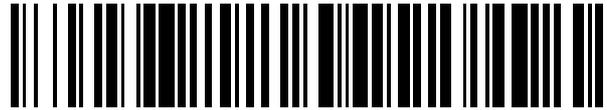


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 790**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2008 E 08712316 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 2114994**

54 Título: **Proteínas que activan un sistema de profenoloxidasa y genes que codifican las mismas**

30 Prioridad:

08.02.2007 KR 20070013231

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

05.12.2013

73 Titular/es:

**YUHAN CORPORATION (100.0%)
49-6 TAEBANG-DONG, TONGJAK-GU
SEOUL 156-754, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, BOK-LUEL;
PARK, JI-WON;
HA, NAM-CHUL;
KIM, CHAN-HEE;
KIM, SU-JIN y
ROH, KYUNG-BAEG**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 432 790 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

Proteínas que activan un sistema de profenoloxidasa y genes que codifican las mismas

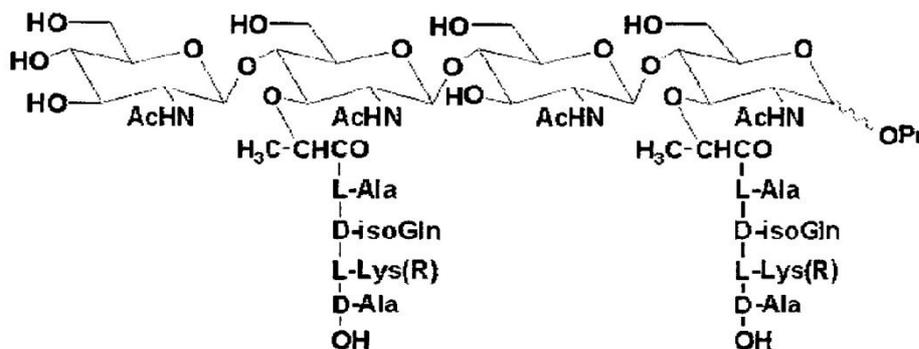
5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a nuevas proteínas que activan el sistema de profenoloxidasa (pro-PO) de *Tenebrio molitor*, a genes que codifican el mismo, a procedimientos de detectar infección bacteriana en una muestra usando las proteínas y a kits para detectar infección bacteriana en una muestra usando las proteínas. La presente invención también se refiere a un procedimiento para preparar un peptidoglicano de tipo Lys linealizado y soluble (PGLS) útil para una sustancia estándar para el kit.

Técnica anterior

15 Estudios genéticos recientes han revelado que la proteína de reconocimiento del peptidoglicano (PG) de *Drosophila melanogaster* *Drosophila* PGRRSA and *Drosophila* PGRP-SD activan la vía Toll (Michel, T., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A. & Royet, J. (2001) Nature 414, 756-759; y Bischoff, V, Vignal, C., Boneca, I G., Michel, T., Hoffmann, J. A. & Royet, J. (2004) Nat Immunol 5, 1175-1180), mientras que *Drosophila* PGRP-LC y *Drosophila* PGRP-LE son receptores para la vía Imd (Gottar, M., Gobert, V, Michel, T., Belvin, M., Duyk, G., Hoffmann, J. A., Ferrandon, D. & Royet, J. (2002) Nature 416, 640-644; Choe, K. M., Werner, T., Stoven, S., Hultmark, D. & Anderson, K. V (2002) Science 296, 359-362; and Takehana, A., Katsuyama, T., Yano, T., Oshima, Y., Takada, H., Aigaki, T. & Kurata, S. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99, 13705-13710). El fenotipo inmune de una pérdida de función mutante de la proteína de unión 1 de bacterias gramnegativas de *Drosophila* (*Drosophila* GGBP1) era indistinguible de la de *Drosophila* PGRP-SA, lo que demuestra que estas dos proteínas son necesarias para activar la vía Toll en respuesta a la infección por bacterias grampositivas (Gobert, V, Gottar, M., Matskevich, A. A., Rutschmann, S., Royet, J., Belvin, M., Hoffmann, J. A. & Ferrandon, D. (2003) Science 302, 2126-2130; Pili-Floury, S., Leulier, F., Takahashi, K., Saigo, K., Samain, E., Ueda, R & Lemaitre, B (2004) J Biol Chem 279, 12848-12853; and Wang, L., Weber, A. N., Atilano, M. L., Filipe, S. R, Gay, N. J. & Ligoxygakis, P. (2006) EMBO J 25, 5005-5014). No obstante, los mecanismos moleculares de la parte cadena arriba de la vía Toll en el reconocimiento de las bacterias gramnegativas todavía están pendientes de aclarar.

La cascada de activación de la profenoloxidasa (pro-PO), que conduce a la melanización de los microbios invasores, es otro mecanismo de defensa de inmunidad innata principal en invertebrados que desencadena el peptidoglicano (PG) y el β -1,3-glucano (Cerenius, L. & Soderhall, K. (2004) Immunol Rev 198, 116-126; y Kanost, M. R, Jiang, H. & Yu, X. Q. (2004) Immunol Rev 198, 97-105). La cascada de pro-PO, como el sistema del complemento de vertebrados, es una cascada proteolítica en plasma sanguíneo. Por tanto, el sistema pro-PO es una herramienta ideal para los estudios bioquímicos de reconocimiento de PG y β -1,3-glucano y la posterior señalización en condiciones acelulares. Anteriormente, los inventores han identificado el PGRP de *Tenebrio molitor* que exhibía la homología de secuencia más alta con PGRP-SA de *Drosophila*. Este PGRP, que los inventores designan PGRP-SA de *Tenebrio*, activó el sistema de pro-PO dependiente de Lys-PG en el escarabajo *Tenebrio*. Cabe destacar que un nuevo fragmento de Lys-PG sintético funciona como inhibidor competitivo del PG-lys lineal polimérico soluble en la activación del sistema pro-PO. El fragmento de Lys-PG sintético (en lo sucesivo en el presente documento "dímero mupéptido sintético"), que tiene una estructura química de la siguiente fórmula (I), está compuesto por un tetrasacárido (GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc), unido covalentemente a dos copias de un eje tetrapeptídico [L-Ala-D-isoGln-L-Lys-D-Ala] (Park, J. W., Je, B R, Piao, S., Inamura, S., Fujimoto, Y., Fukase, K., Kusumoto, S., Soderhall, K., Ha, N. C. & Lee, B L. (2006) J Biol Chem 281, 7747-7755).

Fórmula química 1

50

En recientes estudios estructurales cristalográficos de proteínas PGRP sin fragmento PG o formando un complejo con fragmentos de PG se proporcionó información importante sobre la base estructural del reconocimiento del PG (Lim, J. H., Kim, M. S., Kim, H. E., Yano, T., Oshima, Y., Aggarwal, K., Goldman, W. E., Silverman, N., Kurata, S. &

- Oh, B H. (2006) J Biol Chem 281, 8286-8295; Chang, C. I., Chelliah, Y., Borek, D., Mengin-Lecreulx, D. & Deisenhofer, J. (2006) Science 311, 1761-1764; Chang, C.I., Ihara, K., Chelliah, Y., Mengin-Lecreulx, D., Wakatsuki, S. & Deisenhofer, J. (2005) Proc Natl Acad Sci U S A 102, 10279-10284; Guan, R, Roychowdhury, A., Ember, B, Kumar, S., Boons, G. J. & Mariuzza, R A. (2004) Proc Natl Acad Sci U S A 101, 17168-17173; Kim, M. S., Byun, M. & Oh, B H. (2003) Nat Immunol 4, 787-793; and Chang, C. I., Pali-Floury, S, Herve, M., Parquet, C., Chelliah, Y., Lemaitre, B, Mengin-Lecreulx, D. & Deisenhofer, J. (2004) PLoS Biol 2, E277). El muropéptido, compuesto por N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico azúcares unidos por una cadena peptídica corta como eje, se reveló como la unidad mínima de unión para PGRP-SA.
- 10 No obstante, sigue sin estar claro cómo la señal de reconocimiento de Lys-PG por los OGRP ceba la cascada de la serinproteasa (SP) que conduce a la activación del sistema pro-PO o las vías Toll.

Divulgación de la invención

15 Problema de la técnica

Los presentes inventores realizaron varios estudios sobre cómo la señal de reconocimiento de Lys-PG se transfiere corriente abajo a través de un enfoque bioquímico usando la vía Toll de *Drosophila in vivo*, un sistema de motivación de pro-PO *in vitro* y proteínas PGRP-SA recombinantes. Como resultado, los inventores aislaron proteínas implicadas en un sistema pro-PO y también descubrieron que dichas proteínas son útiles para detectar infección bacteriana en una muestra, tal como sangre. Asimismo, los presentes inventores desarrollaron un procedimiento para preparar un peptidoglicano de tipo Lys linealizado y soluble (PGLS) que es útil para una sustancia estándar en la detección de infección bacteriana en una muestra.

25 Por tanto, la presente invención proporciona proteínas que activan el sistema profenoloxidasa (pro-PO) y genes que codifican la misma.

La presente invención también proporciona un procedimiento de detección de infección bacteriana en una muestra usando las proteínas.

30 La presente invención también proporciona un kit para detectar infección bacteriana en una muestra usando las proteínas.

35 En la presente invención también se divulga un procedimiento de preparar un peptidoglicano de tipo Lys linealizado soluble (PGLS).

Solución de la técnica

40 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona una proteína de unión 1 de bacterias gramnegativas derivada de *Tenebrio molitor* (*Tenebrio* GNB1), que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEC ID N° 2.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención se proporciona un polinucleótido que codifica la GNB1 de *Tenebrio*, que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEC ID N° 2.

45 De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de detección de infección bacteriana en una muestra, comprendiendo el procedimiento:

(a) cargar una proteína de reconocimiento de peptidoglicano derivada de *Tenebrio molitor* (PGRP-SA de *Tenebrio*) que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 1 en una muestra y, después, realizar una incubación de la misma;

(b) cargar una GNB1 de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 2 en la mezcla de incubación de la etapa (a) y, después, realizar una incubación; y

(c) detectar reactividad entre la proteína y la muestra en la mezcla de incubación de la etapa (b).

55 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un kit para detectar infección bacteriana en una muestra, que comprende:

un PGRP-SA de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 1 y una GNB1 de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 2.

60 En la presente invención también se divulga una proteína de unión 1 de bacterias gramnegativas derivada de *Tenebrio molitor* (*Tenebrio* GNB1), que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEC ID N° 2, y un polinucleótido que la codifica, por ejemplo un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEC ID N° 3.

65

En la presente invención también se divulga una serínproteasa 1 modular derivada de *Tenebrio molitor* (*Tenebrio* MSP-1), que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEC ID N° 4, y un polinucleótido que la codifica, por ejemplo un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEC ID N° 5. En la presente invención también se divulga una serínproteasa 2 modular derivada de *molitor* (*Tenebrio* MSP-2), que

5 tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEC ID N° 6, y un polinucleótido que la codifica, por ejemplo un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEC ID N° 7.

En la presente invención también se divulga un procedimiento de detección de infección bacteriana en una muestra, comprendiendo el procedimiento: (a) cargar una proteína de reconocimiento de peptidoglicano derivada de *Tenebrio molitor* (PGRP-SA de *Tenebrio*) que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 1 en una muestra y, después, realizar una incubación de la misma; (b) cargar al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en una GGBP1 de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 2, una MSP-1 de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 4 y una MSP-2 de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 6 en la mezcla de incubación de la etapa (a) y, después, realizar una incubación; y (c) detectar una reactividad entre la proteína y la muestra en la mezcla de incubación de la etapa (b).

10
15

En la presente invención también se divulga un kit para detectar infección bacteriana en una muestra, que comprende: un PGRP-SA de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 1 y al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en una GGBP1 de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 2, una MSP-1 de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 4 y una MSP-2 de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 6.

20

En la presente invención también se divulga un procedimiento de preparar un peptidoglicano de tipo Lys linealizado soluble (PGLS), comprendiendo el procedimiento: (a') suspender un peptidoglicano insoluble aislado de una bacteria en una solución tampón de aproximadamente pH 8; (b') tratar la suspensión obtenida de la etapa (a') con proteasa plítica (blp); (c') calentar la mezcla de reacción obtenida de la etapa (b') a aproximadamente 95 °C durante aproximadamente 10 minutos, centrifugar la mezcla de reacción y después recoger un sobrenadante; y (d') fraccionar el sobrenadante obtenido de la etapa 0 usando una columna de exclusión por tamaño para recoger una fracción que muestra actividad fenoloxidasa (PO).

25
30

Efectos ventajosos

En la presente invención se identifican factores nuevos (es decir, proteínas) que activan un sistema pro-PO. Las proteínas se pueden usar para detectar infección bacteriana en una muestra tal como sangre o para fabricar un kit para la detección de la misma. Además, cuando una muestra tal como sangre se trata previamente usando blp y/o lisozima de acuerdo con la presente invención, la infección bacteriana se puede detectar con eficacia mediante los factores implicados en un sistema pro-PO.

35
40

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 son las estructuras previstas de peptidoglicano (PG) linealizado (a) y dímero muropeptido sintético (b), en el que los círculos blancos grandes, los círculos negros grandes, los círculos negros pequeños y los círculos blancos pequeños indican N-acetil-glucosamina, ácido N-acetilmurámico, péptidos principales y residuos de Gly de PG de *S. aureus*, respectivamente.

45

La FIG. 2 es el perfil de absorbancia UV de PGLS fraccionado en una columna de exclusión por tamaño Toyopearl HW-55S y la actividad PO de cada fracción de PGSL.

50

La FIG. 3 muestra la inducción del gen indicador de drosomicina (*Drs*)-*Rp49* después de la inyección de agua (barras blancas), el dímero de muropeptido sintético (rayas) o PGSL (barras negras) en moscas hembras adultas silvestres y en moscas mutantes para PGRP-SA^{sem1}. La expresión de *Drs* se midió en cuatro moscas recogidas 18 horas después de la exposición y se normalizó con el valor obtenido tras la inyección de agua (fijado al 100 %). Las barras representan la media ± s.d. de cuatro experimentos independientes.

55

La FIG. 4 muestra el aspecto del pigmento melanina analizado en las 18 horas posteriores a la inyección de 100 ng de dímero de muropeptido sintético (a) o PGLS (b) en *Tenebrio larvae*.

La FIG. 5 muestra actividad de PO dependiente de Lys-PG medida con 10 nM de PGRP-SA de *Tenebrio* (0,2 µg ml⁻¹) y diferentes cantidades de PGLS (cuadrados). Una curva de respuesta a la dosis con forma de campana se desplazó a la derecha mediante la adición de PGRR-SA de *Tenebrio*. Aumentando la concentración de PGRR-SA de *Tenebrio* a 120 nM (25 µg ml⁻¹), se observó un punto máximo a 100 ng de PGLS (círculos). Los recuadros indican las posibles estructuras en complejo de PGRP-SA de *Tenebrio* y PGLS.

