Cys Asp Thr Gly Val Asn Met Gly Pro Ser Val Ala Ala Lys Met Leu
100 105 110

Gln Arg Trp Leu Asn Val Phe Asn Gln Gly Gly Arg Leu Tyr Pro Asp
115 120 125

Met Asp Thr Asp Gly Arg Ile Gly Pro Arg Thr Leu Asn Ala Leu Arg
130 135 140

Val Tyr Leu Glu Lys Arg Gly Lys Asp Gly Glu Arg Val Leu Leu Val
145 150 155 160

Ala Leu Asn Cys Thr Gln Gly Glu Arg Tyr Leu Glu Leu Ala Glu Lys
165 170 175

Arg Glu Ala Asp Glu Ser Phe Val Tyr Gly Trp Met Lys Glu Arg Val
180 185 190

Leu Ile

- 5 <210> 79
<211> 52
<212> ADN
<213> secuencia artificial
- 10 <220>
<223> cebador directo de PKgp144

<400> 79
atgggatcca aacgcaagaa acgtaagaaa cgcaaaaaag tattacgcaa ag 52
- 15 <210> 80
<211> 51
<212> ADN
<213> secuencia artificial

ES 2 395 357 T3

<220>
<223> cebador directo de PKgp188

5 <400> 80
atgggatcca aacgcaagaa acgtaagaaa cgcaaaaact tccggacgaa g 51

10 <210> 81
<211> 18
<212> ADN
<213> secuencia artificial

15 <220>
<223> cebador inverso de gp144

20 <400> 81
ttttctatgt gctgcaac 18

25 <210> 82
<211> 19
<212> ADN
<213> secuencia artificial

30 <220>
<223> cebador inverso de gp144

35 <400> 82
atacгааata acgtgacga 19

40 <210> 83
<211> 18
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo de gp144

<400> 83
atgaaagtat tacgcaaa 18

REIVINDICACIONES

1. Una variante de endolisina que comprende una endolisina a la que se fusiona un tramo peptídico catiónico con actividad desestabilizante de LPS, en el que dicho tramo peptídico catiónico comprende de 5 a 100 restos de aminoácidos y en el que al menos el 70 % de los restos de aminoácidos comprendidos en dicho tramo peptídico son arginina y/o lisina y del 0 % al 30 % son serina y/o glicina.
2. La variante de endolisina de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho tramo peptídico comprende de 5 a 50 restos de aminoácidos, en particular de 5 a 30 restos de aminoácidos.
3. La variante de endolisina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho tramo peptídico está fusionado en el extremo N y/o C de la endolisina, en particular en el extremo N de la endolisina.
4. La variante de endolisina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha endolisina posee actividad de degradación de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, en particular la pared celular de las bacterias Gram-negativas seleccionadas del grupo que consiste en *Enterobacteriaceae*, en particular *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*; *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganeella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, y *Yersinia*; *Pseudomonadaceae*, en particular *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Shewallella*, *Sphingomonas* y *Comamonas*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Brucella*, *Francisella*, *Bordetella*, *Legionella*; *Bartonella*, *Coxiella*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Actinobacillus*, *Gardnerella*, *Spirochaetaceae*; en particular *Treponema* y *Borrelia*, *Leptospiraceae*, *Campylobacter*; *Helicobacter*, *Spirillum*, *Streptobacillus*, *Bacteroidaceae*, en particular *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella* y *Porphyromonas* y *Acinetobacter*, en particular *A. baumannii*.
5. La variante de endolisina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha endolisina se selecciona del grupo que consiste en phiKZgp144 de acuerdo con la SEC ID N°: 1, ELgp 188 de acuerdo con la SEC ID N°: 2, la endolisina de *Salmonella* de acuerdo con la SEC ID N°: 3, la endolisina del fago T4 de Enterobacterias de acuerdo con la SEC ID N°: 4, la endolisina de *Acinetobacter baumannii* de acuerdo con la SEC ID N°: 5, la endolisina del fago K1F de *E. coli* de acuerdo con la SEC ID N°: 6, la endolisina de PSP3 de *Salmonella* de acuerdo con la SEC ID N°: 8 y la endolisina del fago P2 de *E. coli* de acuerdo con la SEC ID N°: 9.
6. La variante de endolisina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho tramo peptídico comprende al menos un motivo KRK, en particular en el que dicho tramo peptídico consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 10 a 30.
7. La variante de endolisina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha variante de endolisina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 35 a 49, 53, 57, 62 a 64 y 66 a 78.
8. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de endolisina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8.
10. Una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico, de acuerdo con la reivindicación 8, o un vector de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha célula huésped es, en particular, una célula bacteriana o una célula de levadura.
11. Un procedimiento para la producción de una variante de endolisina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende la expresión de la variante de endolisina en una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 10.
12. La variante de endolisina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como un medicamento.
13. La variante de endolisina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como un medicamento para el tratamiento de infecciones bacterianas Gram-negativas.
14. El uso de la variante de endolisina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 como medio de diagnóstico, desinfectante o sustancia cosmética.
15. El uso de la variante de endolisina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la eliminación, reducción y/o prevención de contaminación bacteriana Gram-negativa de productos alimenticios, de equipos de tratamiento de alimentos; de instalaciones de tratamiento de alimentos, de superficies que se ponen en contacto con productos alimenticios, de dispositivos médicos o de superficies en hospitales y salas quirúrgicas.

16. El uso de la variante de endolisina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 como medio de diagnóstico para un diagnóstico médico, alimentario o alimentario para animales o ambiental.

17. La variante de endolisina para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 12 ó 13 o el uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicha variante de endolisina se usa en combinación con antibióticos, lantibióticos o bacteriocinas.

5

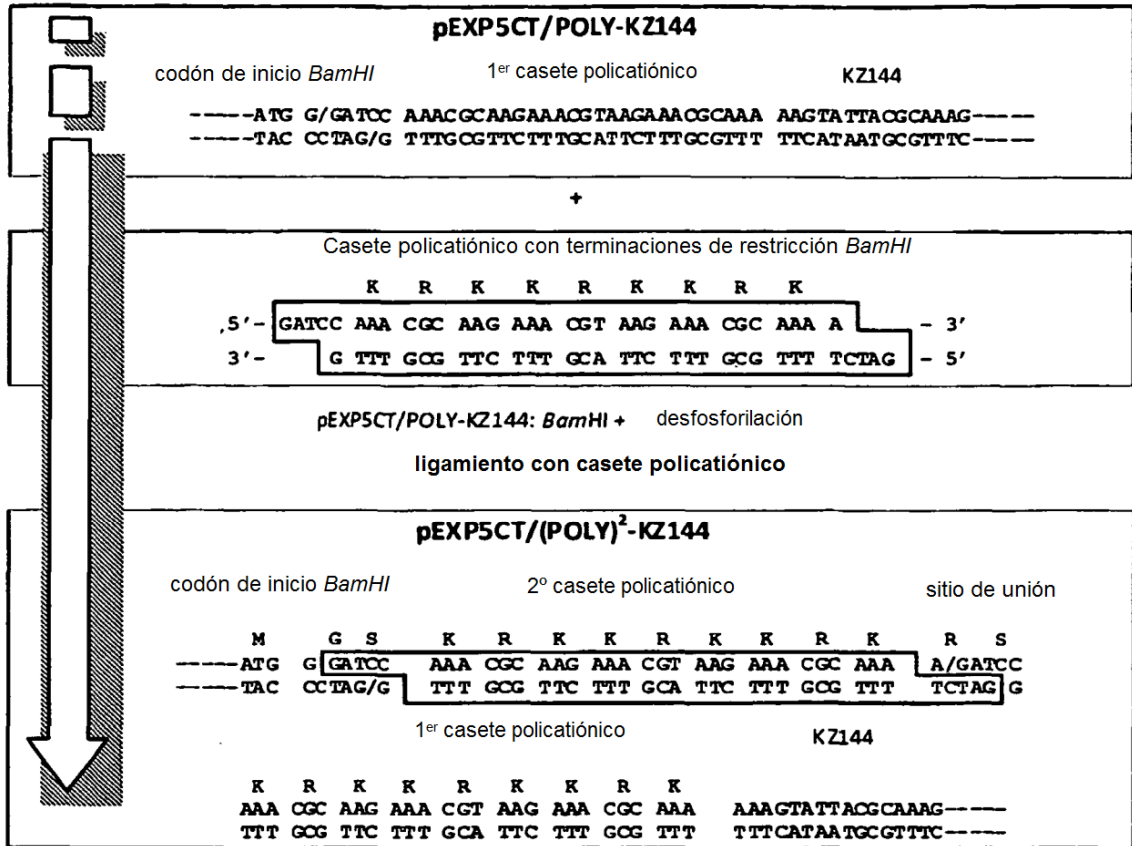


Figura 1

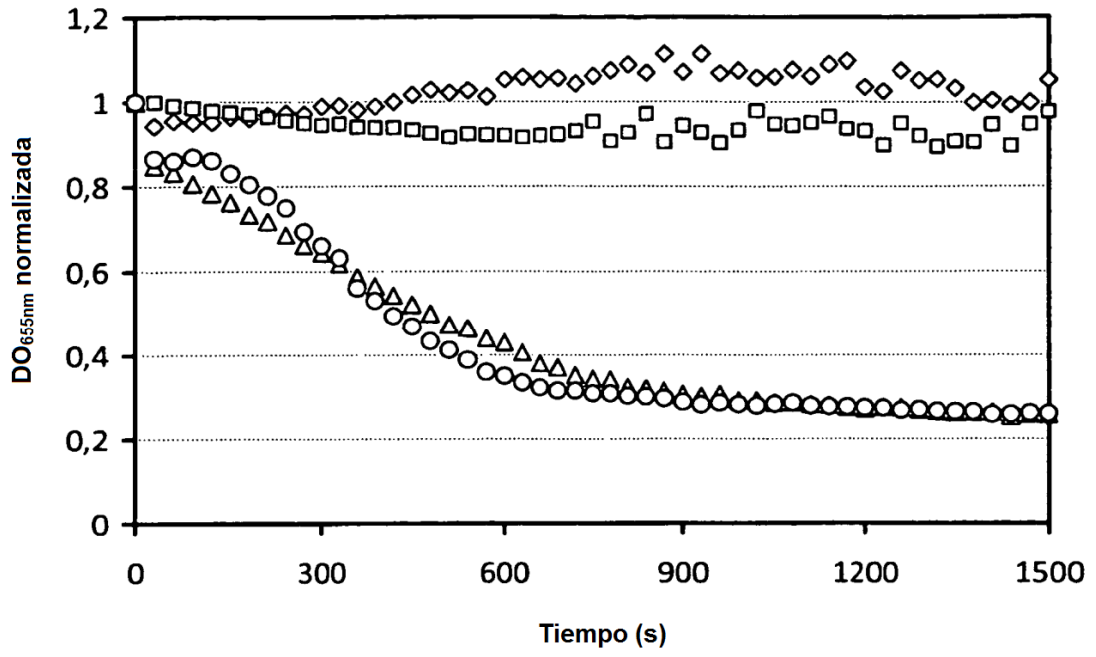


Figura 2

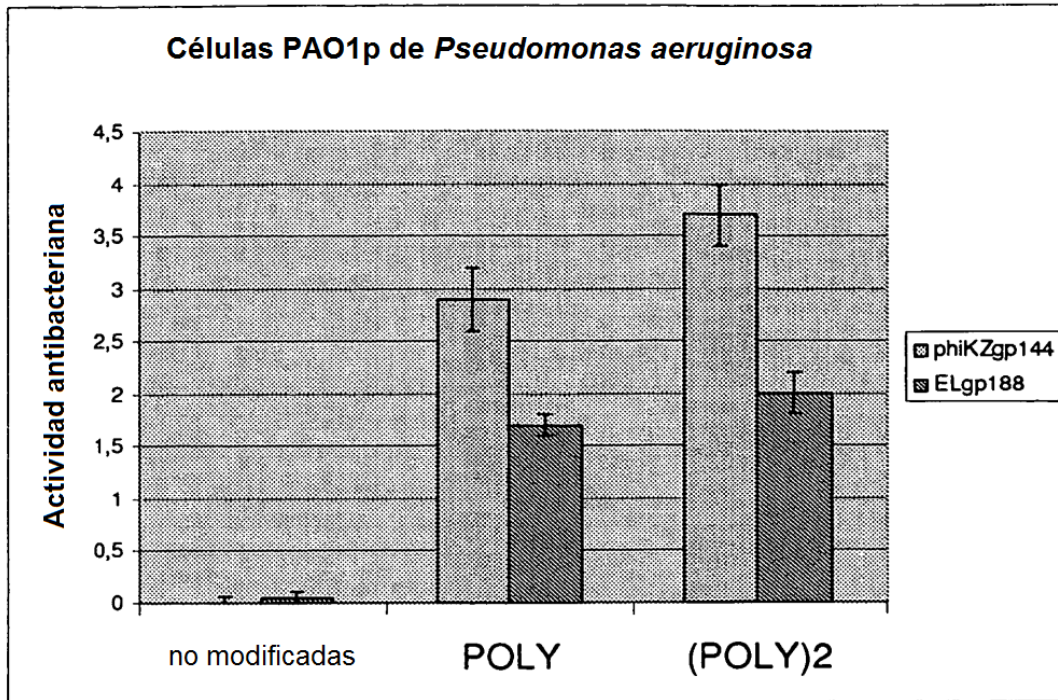


Figura 3