60
65

La FIG. 6 muestra experimentos de reconstitución *In vitro* realizados usando una solución de PGRP-SA de *Tenebrio*, PGRP-SA de *Drosophila* y el PGRP-SA de *Tenebrio* (-) en presencia de PGLS (columnas 2 y 3, respectivamente). El PGRP-SA de *Tenebrio* y el PGRP-SA de *Drosophila* se incubaron de forma conjunta en presencia de PGLS (columna 4).

5 La FIG. 7 muestra solo PG linealizado (a) y PG linealizado parcialmente digerido con lisozima (b), cada uno fraccionado mediante una columna Toyopearl HW-55S equilibrado con tampón Tris 20 mM (pH 8,0) que contiene NaCl 150 mM.

10 La FIG. 8 (a) muestra los resultados cuando una mezcla de PGRP-SA de *Tenebrio* y Fr. 14 se inyectó en la misma columna y la FIG. 8 (b) muestra los resultados cuando una mezcla de PGRP-SA de *Tenebrio* y de PGLS completamente digerido con lisozima mediante incubación durante 16 horas a 37 °C se inyectó en la misma columna.

15 La FIG. 9 (A) muestra la capacidad de PGRP-SA de *Drosophila* para unirse al Lys-PG insoluble digerido parcialmente. Lyso (-) Y Lyso (+) indican el Lys-PG insoluble intacto y parcialmente digerido, respectivamente. La calle 1 indica solo el PGRP-SA de *Drosophila*; las calles 2 y 4 indican las cantidades de PGRP-SA de *Drosophila* sin unir cuando PG Lyso (-) o Lyso (+) se incubó con PGRP-SA de *Drosophila*, respectivamente. Las calles 3 y 5 indican las cantidades de Dm-PGRP-SA unido en PG Lys (-) o Lys (+) PG, respectivamente. La FIG. 9 (B) muestra la capacidad de unión de PGRP-SA de *Tenebrio* a Lys-PG insoluble parcialmente digerido. Cada calle indica el mismo significado que en (A).

20 La FIG. 10 muestra los resultados de SDS/PAGE analizado tras incubación con solución de hemolinfa deficiente en PGRP-SA de *Tenebrio*. Las proteínas se extrajeron del PG insoluble intacto (calle 1), PG unido a PGRP-SA de *Tenebrio* (calle 2) o PG unido a PGRP-SA de *Drosophila* (calle 3) tras incubación con solución de hemolinfa deficiente en PGRP-SA de *Tenebrio*. Se trató PG insoluble de *M. luteus* (calles 4 y 5) y la resina acoplada al dímero de muropéptido sintético (calles 6 y 7) sin y con PGRP-SA de *Tenebrio*. Es notable que el PGRP-SA de *Drosophila* unido al PG parcialmente digerido no interactuó con las dos proteínas de *Tenebrio* (calle 3).

30 La FIG. 11(A) muestra la comparación de las secuencias en N-terminal de la banda 1 y la proteína de tipo GGBP de *Tribolium castaneum* (Tc-GGBP, XP_969449), proteína de reconocimiento de glucano de *T. molitor* (Tm-GRP), *Anopheles gambiae* GGBP1 (Ag-GGBP1, AAR13751) y GGBP1 de *Drosophila melanogaster* (Dm-GGBP1). Las cajas indican residuos idénticos a los de la secuencia de la banda 2. La FIG. 11(B) muestra la comparación de la secuencia de aminoácidos en N-terminal entre la banda 2 y la serínproteasa de *Tribolium castaneum* (Tc-SP, XP_967486), proteasa de hemolinfa 4 de *M. sexta* (Ms-HP14), A. serínproteasa de *gambiae* (Ag-SP, XP_321263), y serínproteasa modular de *D. melanogaster* (Dm-MSP, CG31217). La FIG. 11(C) muestra las identidades de secuencia entre dos secuencias internas (Pico 1 y Pico 2) de la banda 2 y la secuencia del dominio de repetición del receptor A de las lipoproteínas de baja densidad de Tc-SP.

40 La FIG. 12 muestra un modelo que resume los acontecimientos moleculares en el inicio de las vías Toll y pro-PO.

La FIG. 13 muestra los resultados obtenidos inyectando solo PGRP-SA de *Tenebrio* (A), una mezcla de PGRP-SA de *Tenebrio* y PG linealizado (B), una mezcla de PGRP-SA de *Drosophila* y el PG linealizado (C) o PGRP-SA de *Tenebrio* y PG linealizado (D) en la columna de exclusión por tamaño Toyopearl HW-55S, respectivamente.

45 La FIG. 14 muestra los efectos del inhibidor de la lisozima en la síntesis de melanina dependiente de PG de tipo Lys. (A) Solución salina de insecto. (B) Lys-PG insoluble. (C) PG de tipo Lys insoluble parcialmente digerido. (D) Coinyección del inhibidor de la lisozima y PG de tipo Lys insoluble. (E) Sólo inhibidor de lisozima.

50 Las FIGS. 15 a 17 muestran la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de GGBP1 de *Tenebrio*.

Las FIGS. 18 a 21 muestran la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de MSP de *Tenebrio*.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

55 Los presentes inventores han revelado que un complejo de una proteína de reconocimiento de peptidoglicano de *Tenebrio molitor* (PGRP-SA de *Tenebrio*) y peptidoglicano (PG) activa un sistema de pro-PO reclutando proteínas implicadas en la transducción de señal hacia abajo. Los inventores también han encontrado que las proteínas implicadas en la transducción de señal hacia abajo son el homólogo de la proteína de unión 1 de bacterias gramnegativas (GGBP1) (es decir, GGBP1 de *Tenebrio*); y una serínproteasa modular que contiene múltiples dominios de *Tenebrio* (es decir, MSP de *Tenebrio*), que tiene un dominio de tipo lipoproteína de baja densidad y un dominio de tipo proteína de control del complemento en su extremo N. Los inventores han revelado que la MSP de *Tenebrio* existe en dos formas, es decir MSP-1 de *Tenebrio* y MSP-2 de *Tenebrio*. Además, los inventores han revelado que las secuencias de GGBP1 de *Tenebrio* y de MSP de *Tenebrio* y las secuencias de nucleótidos que codifican las mismas. La GGBP1 de *Tenebrio* y la MSP de *Tenebrio* parece formar un complejo junto con el complejo de PGRP-SA y PG de *Tenebrio*.

Por tanto, la presente invención proporciona una proteína de unión 1 de bacterias gramnegativas derivada de *Tenebrio molitor* (*Tenebrio* GNP1), que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEC ID N° 2

5 La presente invención también proporciona un polinucleótido que codifica la GNP1 de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 2, preferentemente un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEC ID N°: 3.

10 La presente invención también proporciona una serínproteasa 1 modular derivada de *Tenebrio molitor* (*Tenebrio* MSP-1), que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEC ID N° 4

La presente invención también proporciona un polinucleótido que codifica la MSP-1 de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 4, preferentemente un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEC ID N°: 5.

15 La presente invención también proporciona una serínproteasa 1 modular derivada de *Tenebrio molitor* (*Tenebrio* MSP-2), que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEC ID N° 6.

20 La presente invención también proporciona un polinucleótido que codifica la MSP-2 de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 6, preferentemente un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEC ID N°: 7.

25 De acuerdo con una realización, se proporciona un procedimiento de detección de infección bacteriana en una muestra, comprendiendo el procedimiento: (a) cargar una proteína de reconocimiento de peptidoglicano derivada de *Tenebrio molitor* (PGRP-SA de *Tenebrio*) que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 1 en una muestra y, después, realizar una incubación de la misma; (b) cargar al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en una GNP1 de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 2, una MSP-1 de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 4 y una MSP-2 de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 6 en la mezcla de incubación de la etapa (a) y, después, realizar una incubación; y (c) detectar una reactividad entre la proteína y la muestra en la mezcla de incubación de la etapa (b).

30 En el procedimiento de detectar infección bacteriana en una muestra, la muestra puede ser sangre para transfusión; sangre de mamífero, incluyendo sangre humana; alimentos, tales como hortalizas, carnes, frutas o similares; alimentos cocinados o no cocinados; agua, tal como agua corriente, agua subterránea, agua de lluvia o similares; productos estériles o similares. La muestra puede ser cualquier muestra que se requiera para la detección de microorganismos. Específicamente, el procedimiento de detección de infección bacteriana de acuerdo con la presente invención es adecuado para detectar infección bacteriana en sangre para transfusión o en sangre de mamífero, incluyendo sangre humana.

40 En el procedimiento de detección de infección bacteriana de acuerdo con la presente invención, la(s) incubación(es) se pueden realizar a aproximadamente 30 °C durante un tiempo tal que una muestra puede reaccionar suficientemente con la(s) proteína(s). Si se requiere, la incubación se puede realizar en varios tampones que contienen EDTA como un inhibidor de iones de calcio.

45 Asimismo, la detección de reactividad en la etapa (c) se puede realizar de acuerdo con un procedimiento convencional usando una columna de exclusión por tamaño, tal como una columna cargada con una resina de exclusión por tamaño Toyopearl HW55S.

50 Si se requiere, el procedimiento de detección de infección bacteriana de acuerdo con la presente invención puede incluir además pretratamiento de la muestra con proteasa β-lítica (blp) y/o lisozima. Como se describe en los siguientes ejemplos, en la mayoría del peptidoglicano intacto de bacteria grampositiva, las cadenas de glicano están muy reticuladas, que puede limitar el acceso de una proteína de reconocimiento (es decir, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 1, PGRP-SA de *Tenebrio*) con el peptidoglicano. No obstante, el tratamiento de una muestra con proteasa β-lítica (blp) y/o lisozima facilita formar un complejo con PGRP-SA de *Tenebrio*.

60 La blp pueden derivar de varios microorganismos, tal como un microorganismo del suelo. Por ejemplo, la blp puede derivar de un microorganismo perteneciente al género *Achromobacter*, preferentemente *Achromobacter lyticus*, y más preferentemente *Achromobacter lyticus* ATCC 21456 o *Achromobacter lyticus* ATCC 21457. Como alternativa, la blp se puede preparar purificando una preparación de acromopeptidasa disponible comercialmente (Wako Pure Chemical Institute, 014-09661) usando un procedimiento conocido (Li, S., Norioka, S. & Sakiyama, F. (1998) J Biochem (Tokio) 124, 332-339)

65 El pretratamiento con blp puede realizarse mediante tratamiento de la muestra con blp en una concentración de aproximadamente 1 µg/ml y después incubando a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 14 horas.

La lisozima usada en el procedimiento de detección de infección bacteriana de la presente invención puede ser una lisozima disponible comercialmente (p. ej., lisozima de clara de huevo de gallina). El pretratamiento con lisozima puede realizarse mediante tratamiento de la muestra con lisozima en una concentración de aproximadamente 1 mg/ml y después incubando a aproximadamente 37 °C durante un tiempo de reacción variable.

5 De acuerdo con otra realización, se proporciona un kit para detectar infección bacteriana en una muestra, que comprende: un PGRP-SA de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 1 y al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en una GGBP1 de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 2, una MSP-1 de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 4 y una MSP-2 de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 6.

15 En el kit de detección de la presente invención, la muestra puede ser sangre para transfusión; sangre de mamífero, incluyendo sangre humana; alimentos, tales como hortalizas, carnes, frutas o similares; alimentos cocinados o no cocinados; agua, tal como agua corriente, agua subterránea, agua de lluvia o similares; productos estériles o similares. La muestra puede ser cualquier muestra que se requiere para la detección de microorganismos. Específicamente, el kit de detección de acuerdo con la presente invención es adecuado para detectar infección bacteriana en sangre para transfusión o en sangre de mamífero, incluyendo sangre humana.

20 El kit de detección de la presente invención puede incluir un reactivo para detectar reactividad, por ejemplo un aminoácido o péptido unido a p-nitroanilina, proteínas que activan un sistema de pro-PO y un sustrato cromogénico de una enzima de pro-PO. El kit de detección puede estar en forma de solución, polvo liofilizado, solución congelada o una tira. Cada una de estas formas se puede formular usando cualquier procedimiento convencional conocido en la técnica. Por ejemplo, el kit de detección en forma de solución se puede formular mezclando la(s) proteína(s) con un tampón, tal como un tampón de ácido sódico-fosfórico, un tampón de ácido potásico-fosfórico, un tampón de Tris-ácido clorhídrico o similares, en una forma mixta o en formas separadas. Si se requiere, la solución se puede congelar o liofilizar.

30 El kit de detección de la presente invención puede incluir además proteasa β-lítica (blp) y/o lisozima. La blp pueden derivar de varios microorganismos, tal como un microorganismo del suelo. Por ejemplo, la blp puede derivar de un microorganismo perteneciente al género *Achromobacter*, preferentemente *Achromobacter lyticus*, y más preferentemente *Achromobacter lyticus* ATCC 21456 o *Achromobacter lyticus* ATCC 21457. Como alternativa, la blp se puede preparar purificando una preparación de acromopeptidasa disponible comercialmente (Wako Pure Chemical Institute, 014-09661) usando un procedimiento conocido (Li, S., Norioka, S. & Sakiyama, F. (1998) J Biochem (Tokio) 124, 332-339) Y, también, la lisozima puede ser una lisozima disponible comercialmente.

40 La presente invención también proporciona un procedimiento para preparar un peptidoglicano de tipo Lys linealizado y soluble (PGLS) que se puede usar como sustancia estándar de Lys-PG en la detección de infección bacteriana en una muestra. Es decir, la presente invención proporciona un procedimiento de preparar un peptidoglicano de tipo Lys linealizado soluble (PGLS), comprendiendo el procedimiento: (a') suspender un peptidoglicano insoluble aislado de una bacteria en una solución tampón de aproximadamente pH 8; (b') tratar la suspensión obtenida de la etapa (a') con proteasa p-lítica (blp); (c') calentar la mezcla de reacción obtenida de la etapa (b') a aproximadamente 95 °C durante aproximadamente 10 minutos, centrifugar la mezcla de reacción y después recoger un sobrenadante; y (d') fraccionar el sobrenadante obtenido de la etapa (c') usando una columna de exclusión por tamaño para recoger una fracción que muestra actividad fenoloxidasa (PO).

50 En e procedimiento de preparar PGLS, el peptidoglicano insoluble aislado de bacterias se puede preparar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica (p. ej., BL de Jonge, YS Chang, D Gage, and A Tomasz, Peptidoglycan composition of a highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. The role of penicillin binding protein 2A J. Biol. Chem., Jun 1992; 267: 11248 - 11254).