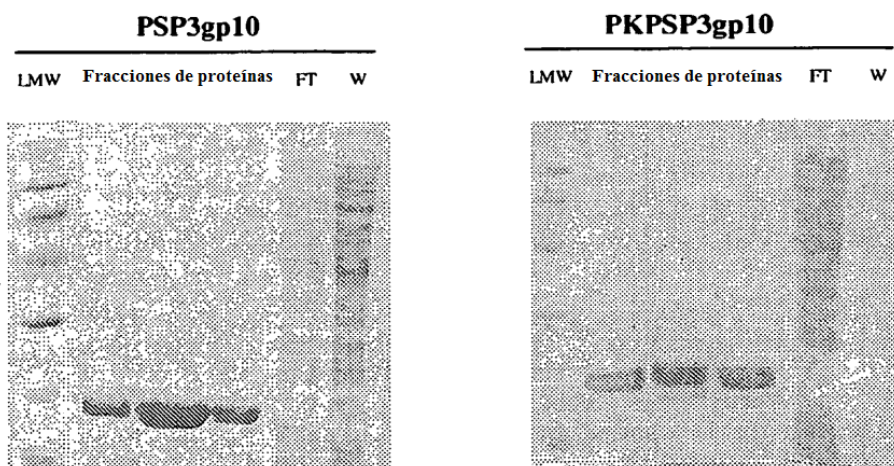


Figura 4

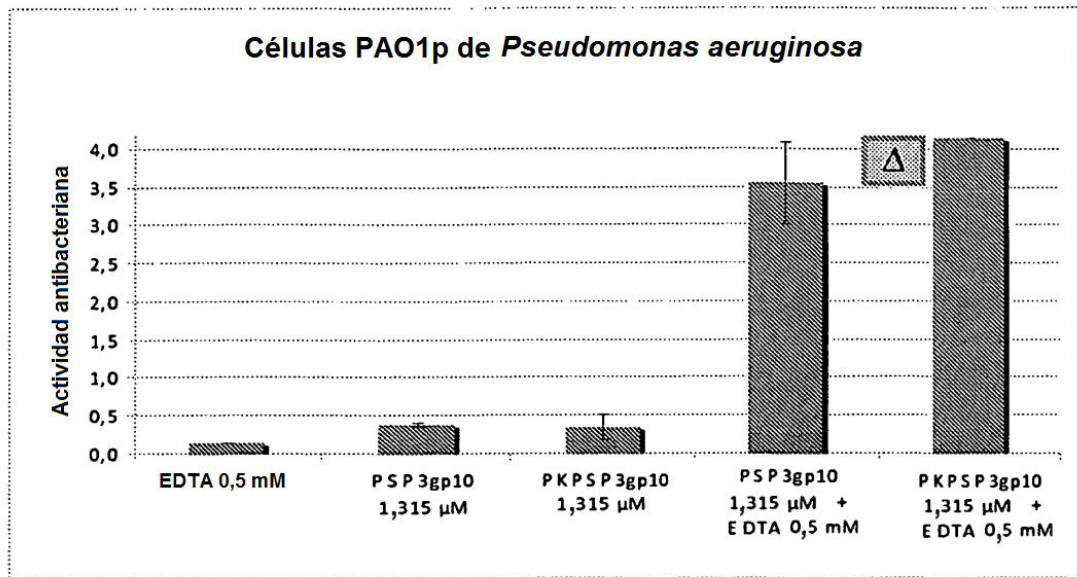


Figura 5 A

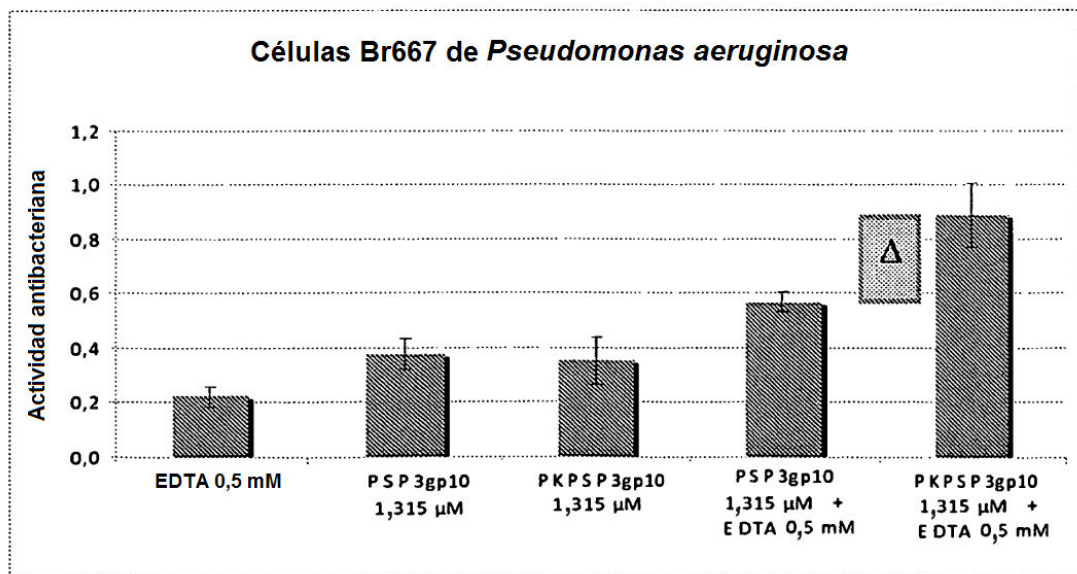


Figura 5 B