55 La solución tampón en la etapa (a') puede ser un tampón Tris de aproximadamente pH 8,0. Y, también, la blp pueden derivar de varios microorganismos, tal como un microorganismo del suelo. Por ejemplo, la blp puede derivar de un microorganismo perteneciente al género *Achromobacter*, preferentemente *Achromobacter lyticus*, y más preferentemente *Achromobacter lyticus* ATCC 21456 o *Achromobacter lyticus* ATCC 21457. Como alternativa, la blp se puede preparar purificando una preparación de acromopeptidasa disponible comercialmente (Wako Pure Chemical Institute, 014-09661) usando un procedimiento conocido (Li, S., Norioka, S. & Sakiyama, F. (1998) J Biochem (Tokio) 124, 332-339)

60 El tratamiento con blp puede realizarse mediante tratamiento de la suspensión que contiene el peptidoglicano insoluble con blp en una concentración de aproximadamente 1 µg/ml y después incubando a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 14 horas.

65 En la etapa (c'), la centrifugación se puede realizar a aproximadamente 18.000 x g a una temperatura de aproximadamente 4 °C durante aproximadamente 10 minutos. Si se requiere, el sobrenadante obtenido de la centrifugación puede liofilizarse y después almacenarse a una temperatura de aproximadamente 4 °C.

En la etapa (d'), la columna de exclusión por tamaño es una columna cargada con una resina Toyopearl HW55S. Normalmente, la columna se usó después de equilibrar con agua destilada estéril. El fraccionamiento se puede realizar eluyendo la solución obtenida de la etapa (c') (es decir, solución de PG soluble) a través de la columna. Entre las fracciones, la fracción que muestra actividad fenoloxidasa (PO) se puede recoger del siguiente modo: cada fracción se diluye y después se añade a la misma la hemolinfa de larvas de *T. molitor*. Después de incubar la mezcla obtenida a 30 °C durante 5 minutos, a la misma se añadió tampón Tris 20 mM (pH8D). Se añaden la solución de CaCl₂, la solución de 4-metilcatecol (4-MC) y la solución de 4-hidroxiprolina y se mezclan. La mezcla se deja reposar en un baño a temperatura constante de 30 °C. La absorbancia se mide a una longitud de onda de 520 nm usando un espectrofotómetro en el momento que muestra la mayor variación de colores, en comparación con la variación de colores de la hemolinfa que tiene Ca²⁺ solo.

Si es necesario, la fracción obtenida que muestra actividad fenoloxidasa (PO) se puede purificar después concentrando la fracción, fraccionando a través de una columna cargada con una resina Toyopearl HW55S, y aislando después una fracción que contiene PGLS.

Y también, en caso necesario, el procedimiento de preparar PGLS puede comprender además liofilización de la fracción obtenida de la etapa (d').

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá más específicamente con referencia a los ejemplos siguientes. Los procedimientos siguientes son para fines ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

25 1. Procedimientos

(1) Purificación y caracterización de la proteasa β-lítica de *Achromobacter* (blp)

La proteasa β-lítica de *Achromobacter* (blp) se purificó hasta homogeneidad a partir de una preparación de acromopeptidasa cruda disponible comercialmente (Wako Pure Chemical Institute) de acuerdo con el procedimiento notificado anteriormente (Li, S., Norioka, S. & Sakiyama, F. (1998) J Biochema (Tokio) 124,332-339). Para confirmar la identidad de la blp, la secuencia en N-terminal de la blp purificada se determinó en un secuenciador de aminoácidos en gas de gas automático de Applied Biosystem Procise. La actividad bacteriolítica de la blp contra *Micrococcus luteus* se analizó mediante el método de Sakiyama (Li, S., Norioka, S. y Sakiyama, F. (1997) J Biochem (Tokio) 122,772-778).

(2) Purificación de peptidoglicano de tipo Lys linealizado soluble (PGLS)

(2-1) Incubación del microorganismo

La cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 12598 (serotipo Cowan) se inoculó en un medio líquido (medio TSB, caldo de soja triptico), 100 ml) y después se incubó a 37 °C durante 12 horas. En cada medio TSB 2 l (400 ml x 5 frascos) se inocularon 20 ml del medio y después se incubaron durante 12 horas. El medio resultante se centrifugó a una velocidad de rotación de 6.000 rpm a una temperatura de 4 °C durante 30 minutos. Después, las células se recogieron y las células recogidas se suspendieron en 200 ml de agua destilada estéril y las células resultantes se volvieron a recoger. Dichos procedimientos (es decir, recoger y suspender) se realizaron 6 veces. Las células obtenidas se suspendieron en 76,8 ml de tampón Tris 50 mM (pH 7D) y la suspensión obtenida se cargó en la misma cantidad hasta 50 ml de dos tubos de ensayo.

(2-2) Aislamiento y purificación de peptidoglicano insoluble

El aislamiento y purificación de peptidoglicano insoluble se realizaron de acuerdo con un procedimiento conocido BL de Jonge, YS Chang, D Gage, and A Tomasz Peptidoglycan composition of a highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. The role of penicillin binding protein 2A J. Biol. Chem., Jun 1992; 267: 11248 11254), que se describirá con mayor detalle.

A La suspensión celular obtenida anteriormente se añadieron 1,6 ml de solución de dodecilsulfato sódico (SDS) al 20 % con el fin de obtener una solución bacteriana al 4 % que se calentó a 95°C durante 45 minutos y, después, se enfrió suficientemente en un baño de hielo. La solución bacteriana obtenida se centrifugó (18.000 x g, 10 minutos, 4 °C). El sobrenadante se desechó y las células bacterianas resultantes se recogieron. A las células bacterianas recogidas se añadieron 40 ml de agua destilada estéril. La centrifugación se realizó en las mismas condiciones que las descritas anteriormente y se recogieron las células bacterianas. Dichos procedimientos se realizaron 6 veces. Las células bacterianas recogidas se suspendieron en 40 ml de 1 x tampón PBS y después se hicieron reaccionar con DNasa y RNasa en una concentración de 100 µg/ml a 37 °C durante 18 horas. La mezcla de reacción se hizo reaccionar con 200 µg/ml de tripsina a 37°C durante 18 horas. A la mezcla de reacción se añadió una solución de SDS al 20 % que se había calentado a 95°C con el fin de obtener una solución bacteriana al 1 % y la solución se

calentó a 95 °C durante 10 minutos para detener la reacción enzimática. La mezcla de reacción obtenida se centrifugó (18.000 x g, 10 minutos, 4 °C) y se recogió el precipitado resultante. Al precipitado se añadieron 40 ml de agua destilada estéril y la solución resultante se centrifugó (18.000 x g, 10 minutos, 4 °C) y se recogieron los precipitados. Dichos procedimientos se realizaron tres veces. El precipitado obtenido se suspendió en 40 ml de solución de LiCl 8M y después se añadieron 40 ml de agua destilada estéril. La suspensión obtenida se centrifugó (18.000 x g, 10 minutos, 4 °C) y se recogió el precipitado resultante. El precipitado recogido se suspendió en 40 ml de solución de EDTA 100mM (pH8D) y después se añadieron 40 ml de agua destilada estéril. La suspensión obtenida se centrifugó (18.000 x g, 10 minutos, 4 °C) y se recogió el precipitado resultante. El precipitado recogido se suspendió en 40 ml de agua destilada estéril. La suspensión obtenida se centrifugó (18.000 x g, 10 minutos, 4 °C) y se recogió el precipitado resultante. El precipitado recogido se suspendió en 40 ml de acetona. La suspensión obtenida se centrifugó (18.000 x g, 10 minutos, 4 °C) y se recogió el precipitado resultante. El precipitado recogido se liofilizó para obtener aproximadamente 380-400 ng de peptidoglicano insoluble.

(2-3) Purificación de PGLS

El peptidoglicano insoluble obtenido se trató con proteasa β-líctica (blp). Es decir, a una suspensión del peptidoglicano insoluble (20 mg) obtenido se añadieron 2 µg/ml de blp en tampón Tris 20 mM (pH8D) que después se incubó a temperatura de 37°C durante 14 horas. La mezcla de reacción se llevó a ebullición a 95°C durante 10 minutos y se centrifugó (18.000 x g, 10 minutos, 4 °C). Después se recogió el sobrenadante y después se liofilizó. El producto liofilizado se dejó reposar a 4 °C.

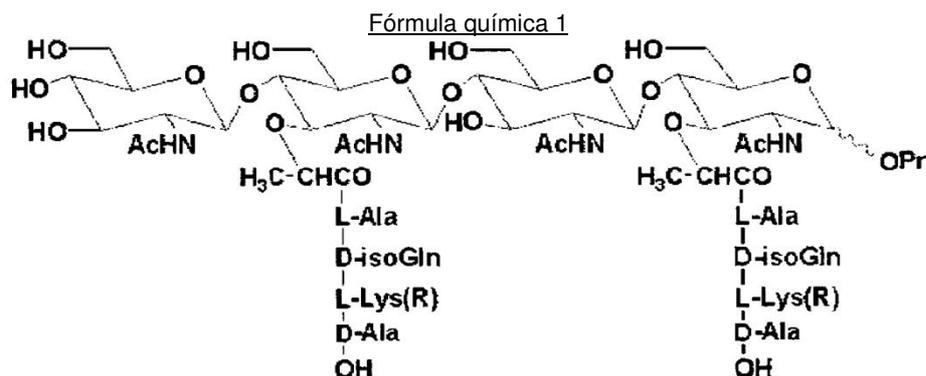
Una columna (26 x 15,5 cm) se cargó con 60 ml de resina Toyopearl HW55S y se equilibró con agua destilada estéril a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min y después 1 mg de la solución de PG soluble preparados como se ha descrito anteriormente se cargaron en la columna y se fraccionó en un volumen predeterminado. Cada una de las fracciones se diluyó agua destilada estéril para obtener una solución 100X. Se usaron 10 µl de cada solución diluida para identificar la actividad PO.

La actividad PO se identificó del siguiente modo: A 10 µl de cada una de las soluciones diluidas se añadieron 30 µl de la hemolinfa de larvas de *T. molitor* (aproximadamente 280 µg de la proteína hemolinfa) y después se incubaron a 30 °C durante 5 minutos. Se añadieron 435 µl de tampón Tris 20 mM (pH 8,0) e inmediatamente se añadieron 5 µl de una solución de CaCl₂ 1M (10 mM de una concentración final). Se añadieron 4 µl de una solución de 4-metilcatecol (4-MC) 250 mM y 16 µl de la solución de éster de 4-hidroxiprolina (4-HP) 625 mM y se mezclaron. La mezcla se dejó reposar en un baño a temperatura constante de 30 °C. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 520 nm usando un espectrofotómetro en el momento que muestra la mayor variación de colores, en comparación con la variación de colores de la hemolinfa que tiene Ca²⁺ solo.

Las fracciones que muestran actividad de fenoloxidasas (PO) se recogieron y se concentraron usando un evaporador rotatorio a 4 °C. La solución concentrada se cargó de nuevo sobre la misma columna equilibrada con agua destilada a un caudal de 0,2 ml/min. Las fracciones que contienen PGLS se combinaron y almacenaron a 4 °C hasta su uso. Para determinar que el PGLS purificado originado de Lys-PG de *S. aureus*, los inventores analizaron la composición de aminoácidos de PGLS, que fue la misma composición de aminoácidos (D-Glu: L-Gly : D-Ala : L-Lys = 1 : 5 : 1 : 1) como se ha notificado para el Lys-PG de *S. aureus* (Schleifer, K. H. & Kandler, O. (1972) *Bacteriol Rev* 36, 407-477).

(3) Recogida de hemolinfa, ensayo de actividad de PO y síntesis de melanina

Larvas de *T. molitor* (gusano de la harina) se mantuvieron en una bancada de laboratorio en terrario que contiene salvado de trigo. La hemolinfa se recogió como se ha descrito anteriormente (Zhang, R, Cho, H. Y., Kim, H. S., Ma, Y. G., Osaki, T., Kawabata, S., Soderhall, K. & Lee, B L. (2003) *J Biol Chem* 278, 42072-42079). Se llevó a cabo un ensayo de PO de acuerdo con un procedimiento publicado previamente por los inventores (Park, J. W., Je, B R., Piao, S., Inamura, S., Fujimoto, Y., Fukase, K., Kusumoto, S., Soderhall, K., Ha, N. C. & Lee, B L. (2006) *J Biol Chem* 281, 7747-7755). Para analizar la síntesis de melanina, 2 µl de PGLS (50 µg/ml), 10 µl de Lys-PG insoluble (5 mg/ml), Lys-PG insoluble parcialmente diferido (5 mg/ml) o 5 µl del compuesto de Fórmula (I) (dímero de muropéptido sintético) (20 µg/ml) se inyectaron en larvas vivas. Seis µl de N, N', N"-triacetilcitosina se inyectaron a una concentración final de 6 mM. Tras 24 horas se estimó la aparición del pigmento de melanina.



(4) Inyección de PGLS y el compuesto de fórmula (I)

Se usaron moscas Oregon^R como cepa silvestre. PGRP-SA^{smel} es una línea portadora de la mutación *semmelweis* (C54Y) en PGRP-SA de *Drosophila* (Michel, T., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A. & Royet, J. (2001) *Nature* 414, 756-759). Diez nl de agua, PGLS (10 mg/ml-1) o el compuesto de fórmula (I) (10 mg ml⁻¹) se inyectaron en el tórax de las hembras adultas silvestres o PGRP-SA^{smel} (2-4 días de edad) usando un aparato Nanoject (Drummond). Después de la inyección, las moscas se incubaron durante 18 horas a 25 °C. El nivel de expresión de drosomicina se midió como se ha descrito anteriormente (Leulier, F., Parquet, C., Pili-Floury, S., Ryu, J. H., Caroff, M., Lee, W. J., Mengin-Lecreulx, D. & Lemaitre, B (2003) *Nat Immunol* 4, 478-484).

(5) Formación de complejos de PGRP/ PGLS

Tras Incubar 40 µg de PGRP-SA de *Drosophila* o PGRP-SA de *Tenebrio* con 400 µg de PGLS durante 30 min a 30 °C, la mezcla se inyectó en una columna Superdex S-200 HR 10/30 que se equilibró con tampón Tris 20 mM (pH 8,0) que contiene NaCl 150 mM. Las fracciones que contienen el complejo PGRP-SA/PGLS se combinaron. La presencia de PGRP-SA se monitorizó mediante SDS-PAGE.

(6) digestión parcial de PGLS y Lys-PG insoluble mediante lisozima

Para obtener fragmentos de Lys-PG oligomérico soluble que muestran actividad PO, se añadieron 10 µl de lisozima de clara de huevo de gallina (1 mg ml⁻¹, Wako) a 100 µl de PGLS purificado (800 µg ml⁻¹) y después se incubaron durante 5 min a 37 °C. El PGLS parcialmente digerido se llevó a ebullición durante 10 minutos y después se cargó en una columna Toyopearl HW-55S equilibrada con tampón Tris 20 mM (pH 8,0) a un caudal de 0,5 ml/min. Las fracciones que muestran actividad PO se combinaron. Para obtener Lys-PG polimérico insoluble parcialmente digerido, PG insoluble de *S. aureus* (40 mg) suspendido en tampón PBS (Ph 7,2) se incubó con 10 µg de lisozima durante 3 horas a 37 °C. Después de llevar a ebullición durante 10 minutos y centrifugar a 20.000 x g durante 10 minutos a 4 °C, el residuo en la fracción sedimentada se lavó 3 veces con urea 8M y 3 veces con agua destilada.