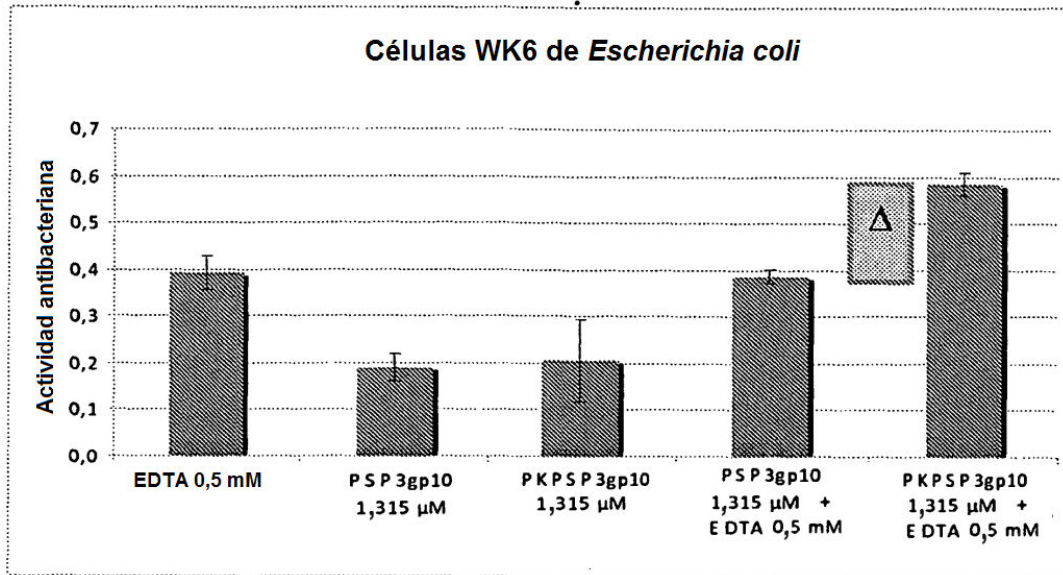


Figura 5 C

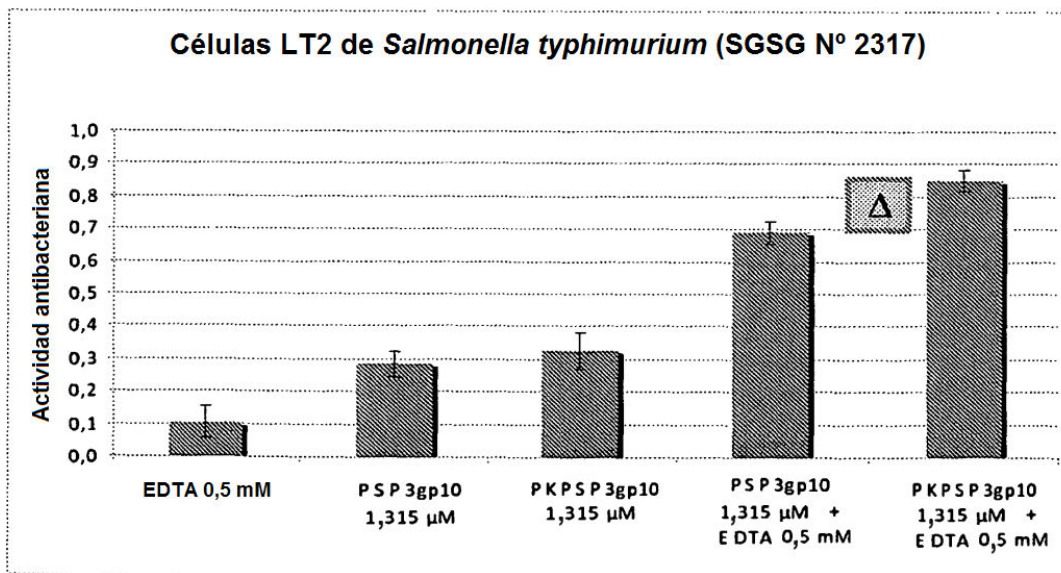


Figura 5 D

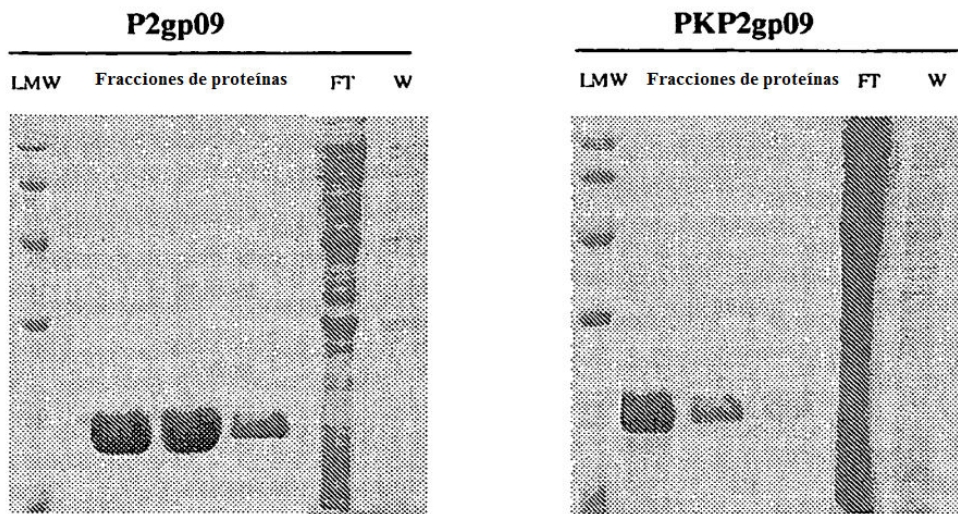


Figura 6

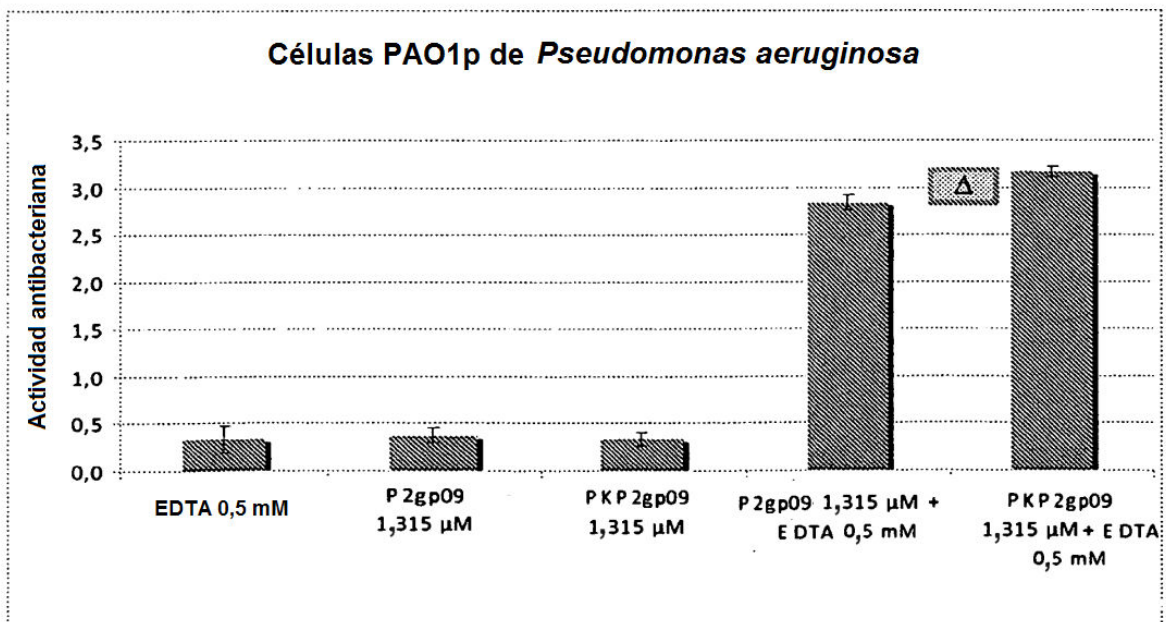


Figura 7 A

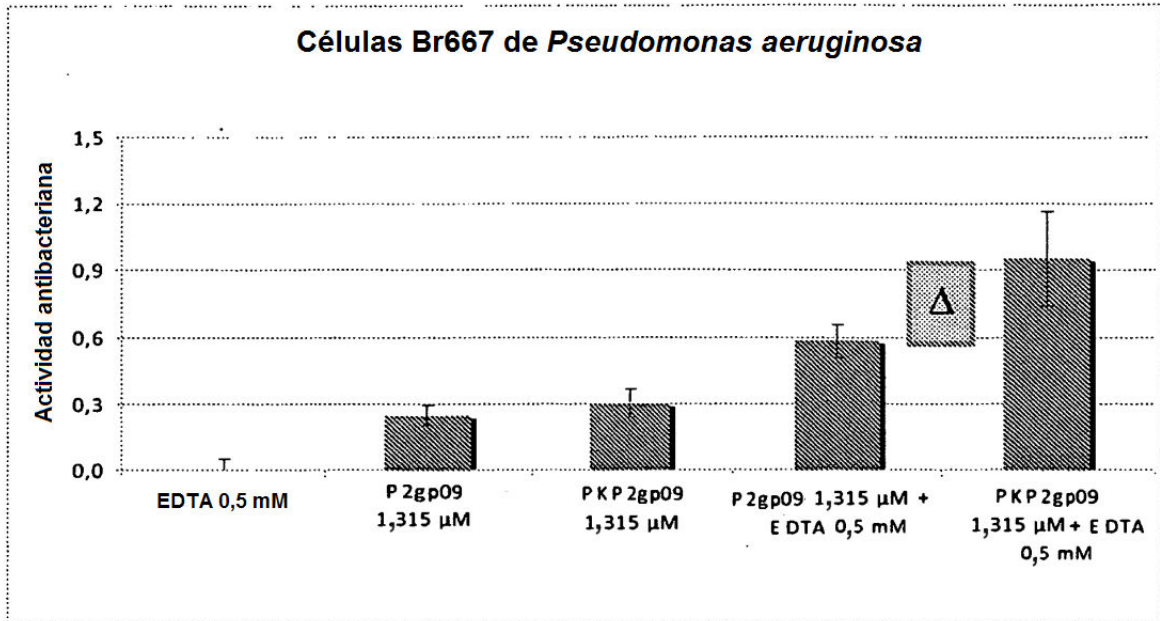


Figura 7 B

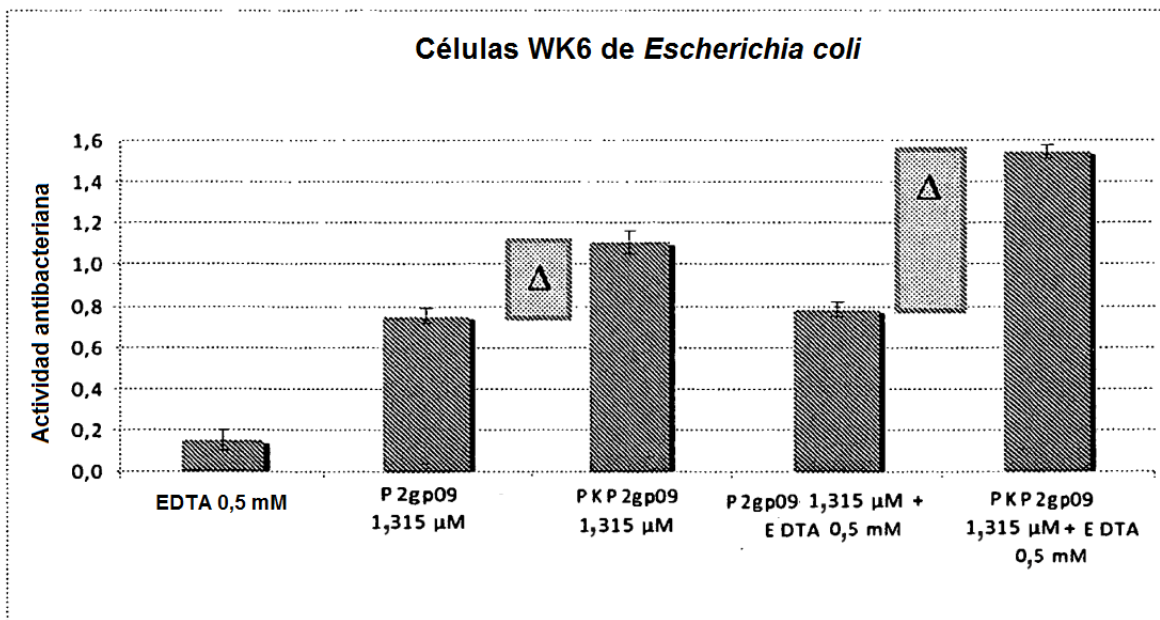


Figura 7 C

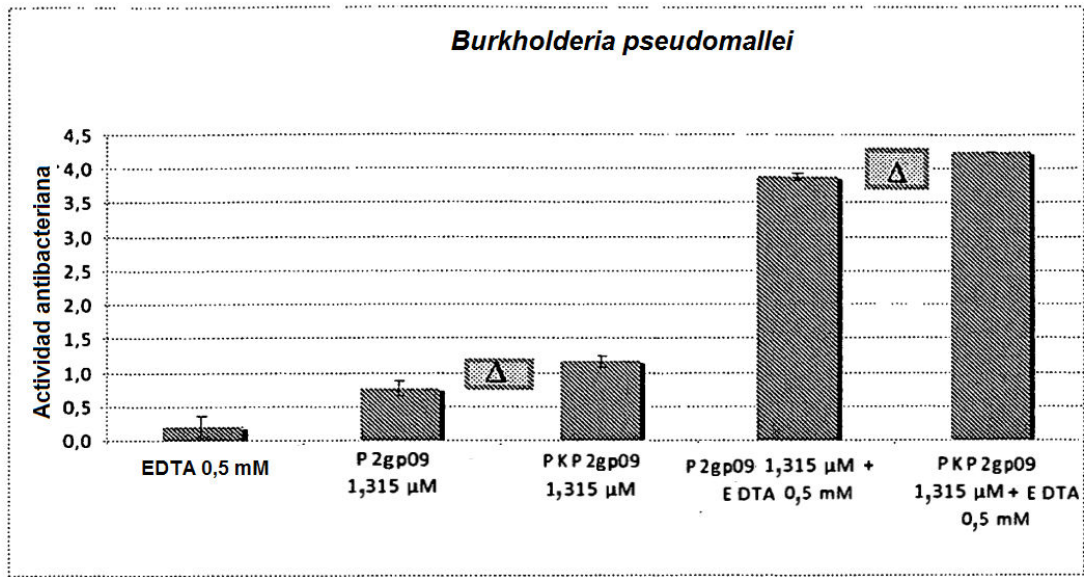