(7) Ensayo de unión de PGRP a Lys-PG insoluble digerido parcialmente

El ensayo de unión se realizó de acuerdo con el procedimiento publicado previamente (Park, J. W., Je, B R., Piao, S., Inamura, S., Fujimoto, Y., Fukase, K., Kusumoto, S., Soderhall, K., Ha, N. C. & Lee, B L. (2006) *J Biol Chem* 281, 7747-7755). Brevemente, 10 µg del PGRP-SA de *Tenebrio* purificado o de PGRP-SA de *Drosophila* se mezclaron con 40 µl de una suspensión al 50 % (v/v) del PG de *S. aureus* o *M. luteus* parcialmente digerido (500 µg) en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7D) durante 12 h a 4 °C en un agitador. El PGRP no unido en el sobrenadante y el PGRP unido en la fracción sedimentada se analizaron mediante SDS-PAGE.

(8) Identificación de GGBP1 de *Tenebrio* y serínproteasa modular asociada

Se preparó una solución de PGRP-SA (-) de *Tenebrio* a partir de la hemolinfa de *T. molitor* de acuerdo con el procedimiento publicado previamente usando una columna de afinidad acoplada a un compuesto de Fórmula I (Park, J. W., Je, B R., Piao, S., Inamura, S., Fujimoto, Y., Fukase, K., Kusumoto, S., Soderhall, K., Ha, N. C. & Lee, B L. (2006) *J Biol Chem* 281, 7747-7755). Esta solución contiene todos los componentes esenciales, a excepción de PGRP-SA de *Tenebrio* necesarios para la activación del sistema pro-PO mediante Lys-PG. El PGRP-SA de *Tenebrio* (40 µg) se incubó con Lys-PG (8 mg) insoluble parcialmente digerido en 200 µl de tampón PBS durante 12 h a 4 °C. Tras la incubación, el PGRP-SADE *Tenebrio* unido a Lys-PG insoluble se recuperó mediante centrifugación a 20.000 x g durante 10 min a 4 °C, se lavó 3 veces primero con Tris 20 mM (pH 8D) y después tampón Tris-HCl con 50 mM (pH 6D) El Lys-PG unido a PGRP-SA de *Tenebrio* recuperado se incubó con 25 ml de la solución de PGRP-SA (-) de *Tenebrio* (20 mg de proteína total) durante 3 horas a 4 °C. Después de eliminar el residuo insoluble mediante centrifugación, la mezcla se lavó dos veces con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 6D). Las proteínas unidas en el Lys-PG insoluble se extrajeron con 100 µl de 2x de tampón de carga de SDS-PAGE y después se separaron

mediante SDS-PAGE. Las bandas proteicas sobre el gen de poli(acrilamida) se transfirieron a una membrana de bifluoruro de polivinilideno y después las secuencias en N-terminal de las proteínas de 50 kDa (GNBP1 de *Tenebrio*) y 35 kDa (Serínproteasa modular de *Tenebrio*, MSP de *Tenebrio*) se determinaron en un secuenciador automático de aminoácidos en fase de gas (Applied Biosystem).

5

(9) Clonación de ADNc y secuenciación de nucleótidos de GNBP1 de *Tenebrio* y MSP de *Tenebrio*

Para la clonación del ADNc de GNBP1 de *Tenebrio*, se llevó a cabo la PCR usando el cebador sentido degenerado 5'-GARGCNTAYGARCCNAARGG -3' (SEC ID N° 8) y el cebador antisentido degenerado 5'-ATRTCYTCYTGRTRTTTNGC-3' (SEC ID N° 9) (R = A/G; Y = C/T; N = A/T/G/C) en un procedimiento conocido (Buck y Axel, Cell 65: 175-187, 1991; Riddle et al., Cell 75: 1401-1416, 1993; Krauss et al., Cell 75:1431-1444, 1993). Para 5'- y 3'-RACE se usó un procedimiento de amplificación de ADNc SMART RACE (CLONTECH). Todos los productos de la PCR se clonaron en pCR4-TOPO (Invitrogen) usando el procedimiento de clonación TOPO TA (Invitrogen). La secuenciación se llevó a cabo usando el procedimiento de secuenciación 3130x1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

10

La clonación del ADNc de MSP de *Tenebrio* también se realizó del mismo modo usando 5'-AARGAYAAITGYGAYGARAT-3' (SEC ID N° 10 y 5'-GCTGTGTCGCCANGGRTARTC-3' (SEC ID N° 11) como cebadores sentido y antisentido degenerados, respectivamente.

15

2. Resultados y discusión

(1) PGLS activa la vía Toll y el sistema pro-PO

20

La blp de *Achromobacter* es una enzima de tipo lisostafona que hidroliza los enlaces peptídicos en el puente penta-Gly presente en el PG de *S. aureus* (Li, S., Norioka, S. & Sakiyama, F. (1998) J Biochem (Tokio) 124, 332-339). Por tanto, cabía esperar que la blp generara fragmentos de PG poliméricos solubles a partir de PG insoluble con residuos de Gly unidos a los péptidos principales (Fig. 1). Los fragmentos de Lys-PG poliméricos solubilizados (PGLS) se obtuvieron usando la blp de PG de *S. aureus*. Se ha previsto que el PGLS sea un muropeptido polimerizado unido por enlaces β -1,4 glicosídicos entre los azúcares, no mediante puentes penta-Gly entre los péptidos principales. Por tanto, el PGLS debería tener múltiples sitios de unión para PGRP-SA porque contiene varios motivos muropeptídicos. Usando PGLS purificado adicionalmente, los inventores confirmaron que las proteínas recombinantes PGRP-SA de *Drosophila* y PGRP-SA de *Tenebrio*, que se expresaron y purificaron en un sistema de cultivo de células de insecto en baculovirus, ambas se unen a PGLS que se demostró usando una columna de exclusión por tamaño (Fig. 13 (B) y (C)). No obstante, una mezcla de PGRP-SA de *Tenebrio* y el compuesto de fórmula (I) mostró el mismo perfil de elución que el PGRP-SA de *Tenebrio* solo, lo que sugiere que el compuesto de fórmula (I) se puede unir a únicamente una molécula de PGRP-SA de *Tenebrio*.

25

Los inventores encontraron que PGLS indujeron de un modo consistente una actividad PO sólida cuando se añadían a hemolinfa de *Tenebrio* (Fig. 2). Después, los inventores inyectaron PGLS en moscas silvestres y mutantes PGRP-SA^{seml} y después se monitorizó la expresión del gen que codifica drosomicina con el fin de analizar si el PGLS puede activar la vía Toll de *Drosophila in vivo* (Fig. 3). Las moscas silvestres con PGLS inyectado indujeron la expresión de drosomicina con normalidad, pero las moscas mutantes PGRP-SA^{seml} carecían de la inducción del péptido antimicrobiano, lo que demuestra que el PGLS activa la vía Toll de un modo dependiente de PGRP-SA de *Drosophila*. En contraste agudo con esto, el compuesto de Fórmula (I) no indujo expresión de drosomicina en moscas silvestres y mutantes PGRP-SA^{seml} (Fig. 3). Asimismo, el PGLS indujo fuertemente la síntesis de melanina cuando se inyectó en las larvas de *Tenebrio*, muy probablemente mediante activación del sistema pro-PO (Fig. 4). Estos Resultados sugieren que el fragmento de PG que contiene múltiples sitios de unión para PGRP-SA y que puede inducir las vías Toll y pro-PO. Recientemente, Ligoxygakis y col. sugirieron que el PG debería procesarse para aumentar el número de extremos reductores para activar la vía de señalización Toll (Filipe, S. R, Tomasz, A. & Ligoxygakis, P. (2005) EMBO Rep 6, 327-333). Dado que el PGLS y el compuesto de Fórmula (I) contienen un extremo reductor cada uno pero solo PGLS puede inducir activación de la cascada Toll y pro-PO, lo que puede sugerir que los extremos reductores pueden no ser importantes-

30

(2) La unión proximal de PGRP-SA de *Tenebrio* es necesaria para la activación de la cascada de pro-PO

Los inventores determinaron la concentración mínima de PGLS para activación de la cascada pro-PO dependiente de PG. La actividad PO se midió mediante incubación de la proteína PGRP-SA de *Tenebrio* en la solución PGRP-SA (-) *Tenebrio* con diferentes cantidades de PGLS. Sorprendentemente, la actividad PO se vio inhibida intensamente al nivel basal a una concentración alta de PGLS, lo que muestra una clásica curva de dosis-respuesta con forma de campana (Fig. 5). Además, la concentración de PGLS en la que se produjo la actividad PO máxima podría elevarse significativamente con una actividad PO más fuerte si se añadía a la mezcla de reacción la proteína exógena PGRP-SA de *Tenebrio* mixture (Fig. 5). Estas observaciones implican que demasiado PGLS actúa como inhibidor competitivo que secuestra moléculas de PGRP-SA, lo que altera el complejo activador inicial compuesto por PGRP-SA y Lys-PG de *Tenebrio*. También indica que la cantidad de PGRP-SA de *Tenebrio* por unidad de unión de Lys-PG es importante en la formación del complejo de activación inicial para la cascada pro-PO (los recuadros de

35

la Fig. 5). Similares observaciones se notificaron en el reconocimiento de β -1,3-glucano mediante el factor G del cangrejo herradura y el sistema pro-PO de cangrejo de río (Muta, T., Seki, N., Takaki, Y., Hashimoto, R, Oda, T., Iwanaga, A., Tokunaga, F. & Iwanaga, S. (1995) J Biol Chem 270, 892-897; and Soderhall, K. & Unestam, T. (1979) Can J Microbiol. 25, 406-414).

5 Los inventores investigaron adicionalmente la etapa de activación inicial para el reconocimiento de Lys-PG usando PGRP-SA de *Drosophila* que puede unirse a PGLS con una afinidad similar a PGRP-SA de *Tenebrio* (Fig. 4), pero el PGRP-SA de *Drosophila* no puede inducir activación de la cascada pro-PO de *Tenebrio* (3ª columna de la Fig. 6). La actividad PO inducida por PGLS se vio intensamente inhibida por la adición de PGRP-SA de *Drosophila* a la solución PGRP-SA (-) de *Tenebrio* incluso en presencia de PGRP-SA exógena de *Tenebrio*. Esto implica que el complejo activador inicial de la cascada pro-PO se anula mediante la sustitución del sitio para PGRP-SA de *Tenebrio* por PGRP-SA de *Drosophila* a pesar de la presencia de PGRP-SA de *Tenebrio* unido a PGLS. Estos resultados sugieren fuertemente de nuevo que la agrupación de PGRP-SA en Lys-PG o la unión proximal de PGRP-SA a Lys-PG es necesaria para el complejo activador inicial.

15 (3) Fragmentos de Lys-PG que acomodan al menos dos moléculas de PGRP-SA de *Tenebrio* activan el sistema pro-PO

20 Para determinar cuántas moléculas de PGRP-SA de *Tenebrio* constituyen el complejo activador inicial para el sistema pro-PO, se generaron diversas longitudes de cadenas de azúcar de PG mediante digestión parcial de PGLS con lisozima y se fraccionaron después de acuerdo con su longitud en una columna de exclusión por tamaño (Fig. 7 (a) y (b)). Tres fracciones (fracciones 7, 10 y 14) mostraron actividad PO cuando cada fracción se incubó con la PGRP-SA (-) de *Tenebrio* en presencia de la proteína PGRP-SA de *Tenebrio* y Ca^{2+} . De estos, los fragmentos de PG en la fracción 14 deberían ser una unidad más pequeña que es capaz de inducir activación de la cascada pro-PO. Después de añadir una cantidad en exceso de la proteína PGRP-SA de *Tenebrio*, los inventores analizaron cuántas moléculas de PGRP-SA se pueden unir a los fragmentos de PG en la fracción 14 monitorizando el peso molecular aparente en una columna de exclusión por tamaño. El peso molecular aparente del complejo entre los fragmentos de PG en la fracción mixta con PGRP-SA de *Tenebrio* se determine como de aproximadamente 40 kDa, lo que indica que el fragmento de PG se une a dos moléculas de PGRP-SA. Cuando el complejo fragmento de PG / PGRP-SA de *Tenebrio* se incubó con la solución PGRP-SA (-) de *Tenebrio*. Indujo la actividad PO incluso sin añadir PGRP-SA de *Tenebrio*, lo que demuestra claramente que dos moléculas de PGRP-SA de *Tenebrio* son suficientes para inducir esta actividad (Fig. 9 (B)). No obstante, el compuesto de Fórmula (I) y un monómero de muropéptido que se generó mediante una incubación prolongada de PGLS con lisozima no cambió el peso molecular de la proteína PGRP-SA de *Tenebrio* en la columna de exclusión por tamaño (Fig. 9 (B)). Esta observación indica que el compuesto de Fórmula (I) y el monómero de muropéptido se unen a solo una molécula de PGRP-SA. Cabe destacar que el compuesto de Fórmula (I) solo se unió a una molécula de PGRP-SA aunque contiene dos copias de muropéptido. Los inventores han propuesto que esto es un resultado de hidrancia estérica mediante la primera molécula de PGRP-SA unida en el compuesto de Fórmula (I) porque las dos unidades de unión en el compuesto de Fórmula (I) se localizan demasiado cerca. No obstante, cabe esperar que el dímero de muropéptido que está reticulado mediante un puente penta-Gly acomode dos moléculas de PGRP-SA porque el puente penta-Gly proporciona suficiente espacio para la unión de dos moléculas de PGRP-SA. De forma consistente, el compuesto de Fórmula (I) no pudo activar las vías Toll y pro-PO como se ha demostrado anteriormente, mientras que se ha notificado que el dímero de muropéptido induce activación de la vía Toll (Filipe, S. R, Tomasz, A. & Ligoxygakis, P. (2005) EMBO Rep 6, 327-333). Por tanto, se puede concluir que el fragmento de PG que acomoda dos moléculas de PGRP-SA es la unidad mínima que podría inducir los acontecimientos corriente abajo y tiene como resultado la activación del sistema pro-PO.

45 (4) La lisozima presente una forma procesada de PG par alas señales de reconocimiento de PG

50 El PG de bacterias grampositivas más natural está muy reticulado entre las cadenas de glicano, que es diferente de las de PGLS. PGRP-SA podría tener un exceso limitado de Lys-PG naturales por su estructura altamente reticulada. Además, los inventores observaron previamente que los Lys-PG insolubles, que se habían roto mediante ultrasonidos, inducían una fuerte actividad PO in vitro, mientras que los Lys-PG intactos no indujeron activación de pro-PO en un momento dado (Park, J. W., Je, B R., Piao, S., Inamura, S., Fujimoto, Y., Fukase, K., Kusumoto, S., Soderhall, K., Ha, N. C. & Lee, B L. (2006) J Biol Chem 281, 7747-7755). Con el fin de soltar la estructura del PG mediante una enzima presente en hemolinfa de insecto, los inventores eligieron lisozima porque puede hidrolizar casi todos los tipos de PG bacteriano intacto ((Keep, N. H., Ward, J. M., Cohen-Gonsaud, M. & Henderson, B (2006) Trends Microbiol 14, 271-276). Los inventores realizaron la digestión parcial de Lys-PG tanto de *S. aureus* como de *M. luteus* con lisozima in vitro. De hecho, los Lys-PG parcialmente digeridos indujeron una rápida y fuerte actividad PO en la hemolinfa de *Tenebrio* in vitro (datos no mostrados). Además, cuando los Lys-PG parcialmente digeridos se inyectaron en larvas de *Tenebrio*, se observó síntesis de melanina más rápida y más fuerte en todas las larvas inyectadas comparados con Lys-PG intactos insolubles (Fig. 14 (B) No obstante, cuando un inhibidor de la lisozima, N, N', N"-triacetilchitotriosa, se coinyectó con el Lys-PG intacto, no se pudo observar síntesis de melanina (Fig. 14 (D)), lo que sugiere que los el Lys-PG intactos no pueden activar la cascada de pro-PO sin la actividad enzimática de la lisozima sin una degradación parcial previa mediante lisozima.

Para determinar el papel de la lisozima en el reconocimiento de Lys-PG por PGRP-SA in vitro, los inventores examinaron la unión de PGRP-SA al Lys-PG parcialmente digerido usando PGRP-SA de *Drosophila* y PGRP-SA de *Tenebrio*. Para sorpresa de los inventores, la digestión parcial de Lys-PG mediante lisozima aumentó espectacularmente la unión de PGRP-SA de *Drosophila* y PGRP-SA de *Tenebrio* (Calles 5 y 3 en las Fig. 9 (A) y (B), respectivamente). La interacción potenciada entre PGRP-SAs y PG debería tener como resultado la unión proximal de PGRP-SA en PG, lo que conduce a la activación de las vías Toll y pro-PO. El estudio de los inventores presenta las pruebas bioquímicas in Vitro de que la lisozima desempeña un papel crucial en la potenciación del acceso de PGRP-SA de *Drosophila* o PGRP-SA de *Tenebrio* al Lys-PG insoluble en las vías Toll y pro-PO, aunque no se puede excluir como posibilidad que otras proteínas que muestran actividad de tipo lisozima procesen PG para la unión de PGRP-SA.

Recientemente, un informe demostró que GGBP1 de *Drosophila* tiene una actividad enzimática que hidroliza los Lys-PG reticulados de *M. luteus* pero no los Lys-PG altamente reticulados de *S. aureus* (Wang, L., Weber, A. N., Atilano, M. L., Filipe, S. R., Gay, N. J. & Ligoxygakis, P. (2006) EMBO J 25, 5005-5014). Dado que encontraron que la GGBP1 posee actividad de tipo lisozima, los inventores propusieron que la GGBP1 de *Drosophila* presenta una forma procesada de PG para la sensibilización mediante PGRP-SA de *Drosophila*. Considerando la limitada actividad de tipo lisozima de GGBP1 además del hecho de que la lisozima en la hemolinfa es activa en PG altamente reticulados, GGBP1 puede tener menos importancia para el procesamiento del PG que la lisozima de la hemolinfa. No obstante, la actividad de tipo lisozima limitada de GGBP1 puede desempeñar un importante papel en la amplificación o secuestro de la señal de reconocimiento.

(5) El complejo PGRP-SA/PG de *Tenebrio* recluta GGBP1 de *Tenebrio* y la serínproteasa modula multidominios de *Tenebrio* (MSP)

Con el fin de identificar los efectores inmediatos corriente abajo que reconocen las moléculas de PGRP-SA de *Tenebrio* agrupadas en Lys-PG parcialmente digeridos, el PGRP-SA de *Tenebrio* se incubó con el PG de *S. aureus* parcialmente digerido y el PG de *M. luteus* y, después, se añadió a la solución de PGRP-SA (-) de *Tenebrio* y después se sometió a análisis mediante SDS-PAGE. Como resultado, una proteína de 50 kDa (banda 1 en la Fig. 10) y una proteína de 35 kDa (banda 2 en la Fig. 10) se enriquecieron específicamente si PGRP-SA de *Tenebrio* estaba unido a Lys-PG parcialmente digerido (calles 2 y 5 en la Fig. 10). No obstante, PGRP-SA de *Tenebrio* unido al compuesto de Fórmula (i) acoplado a resina de sefarosa no reclutó las proteínas de 50 kDa y 35 kDa (calle 7 en la Fig. 10) en las mismas condiciones, lo que demuestra que las dos proteínas se reclutan como resultado de las moléculas de PGRP-SA agrupadas en Lys-PG. Adicionalmente, el PGRP-SA de *Drosophila* unido al PG parcialmente digerido no interactuó con las dos proteínas de *Tenebrio* (calle 3 en la Fig. 10).

Los inventores identificaron dos proteínas enriquecidas en PGRP-SA de *Tenebrio* agrupados en Lys-PG. La proteína de 50 kDa (banda 1) fue una GGBP1 de *Tenebrio* (GGBP1 de *Tenebrio*). Los 30 residuos en el extremo N de la proteína de 50 kDa (banda 1) exhibieron un 86,7 % y un 51,7 % de identidad de secuencia con las proteínas GGBP de *Tribolium castaneum* y GGBP1 de *Anopheles*, respectivamente (Fig. 11(A)). Se notificó que GGBP1 interactuaba físicamente con PGRP-SA para la activación de la vía Toll en *Drosophila* (Gobert, V., Gottar, M., Matskevich, A. A., Rutschmann, S., Royet, J., Belvin, M., Hoffmann, J. A. & Ferrandon, D. (2003) Science 302, 2126-2130), pero anteriormente no se había observado ninguna unión fuerte de GGBP1 a PGRP-SA. La observación de los inventores respalda que la agrupación de moléculas de PGRP-SA sobre el PG potencia la interacción de PGRP-SA con GGBP1 y que el homólogo de GGBP1 también puede estar implicado en la vía de pro-PO. Además, los inventores han revelado que la proteína de 35 kDa (banda 2) es una forma activa del SP modular multidominios a través de la secuenciación de aminoácidos internos y en N-terminal. Los 20 residuos en el extremo N de la proteína de 35 kDa (banda 2) exhibieron un 70,6 % de identidad de secuencia con el dominio serínproteasa de la serínproteasa de *T. castaneum* (Tc-SP, número de acceso XP_967486; Fig. 11(B)). Tc-SP contiene dominios de repetición del receptor A de lipoproteínas de baja densidad (LDL), un dominio sushi, un dominio de la proteína del control del complemento (CCP) y un dominio SP, pero no contiene un dominio clip que normalmente se encuentra en los miembros de las cascadas Toll y pro-PO. La identidad de la proteína de 35 kDa se confirmó adicionalmente mediante la presencia de la secuencia del dominio del receptor A de lipoproteínas de baja densidad en la banda proteica en condiciones no reductoras (Fig. 11(C)). Los inventores diseñaron la proteína de 35 kDa como la serínproteasa modular de *Tenebrio*. Recientemente se ha notificado que la proteasa 14 de hemolinfa de *Manduca sexta* que muestra una organización de dominios similar a la de la serínproteasa modular de *Tenebrio* era una enzima de iniciación del sistema de activación de pro-PO en *M. sexta* que se une a cimosán curdlan y levadura e interactúa con el peptidoglicano (Ji, C., Wang, Y., Guo, X., Hartson, S. & Jiang, H. (2004) J Biol Chem 279, 34101-34106; and Wang, Y. & Jiang, H. (2006) J Biol Chem 281, 9271-9278). En este estudio, los inventores presentaron las primeras pruebas de que la serínproteasa de tipo Ms-HP-14 se recluta e un complejo de activación inicial que consiste en el homólogo de GGBP1, PGRP-SA y PG en la vía de pro-PO.

Los presentes inventores proponen un modelo que resume los acontecimientos moleculares en el inicio de las vías Toll y pro-PO del siguiente modo (véase la Fig. 12). Aunque unas pocas moléculas de PGRP-SA (R) se unen a PG intacto, no pueden activar las respuestas inmunitarias (a). El PG de bacterias grampositivas se digiere parcialmente (b) o completamente (b') mediante la lisozima. Mientras que el PGH parcialmente digerido recluta más moléculas de PGRP-SA de unión a la superficie bacteriana (b), el PG completamente digerido no puede reclutar PGRP-SA en la

superficie bacteriana, lo que conduce a la lisis de la célula bacteriana (b'). Las moléculas de PGRP-SA agrupadas reclutan GGBP1 y una serínproteasa modular (MSP) que contiene dominios de repetición del receptor A de la lipoproteína de baja densidad (LDL), que tiene como resultado la activación de la serínproteasa modular (c). Después, la serínproteasa activada desencadena la cascada proteolítica que conduce a la activación de las vías Toll y de profenoloxidasa (pro-PO) para producir el péptido antimicrobiano (AMO) y melanina alrededor de las bacterias invasoras.

(6) Clonación de ADNc y secuenciación de GGBP1 de *Tenebrio* y MSP de *Tenebrio*

10 Como resultado de la clonación del ADNc de GGBP1 de *Tenebrio* se identificó que el polinucleótido de GGBP1 de *Tenebrio* consiste en 1326 ácidos nucleicos (SEC ID N° 3) que codifica de Met al codón de terminación y el polipéptido del mismo consiste en 442 aminoácidos (SEC ID N° 2).

15 Como resultado de la clonación del ADNc de MSP de *Tenebrio* se identificó que hay dos variantes que consisten en 1896 ácidos nucleicos y 632 aminoácidos; una variante que consiste en una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 4) una secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 5 y la otra variante que consiste en una secuencia de aminoácidos SEC ID N° 6) una secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 7. Dichas variantes se pueden generar porque los genes obtenidos se obtienen de varios tipos de insectos y, por tanto, se produce una diferente combinación de alelos mediante polimorfismo entre individuos.

20

<110> YUHAN CORPORATION

<120> Proteínas que activan un sistema de profenoloxidasa y genes que codifican las mismas

25

<130> PX0034

<150> KR10-2007-0013231

<151> 28-02-2007

30

<160> 11

<170> KopatentIn 1.71

35

<210> 1

<211> 193

<212> PRT

<213> *Tenebrio molitor*

40

<400> 1

ES 2 432 790 T3

Met₁ Leu Leu Ala Thr₅ Ile Ala Arg Gly Val₁₀ Tyr Gln Ile Ser Ala₁₅ Leu
 Ser Gly Ser Thr₂₀ Ile Pro Arg Ile Cys₂₅ Pro Glu Ile Ile Ser Arg Thr
 Arg Trp Gly₃₅ Ala Arg Thr Pro Leu₄₀ Glu Val Asp Tyr Ser₄₅ Leu Ile Pro
 Ile Glu Asn Val Val Val His₅₅ His Thr Val Thr His₆₀ Thr Cys Asp Ser
 Glu Ser Glu Cys Ala Thr₇₀ Leu Leu Arg Asn Val₇₅ Gln Asn Phe His Met₈₀
 Glu Asn Leu Glu Phe₈₅ His Asp Ile Gly Tyr₉₀ Asn Phe Leu Val Ala Gly₉₅
 Asp Gly Gln Ile₁₀₀ Tyr Glu Gly Ala Gly₁₀₅ Trp His Lys Val Gly₁₁₀ Ala His
 Thr Arg Gly₁₁₅ Tyr Asn Thr Arg Ser₁₂₀ Leu Gly Leu Ala Phe₁₂₅ Ile Gly Asn
 Phe Thr Ser Gln Leu Pro Val₁₃₅ Gln Lys Gln Leu Lys Val₁₄₀ Ala Lys Asp
 Phe Leu Gln Cys Gly Val₁₅₀ Glu Leu Gly Glu Leu₁₅₅ Ser Lys Asn Tyr Lys₁₆₀
 Leu Phe Gly Ala Arg₁₆₅ Gln Val Ser Ser Thr₁₇₀ Ser Ser Pro Gly Leu₁₇₅ Lys
 Leu Tyr Arg Glu₁₈₀ Leu Gln Asp Trp Pro₁₈₅ His Phe Thr Arg Ser₁₉₀ Pro Pro
 Lys

<210>2
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> *Tenebrio molitor*
 <400> 2

5

ES 2 432 790 T3

Met Phe Ala Lys Ala Ile Ile Leu Phe Leu Ile Leu Thr Thr Phe Gln
 1 5 10
 Cys His Gly Glu Phe Val Ile Pro Glu Val Thr Leu Glu Ala Tyr Glu
 20 25 30
 Pro Lys Gly Phe Arg Ala Ser Ile Pro Ala Leu Asn Gly Ile Gln Met
 35 40 45
 Phe Ala Phe His Gly Asn Ile Asn Lys Pro Ile Ser Gln Val Asp Pro
 50 55 60
 Gly Glu Tyr Ser Gln Asp Tyr Thr Ser Pro Thr Gly Asn Thr Trp Ser
 65 70 75 80
 Tyr Phe Asn Lys Asp Leu Lys Leu Lys Ala Gly Asp Val Ile His Tyr
 85 90 95
 Trp Val Phe Ile Gln Phe Leu Lys Leu Gly Tyr Arg Lys Asp Asn Gln
 100 105 110
 Val Trp Asn Val Thr Glu Leu Val Gln Leu Lys Asn Ser Ser Cys Glu
 115 120 125
 Thr Ser Pro Thr Thr Val Arg Gly Arg Ser Val Ile Cys Lys Asn Ser
 130 135 140
 Ile Ile Phe Glu Glu Asn Phe Asn Gly Glu Gly Ile Asp Thr Lys Lys
 145 150 155 160
 Trp Leu Ile Glu Gln Tyr Ile Pro Thr Tyr Thr Ser Leu Asp Tyr Glu
 165 170 175
 Phe Val Ser Tyr Gln Asn Asp Pro Thr Val Cys Phe Leu Asn Asp Asn
 180 185 190
 Lys Leu Phe Ile Lys Pro Lys Tyr Ala Gln Ser Glu Ala Glu Val Asn
 195 200 205
 Gly Glu Leu Asp Phe Arg Asn Arg Cys Thr Arg Lys Thr Asp Glu Glu
 210 215 220
 Cys Tyr Lys Lys Arg Glu Ile Tyr Phe Ile Ile Pro Pro Val Thr Ser
 225 230 235 240
 Gly Arg Leu Val Ser Asp Phe Arg Phe Lys Tyr Gly Lys Val Glu Ile
 245 250 255
 Arg Ala Lys Leu Pro Ala Gly Asp Trp Ile Tyr Pro Gln Met Tyr Leu
 260 265 270
 Glu Gln Val Asn Asp Pro Lys Lys Lys Ile Trp Ile Gly Tyr Ala Arg
 275 280 285
 Gly Asn Asn Lys Leu Leu Ala Asn Asn Gln Glu Asp Ile Gly Gly Asn
 290 295 300
 Leu Leu Phe Gly Gly Pro Val Leu Asp Pro Glu Glu Pro His Arg Ser
 305 310 315 320