Figura 7 D

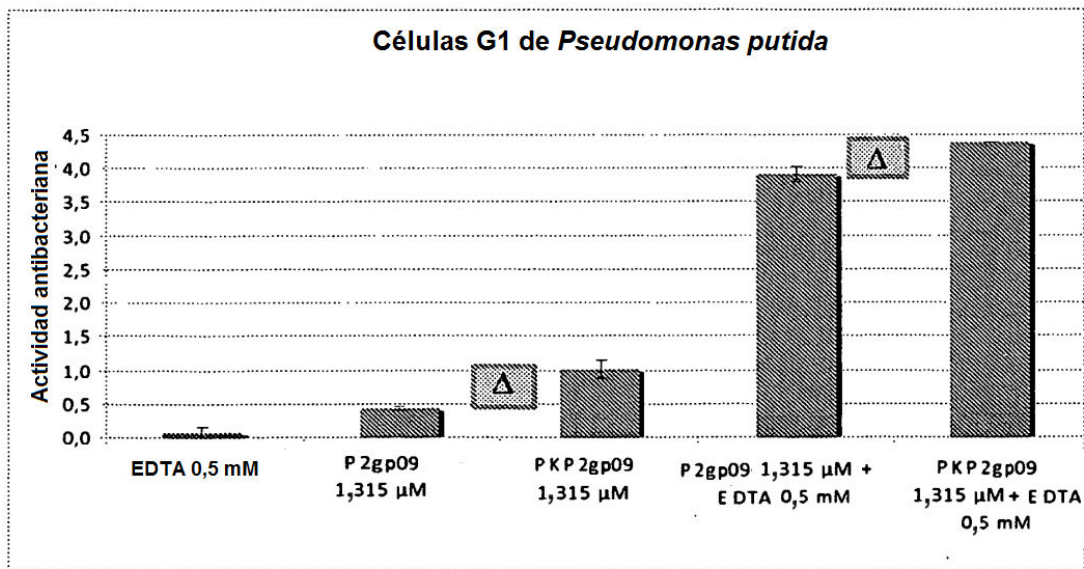


Figura 7 E

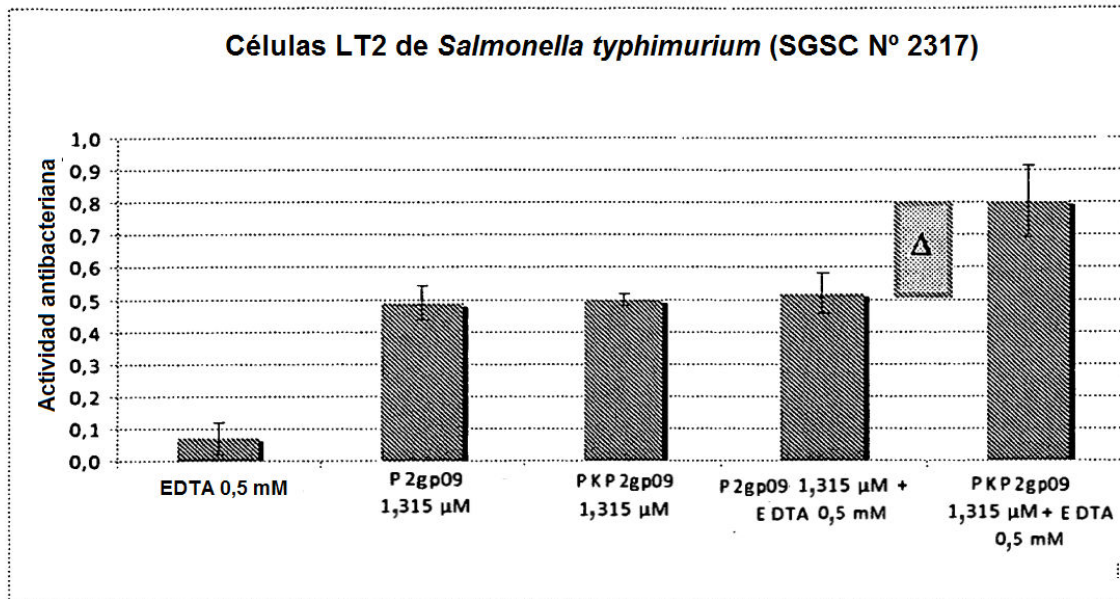


Figura 7 F

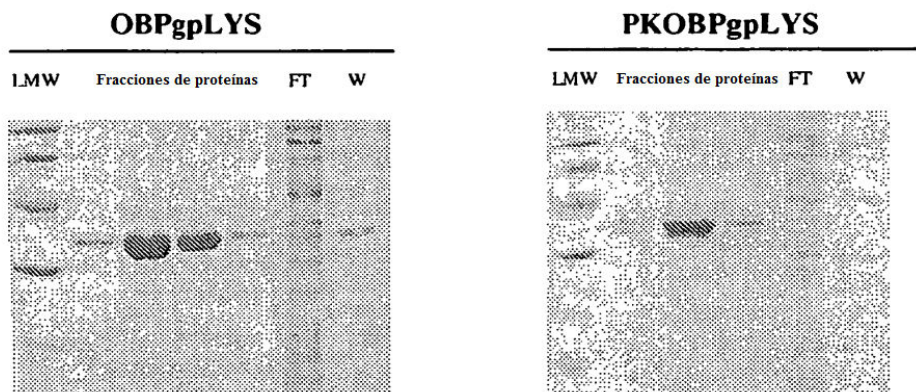