ES 2 432 790 T3

Gln Tyr Leu Lys Ser Thr Arg Asn Ser Lys Pro Phe Thr Ser Gln Met
 325 330 335
 His Thr Leu Val Val Leu Trp Asp Glu Asp His Ile Ser Leu Gln Leu
 340 345 350
 Asn Gly Ile Glu Tyr Gly Lys Ile Asp Lys Arg Thr Met Gln Glu Val
 355 360 365
 Asn Phe Ala Asp Asn Asp Met Val Arg Leu Val Leu Gly Val Gly Val
 370 375 380
 Gly Gly Val Asn Asp Phe Pro Asp Asp Phe Arg Ser Gly Thr Asn Val
 385 390 395 400
 Lys Pro Trp Arg Asn Lys Asp Asn Lys Gln Val Lys Asn Phe Phe Thr
 405 410 415
 Ala Arg Ser Glu Trp Gly Lys Thr Trp Ser Gly Asp Asn Cys Ala Leu
 420 425 430
 Gln Val Asp Tyr Ile Lys Val Trp Ala Leu ***
 435 440

<210>3
 <211> 1329
 <212> ADN
 <213> *Tenebrio molitor*

5

<400>3

atgtttgcta aagcaataat attgtttcct atattaacca ctttccaatg tcatggagaa 60
 tttgttatac cggaagtgac gttagaagcg tacgaaccga aagggttag agcatcaatt 120
 ccagccttaa atggaataca gatgtttgct tttcatggga atataaaca accaatatcg 180
 caggttgatc ctggagagta cagtcaagat tatacttctc caactggtaa tacgtggtct 240
 tattttaaca aagacttgaa gctaaaagcc ggggatgtaa ttcattactg ggtatttatc 300
 caatttttaa aattaggata tagaaaagac aatcaagtgt ggaacgtaac agaactggtg 360
 cagttaaaaa actcatcctg tgagacaagt cctacaacag ttagaggaag atctgtgatt 420
 tgtaaaaaata gcattatfff tgaagaaaat ttcaacgggg aaggaattga caccaagaaa 480
 tggcttatcg aacaatatat tcccacgtat accagcctgg attatgaatt tgtttcttat 540
 caaatgacc caactgtatg ttttttaaat gacaataaac tatttataaa accaaaatat 600
 gcacaaagtg aagccgaagt aatggtgaa ctagatttta gaaacagatg tactaggaaa 660
 acagatgaag aatgttataa aaaacgagaa atttatttca taattccacc tgtgacttct 720
 ggaagacttg tttctgattt tcgatttaaa tatggtaaag ttgaaattag ggcgaagtta 780
 cctgcagggg actggatata tccacaaatg tacttagaac aagtaaatga tccaaaaaag 840
 aaaatatgga ttggttatgc cagaggaaat aataaattac tggcaaataa tcaggaagac 900
 attggaggca atttactfff tgggtggacct gtttagatc cagaagaacc tcatagaagt 960

10

ES 2 432 790 T3

caatatttga aaagtactcg gaacagcaaa ccttttaca gcaaatgca cactcttgtt 1020
 gtactttggg atgaagatca catttcgtta caattaaatg gtattgaata tggcaagatc 1080
 gataaaagga caatgcaaga agtaaacttt gcagataacg atatgggccg cttagttcctt 1140
 ggagtagggg tgggaggagt caatgatttc ccagatgatt tccgatcagg aactaacgta 1200
 aaaccttggc gcaacaaaga caataaaca gttaaaaatt tctttacggc aagaagtgaa 1260
 tgggggaaaa cttggagcgg tgacaattgt gctttacagg ttgattatat taaagtgtgg 1320
 gctttatag 1329

<210>4
 <211> 633
 <212> PRT
 <213> *Tenebrio molitor*
 <400> 4

5

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

10

ES 2 432 790 T3

Gln Gly Gly Cys Val Leu Pro Asn His Pro Glu Phe Gly Glu Trp Gln
 225 230 235 240
 Val Tyr Gly Ile Pro Gly Gln Phe Ser Pro Gly Met Val Ile Arg Ala
 245 250 255
 Gly Ala Thr Leu Arg Ile Gln Cys Lys Lys Arg Tyr Lys Leu Glu Gly
 260 265 270
 Lys Asn Ala Ile Phe Cys Glu Asn Gly Lys Trp Ser Asp Ala Val Gly
 275 280 285
 His Cys Leu Lys Leu Cys Pro Ser Ile Gln Ser Thr Ser Thr Met Arg
 290 295 300
 Val Thr Cys Ile Tyr Asn Lys His Glu Glu Thr Glu Asn Cys Thr Glu
 305 310 315 320
 Ala Val Glu Gly Thr Leu Val Arg Phe Asp Cys Ala Pro Phe Tyr Glu
 325 330 335
 Asp Leu Gly Leu Ser Arg His Pro Ile His Ile Cys Arg Asp Gly Ser
 340 345 350
 Trp Asp Gln Arg Arg Pro Glu Cys Thr Pro Val Cys Gly Gln Lys Ser
 355 360 365
 Val Asn Ala Gln Thr Leu Ile Val Asn Gly Lys Pro Val Lys Lys Gly
 370 375 380
 Asp Tyr Pro Trp Gln Val Ala Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Lys Glu Leu
 385 390 395 400
 Ile Cys Gly Gly Ser Leu Leu Asn Gln Arg Val Val Leu Thr Ala Ala
 405 410 415
 His Cys Ile Thr Asp Asp Lys Gly Lys Leu Leu Ser Lys Glu Asn Tyr
 420 425 430
 Met Val Ala Val Gly Lys Tyr Tyr Arg Pro Phe Asn Asp Ser Arg Asp
 435 440 445
 Arg Asn Glu Ala Gln Phe Ser Glu Val Lys His Met Phe Ile Pro Glu
 450 455 460
 Leu Tyr Lys Gly Ser Thr Gln Asn Tyr Val Gly Asp Ile Ala Ile Leu
 465 470 475 480
 Val Thr Arg Val Thr Phe Thr Leu Ser Arg Arg Val Gln Pro Val Cys
 485 490 495
 Ile Asp Tyr Gly Leu Lys Tyr Thr Ser Tyr Thr Asn Glu Phe Gly Tyr
 500 505 510
 Val Thr Gly Trp Gly Tyr Thr Leu Gln Asn Asp Lys Pro Ser Asp Val
 515 520 525
 Leu Lys Glu Leu Lys Val Pro Ala Val Ser Thr Glu Gln Cys Ser Ser
 530 535 540
 Ala Ile Pro Glu Asp Tyr Asp Ile Tyr Leu Thr His Asp Lys Leu Cys
 545 550 555 560

ES 2 432 790 T3

Ala Gly Tyr Leu Asp Asn Gly Thr Ser Val Cys Ser Gly Asp Ser Gly
 565 570 575
 Gly Gly Leu Val Phe Lys Phe Asp Gly Arg Tyr Tyr Val Thr Gly Ile
 580 585 590
 Val Ser Leu Ser Pro Gln Ala Ser Thr Gly Gly Cys Asp Thr Gln Gln
 595 600 605
 Tyr Gly Leu Tyr Thr Lys Val Gly Thr Tyr Ile Ser Asp Phe Ile Ile
 610 615 620
 Lys Thr Glu Ser Gln Phe Arg Pro ***
 625 630

5

<210>5
 <211> 1899
 <212> ADN
 <213> *Tenebrio molitor*

<400> 5

atgtgcaatg taagaacatt actgcaggtg atttgtttaa gtcttattgt tatacagaca	60
gtcgatagct acagttttgc actaagcaaa tttacgagaa ttcgacgcca agcccgacga	120
acctgtacaa gtactgagtt tgcttgcaaa tccggagaat gcatcgacga agataaagag	180
tgtgacggta ttgtggactg tacagatgcc agcgcagaga ccaacgcctg tcacaggatc	240
aatgccccca attatctggt cgggtgcaaa tatggcgctt gcatcaatcc ggacctggag	300
tgcgacggca aaccggactg catggacgga tccgacgaga aaacgtcgaa atgtaaacc	360
gacgatcctg ccccgagtg caaagcgaac gaggttcggg gcagctccgg tcagtgcac	420
ccggaggact tcaaatgtga cggcaaagcc gaggcaagg ataactccga cgagattaga	480
gccacctgct ggaacgtccg ctgtccagga ttcacgcaca agtgcaaata cggagcttgc	540
gtgagcggta acgccgagtg caacggaatc gtcgagtggt tcgacggttc agacgaagat	600
ccggcgattt gcaaaaactaa accgacacca aggccgacgc cgactccagg aactcccggc	660
ccgcaaccga cacagggtgg ctgctcttg ccgaatcacc cgaatttgg tgagtggcaa	720
gtgtacggaa ttcctggaca attctctcca ggaatggtga ttagagctgg tgcaacttg	780
cgaaatcagt gcaagaaacg ttacaaactc gaaggaaaa acgcatctt ttgcaaaat	840
gggaagtggg cggatgcagt cggtcattgc ttaaagttgt gcccttccat ccaaagtact	900
tcaacaatga gggttacttg tatttataac aaacacgaag agactgaaaa ctgcacagaa	960
gctgttgagg gtactcttgt gaggtttgat tgcgcaccgt tttatgaaga tttgggattg	1020
tcgagacatc ctattcatat ctgccgagat ggctcctggg accagaggag accagaatgt	1080
acaccagtgt gtgggcaaaa gtcagttaac gctcaaacat taattgtcaa cgggaaacc	1140
gtgaagaaag gagattatcc gtggcaagtc cgtttataca ctttgaacga taaagagttg	1200
atctgtggag gatccctctt aaaccagcga gtcgttctga cagctgcgca ttgtataact	1260

10

ES 2 432 790 T3

gacgataagg gaaaattggt atcaaaggaa aattatatgg tggctgtggg aaagtactac 1320
 cgaccattca atgactctcg agaccgcaac gaagcccagt tttctgaggt aaaacacatg 1380
 tttattcccc aactgtacaa gggttccaca caaaactacg tcggagatat cgctatcttg 1440
 gtaacacgag tcactttcac cttttccagg agagttcagc cgggtgtcat cgaactacggt 1500
 ttaaaataca cctcttatac aaacgaatgt ggatacgtta cgggttgagg ttactactctg 1560
 caaaatgaca aaccttccga cgtgctcaaa gaattgaaag ttccagcagt tagtacagaa 1620
 caatgtagta gcgctattcc tgaagattat gacatctacc ttacacacga taaactgtgc 1680
 gccggctatt tagacaatgg tacttccgtg tgtagcggag acagtggagg aggtttgggtg 1740
 tttaaatttg atggcaggta ctacgttact gggattgtga gtctttctcc acaagcatca 1800
 acaggcggct gtgatactca acaatatggt ctttatacaa aggttggcac ctacatttcg 1860
 gattttatta tcaaaacgga atcgagttt aggccataa 1899

5 <210>6
 <211> 633
 <212> PRT
 <213> *Tenebrio molitor*

10 <400> 6

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

ES 2 432 790 T3

Tyr Gly Ala Cys Val Ser Gly Asn Ala Glu Cys Asn Gly Ile Val Glu
 180 185 190
 Cys Phe Asp Gly Ser Asp Glu Asp Pro Ala Ile Cys Lys Thr Glu Pro
 195 200 205
 Thr Pro Lys Pro Thr Pro Thr Pro Gly Thr Pro Gly Pro Gln Pro Thr
 210 215 220
 Gln Gly Gly Cys Val Leu Pro Asn His Pro Glu Phe Gly Glu Trp Gln
 225 230 235 240
 Val Tyr Gly Ile Pro Gly Gln Phe Ser Pro Gly Met Ala Ile Arg Ala
 245 250 255
 Gly Ala Thr Leu Arg Ile Gln Cys Lys Lys Arg Tyr Lys Leu Glu Gly
 260 265 270
 Lys Asn Ala Ile Phe Cys Glu Asn Gly Lys Trp Ser Asp Ala Val Gly
 275 280 285
 His Cys Leu Lys Leu Cys Pro Ser Ile Gln Ser Thr Ser Thr Met Arg
 290 295 300
 Val Thr Cys Ile Tyr Asn Lys His Glu Glu Thr Glu Asn Cys Thr Glu
 305 310 315 320
 Ala Val Glu Gly Thr Leu Val Arg Phe Asp Cys Ala Pro Phe Tyr Glu
 325 330 335
 Asp Leu Gly Leu Ser Arg His Pro Ile His Ile Cys Arg Asp Gly Ser
 340 345 350
 Trp Asp Gln Arg Arg Pro Glu Cys Thr Pro Val Cys Gly Gln Lys Ser
 355 360 365
 Val Asn Ala Gln Thr Leu Ile Val Asn Gly Lys Pro Val Lys Lys Gly
 370 375 380
 Asp Tyr Pro Trp Gln Val Ala Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Lys Glu Leu
 385 390 395 400
 Ile Cys Gly Gly Ser Leu Leu Asn Gln Arg Val Val Leu Thr Ala Ala
 405 410 415
 His Cys Ile Thr Asp Asp Lys Gly Lys Leu Leu Ser Lys Glu Asn Tyr
 420 425 430
 Met Val Ala Val Gly Lys Tyr Tyr Arg Pro Phe Asn Asp Ser Arg Asp
 435 440 445
 Arg Asn Glu Ala Gln Phe Ser Glu Val Lys His Met Phe Ile Pro Glu
 450 455 460
 Leu Tyr Lys Gly Ser Thr Gln Asn Tyr Val Gly Asp Ile Ala Ile Leu
 465 470 475 480
 Val Thr Arg Val Thr Phe Thr Leu Ser Arg Arg Val Gln Pro Val Cys
 485 490 495
 Ile Asp Tyr Gly Leu Lys Tyr Thr Ser Tyr Thr Asn Glu Phe Gly Tyr
 500 505 510

ES 2 432 790 T3

Val Thr Gly Trp Gly Tyr Thr Leu Gln Asn Asp Lys Pro Ser Asp Val
 515 520 525
 Leu Lys Glu Leu Lys Val Pro Ala Val Ser Thr Glu Gln Cys Ser Ser
 530 535 540
 Ala Ile Pro Glu Asp Tyr Asp Ile Tyr Leu Thr His Asp Lys Leu Cys
 545 550 555
 Ala Gly Tyr Leu Asp Asn Gly Thr Ser Val Cys Ser Gly Asp Ser Gly
 565 570 575
 Gly Gly Leu Val Phe Lys Phe Asp Gly Arg Tyr Tyr Val Thr Gly Ile
 580 585 590
 Val Ser Leu Ser Pro Gln Ala Ser Thr Gly Gly Cys Asp Thr Gln Gln
 595 600 605
 Tyr Gly Leu Tyr Thr Lys Val Gly Thr Tyr Ile Ser Asp Phe Ile Ile
 610 615 620
 Lys Thr Glu Ser Gln Phe Arg Pro ***
 625 630

5

<210>7
 <211> 1899
 <212> ADN
 <213> *Tenebrio molitor*

<400> 7

atgtgcaatg taagaacatt actgcaggtg atttgtttaa gtcttattgt tatacagaca	60
gtcgatagct acagttttgc actaagcaaa tttacgagaa ttcgacgccc agccccgacga	120
acctgtacaa gtactgagtt tgcttgcaaa tccggagaat gcatcgacga agataaagag	180
tgtgacggta ttgtagactg tacagatgcc agcgcagaga ccaacgcctg tcacaggatc	240
aaatgccccca attatctggt ccggtgcaaa tatggcgctt gcatcaatcc ggacctggag	300
tgcgacggca aaccggactg catggacgga tccgacgaga aagcgtcgaa atgtaaacc	360
gacgattcgt ccccgagtg caaagcgaac gagtttcggt gcagctccgg tcagtgcac	420
ccggaggact acaaatgcga cggcaaagcc gagtgcaagg ataactccga cgagattaga	480
gccacctgct ggaacgtccg ctgtccagga ttcacgcaca agtgcaaata cggagcttgc	540
gtgagcggta acgccgagtg caacggaatc gtcgagtgtt tcgacggttc agacgaagat	600
ccggcgattt gcaagactga accgacacca aaaccgacgc cgactccagg aactcccggc	660
ccgcaaccga cacaggggtg ctgctcttg ccgaatcatc ccgaatttg tgagtggcaa	720
gtgtacggaa ttcttgaca attctctcca ggaatggcga ttagagctgg tgcaacttg	780
cgaatacagt gcaagaaacg ttacaaactc gaaggaaaaa acgcatctt ttgcgaaat	840
gggaagtggc cggatgcagt cggtcattgc ttaaagttgt gcccttccat ccaaagtact	900
tcaacaatga gggttacttg tatttataac aaacacgaag agactgaaaa ctgcacagaa	960

10

ES 2 432 790 T3

gctggtgagg gtactcttgt gaggtttgat tgcgcaccgt tttatgaaga tttgggattg 1020
 tcgagacatc ctattcatat ctgccgagat ggttcctggg accagaggag accagaatgt 1080
 acaccagtgt gtgggcaaaa gtcagttaac gctcaaacat taattgtcaa cgggaaaccc 1140
 gtgaagaaag gagattatcc atggcaagtc gcgttataca ctttgaacga taaagagttg 1200
 atctgtggag gatccctctt aaaccagcga gtcgttctga cagctgcgca ttgtataact 1260
 gacgataagg gaaaattggt atcaaaggaa aattatatgg tggctgtggg aaagtactac 1320
 cgaccattca atgactctcg agaccgcaac gaagcccagt tttccgaggt aaaacacatg 1380
 tttattccag aactgtacaa gggttccaca caaaactacg tcggagatat cgctatcttg 1440
 gtaacacgag tcactttcac cctttccagg agagttcagc cgggtgtgcat cgactacggt 1500
 ttaaaataca ctccttatac aaacgaatth ggatacgtta cgggttgggg ttacactctg 1560
 caaatgaca aaccttccga cgtgctcaaa gaattgaaag ttccagcagt tagtacagaa 1620
 caatgtagta gcgctatacc tgaagattat gacatctacc ttacacacga taaactgtgc 1680
 gctggctatt tagacaatgg tacttccgtg tgtagcggag acagtggagg aggtttgggt 1740
 tttaaatttg atggcaggta ctacgttact gggattgtga gtctttctcc acaagcatca 1800
 acaggcggct gtgatactca acaatatggt ctttatacaa aggttggcac ctacatttgc 1860
 gattttatta tcaaaacgga atcgcagttt aggccataa 1899

- 5 <210>8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
 <223> Cebador directo

- <400> 8
 gargcntayg arccnaargg 20

- 15 <210>9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
 <223> Cebador inverso

- <400> 9
 atrtcytcytrtrttngc 20

- 25 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

- 30 <220>
 <223> Cebador directo

- <400> 10
 aargayaayt gygaygarat 20

- 35 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

- 40

ES 2 432 790 T3

<220>

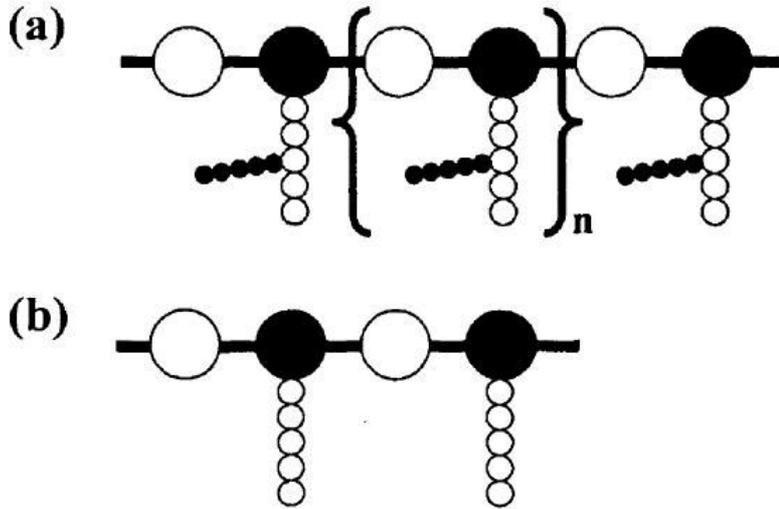
<223> Cebador inverso

5 <400> 11
gcytgytgcc anggartac 20

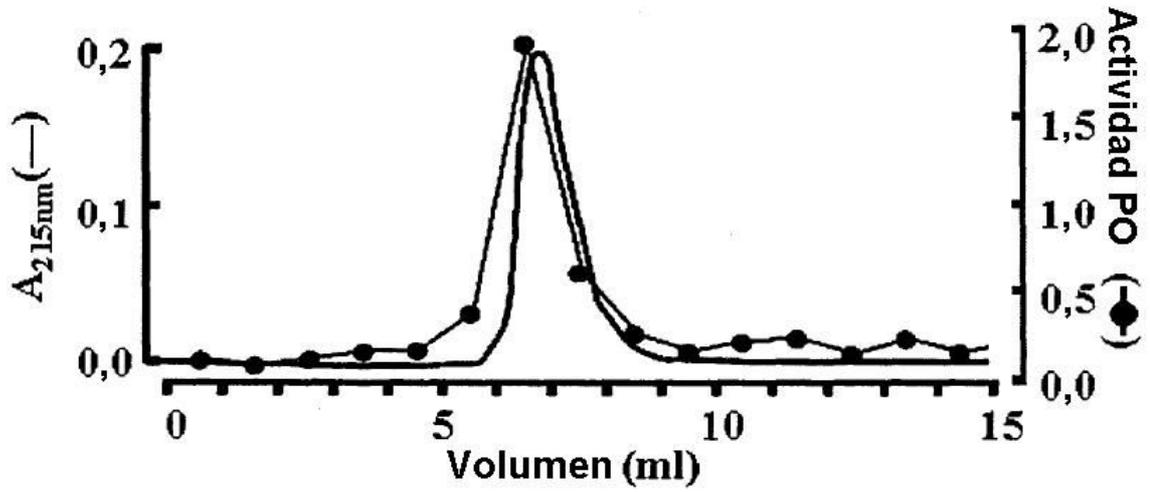
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de unión 1 de bacterias gramnegativas derivada de *Tenebrio molitor* (*Tenebrio* GNBP1), que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEC ID N° 2.
2. Un polinucleótido que codifica la GNBP1 de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 2.
- 10 3. El polinucleótido de la reivindicación 2, que tiene una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEC ID N°: 3.
4. Un procedimiento de detectar infección bacteriana en una muestra, comprendiendo el procedimiento:
- 15 (a) cargar una proteína de reconocimiento de peptidoglicano derivada de *Tenebrio molitor* (PGRP-SA de *Tenebrio*) que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 1 en una muestra y, después, realizar una incubación de la misma.
- (b) cargar una GNBP1 de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 2 en la mezcla de incubación de la etapa (a) y, después, realizar una incubación; y
- 20 (c) detectar reactividad entre la proteína y la muestra en la mezcla de incubación de la etapa (b).
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la muestra es sangre para transfusión, sangre de mamífero, hortalizas, carnes, frutas, alimentos cocinados o no cocinados, agua corriente, agua subterránea, agua de lluvia o productos estériles.
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 4 o 5, que además comprende pretratar la muestra con una proteasa β -lítica (blp) y/o lisozima.
7. Un kit para detectar infección bacteriana en una muestra, que comprende:
- 30 un PGRP-SA de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 1, y una GNBP1 de *Tenebrio* que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° 2.
8. El kit de la reivindicación 7, en el que la muestra es sangre para transfusión, sangre de mamífero, hortalizas, carnes, frutas, alimentos cocinados o no cocinados, agua corriente, agua subterránea, agua de lluvia o productos estériles.
- 35 9. El kit de la reivindicación 7 u 8, que además comprende proteasa β -lítica (blp) y/o lisozima.

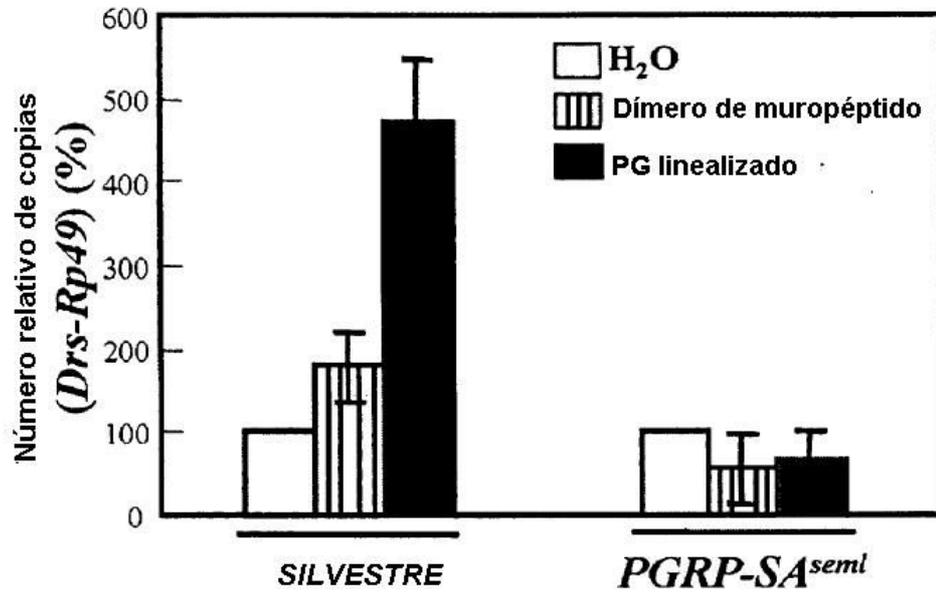
[Fig. 1]



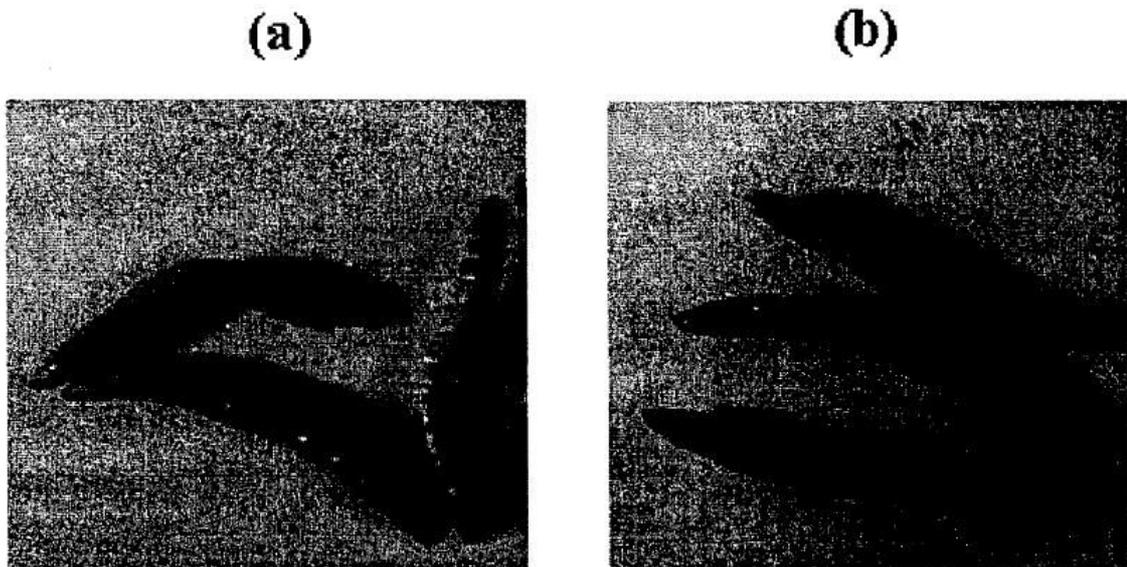
[Fig. 2]