Figura 8

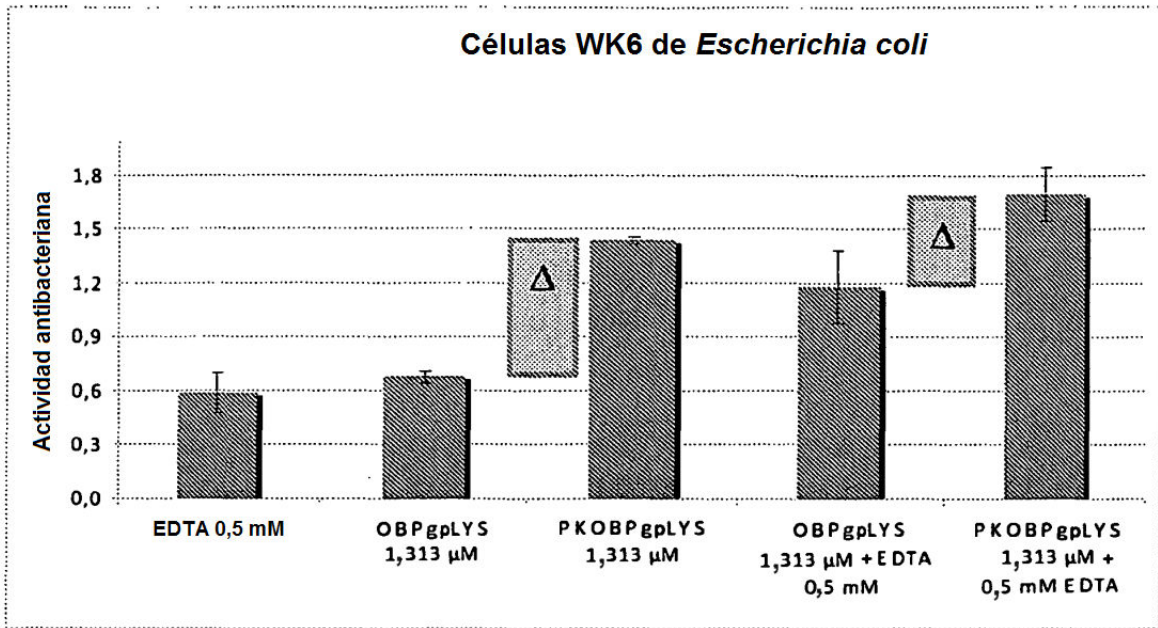


Figura 9 A

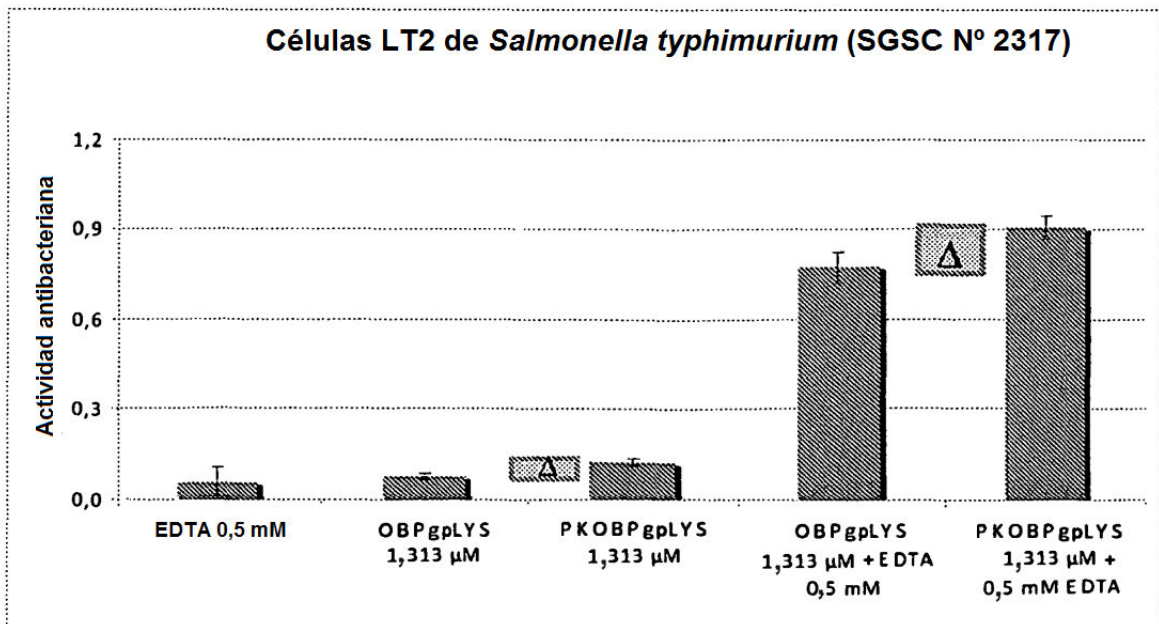


Figura 9 B

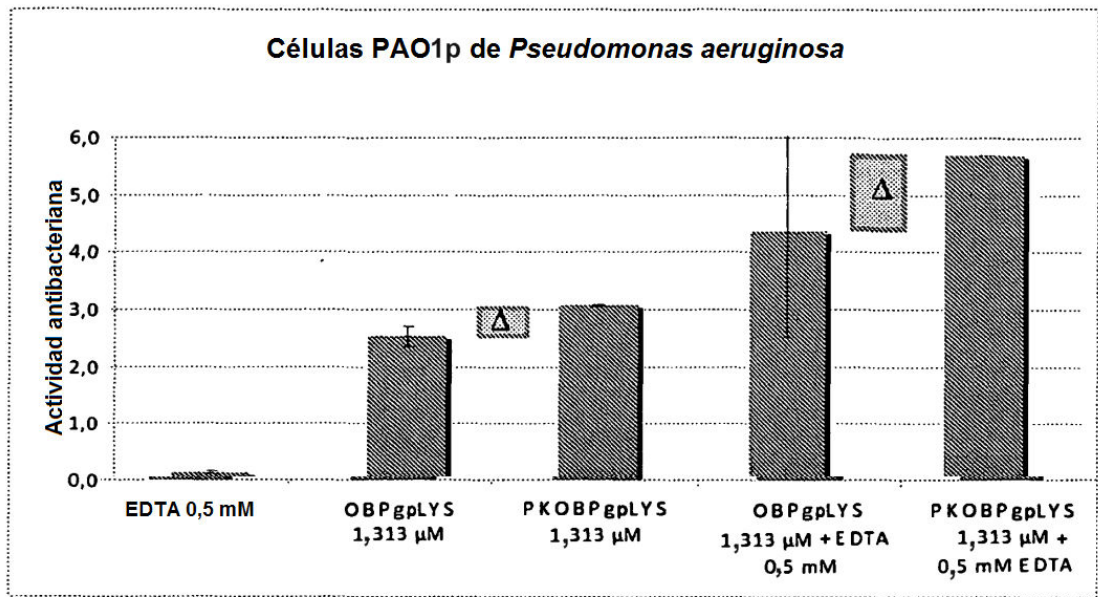


Figura 9 C

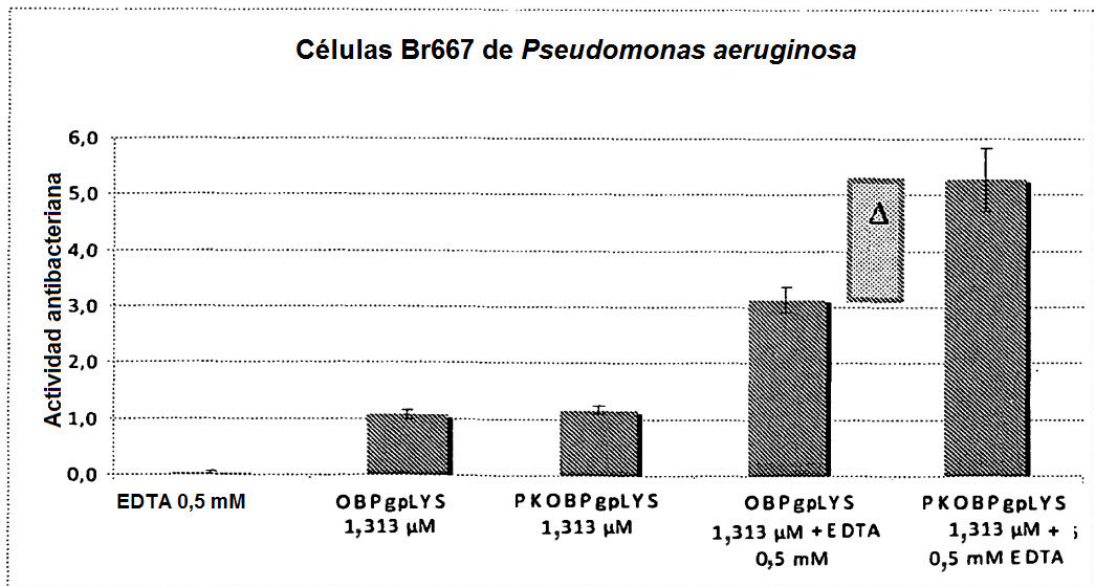


Figura 9 D

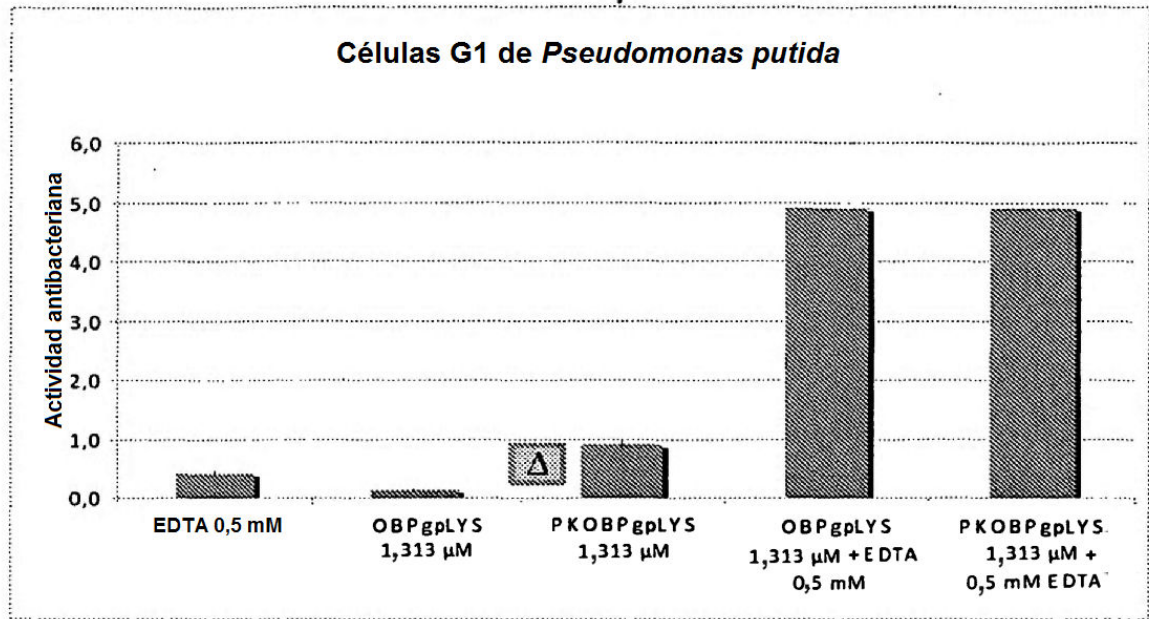


Figura 9 E

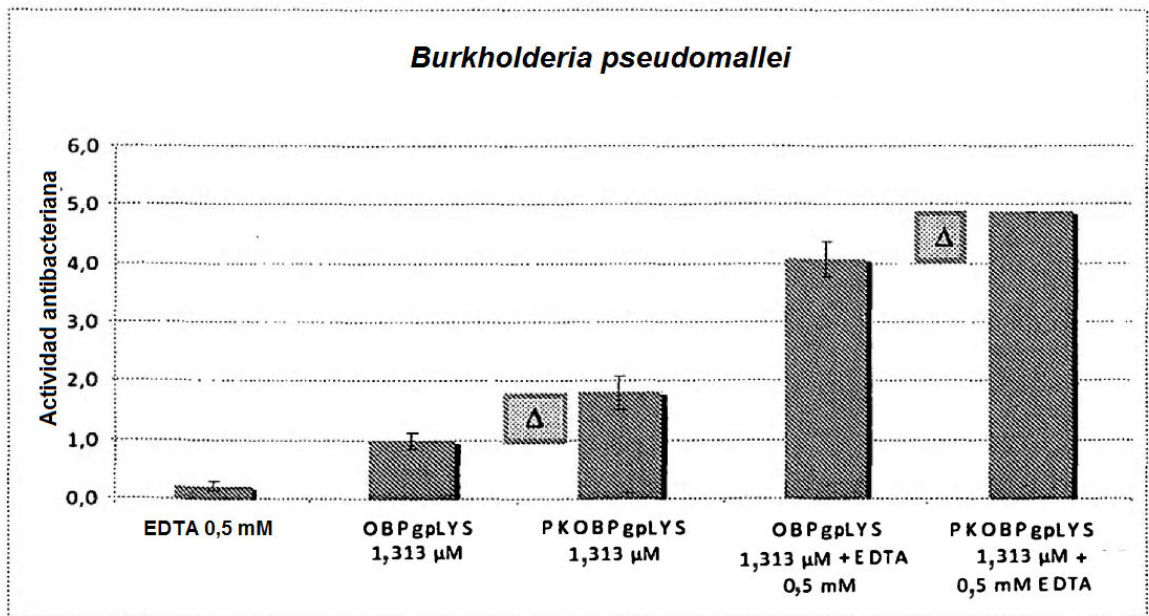


Figura 9 F