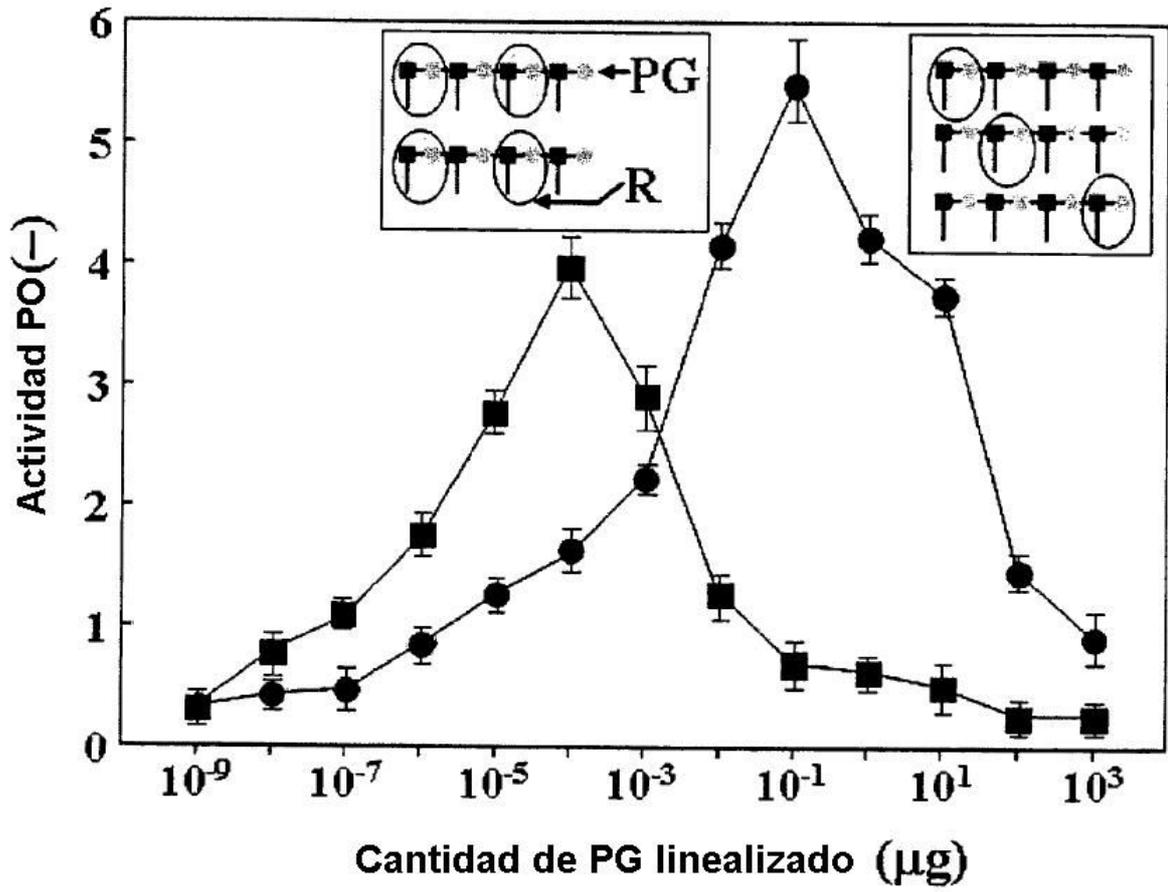
[Fig. 3]



[Fig. 4]

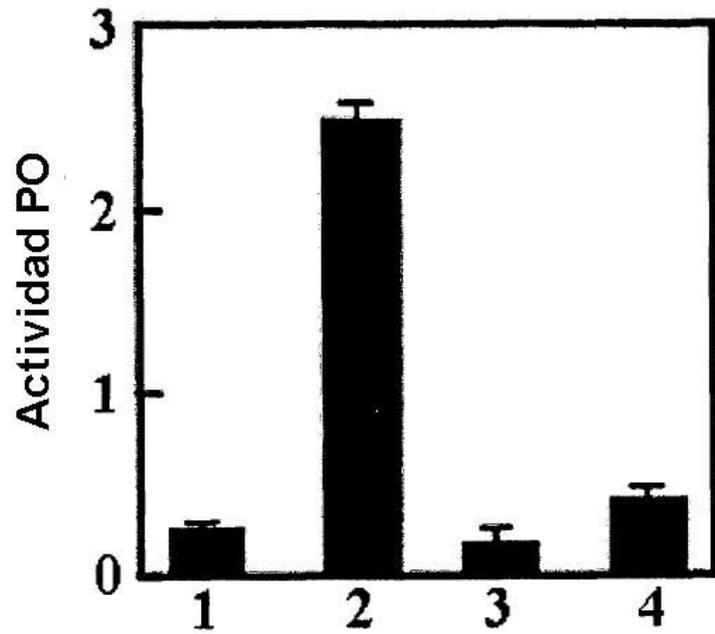


[Fig. 5]

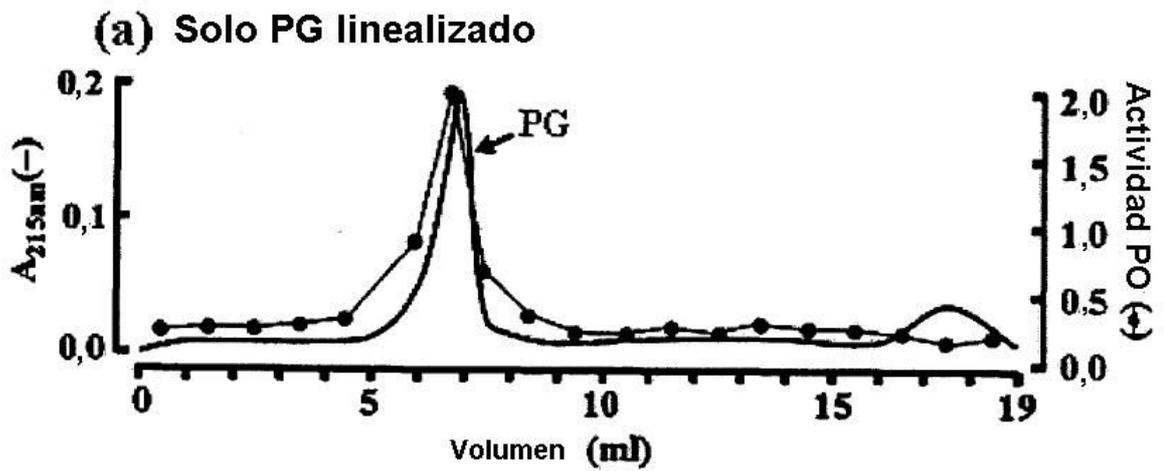


[Fig. 6]

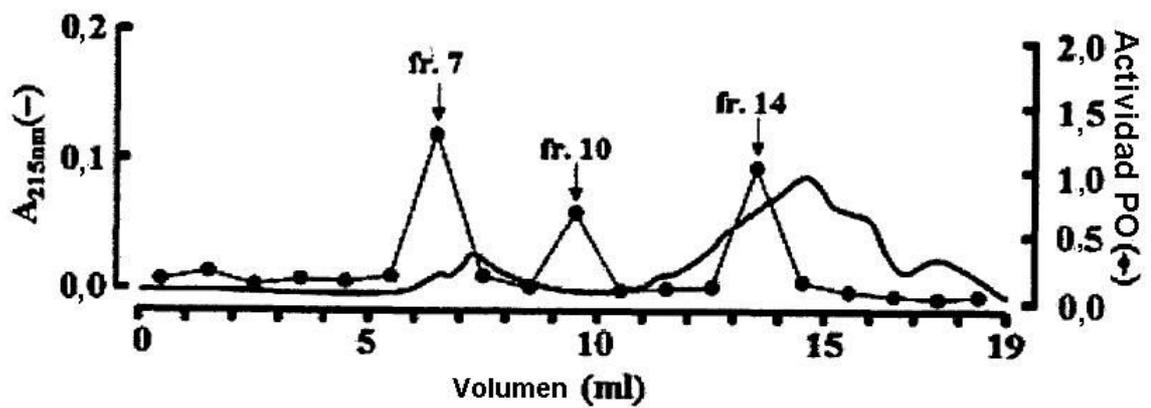
PG linealizado	+	+	+	+
PGRP-SA de <i>Drosophila</i>	-	-	+	+
PGRP-SA de <i>Tenebrio</i>	-	+	-	+
Solución deficiente en PGRP-SA de <i>Tenebrio</i>	+	+	+	+



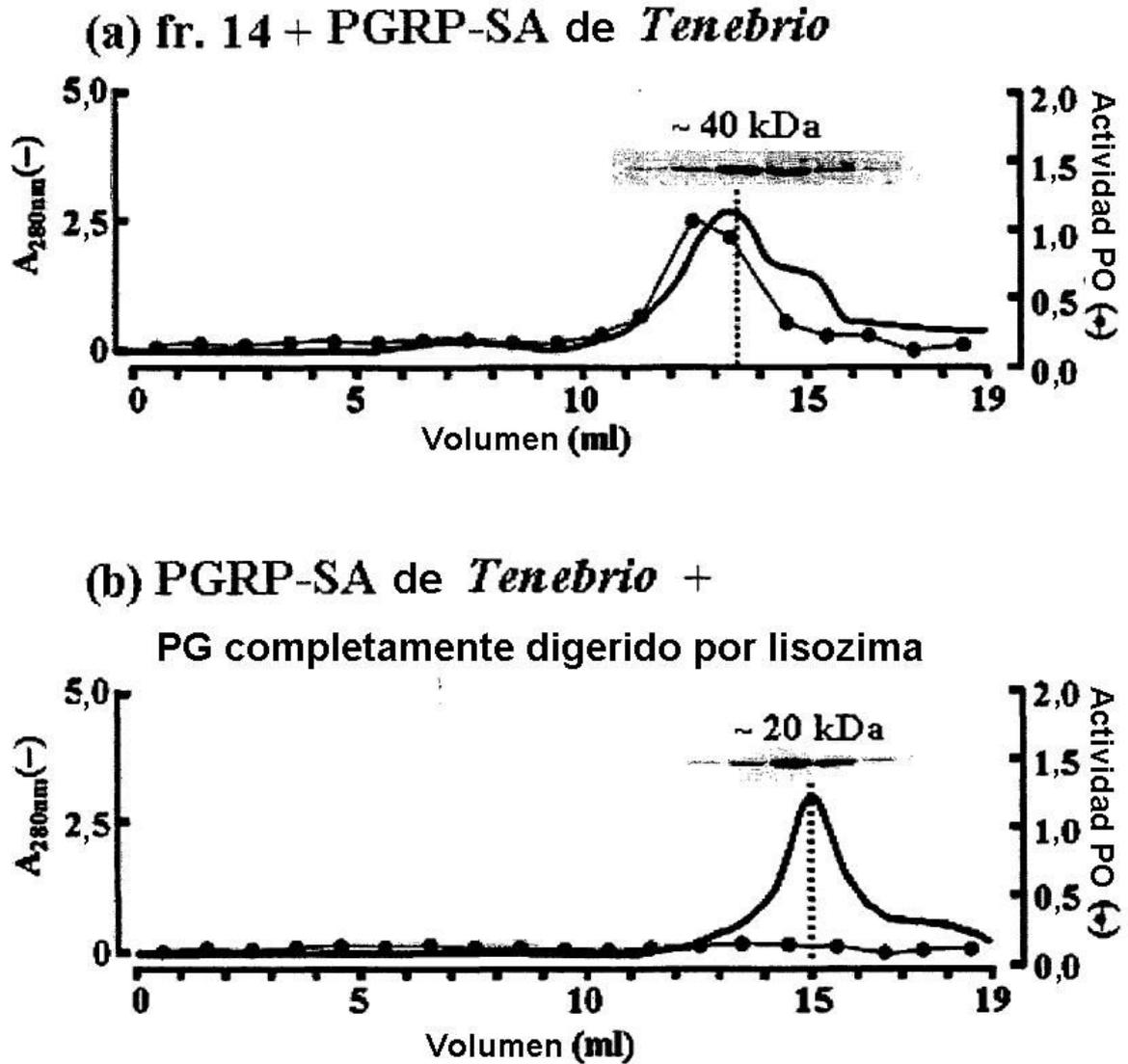
[Fig. 7]



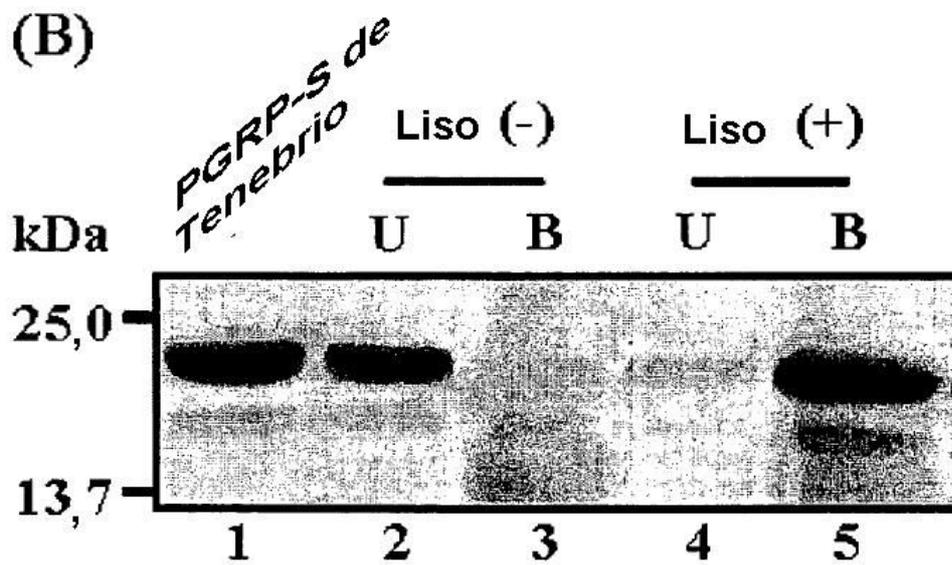
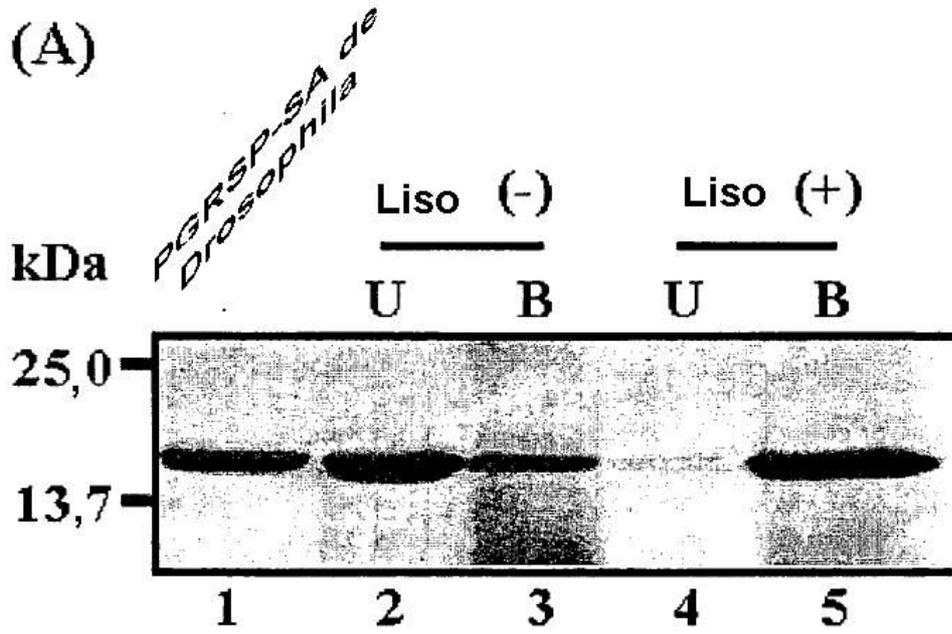
(b) Después del tratamiento con lisozima



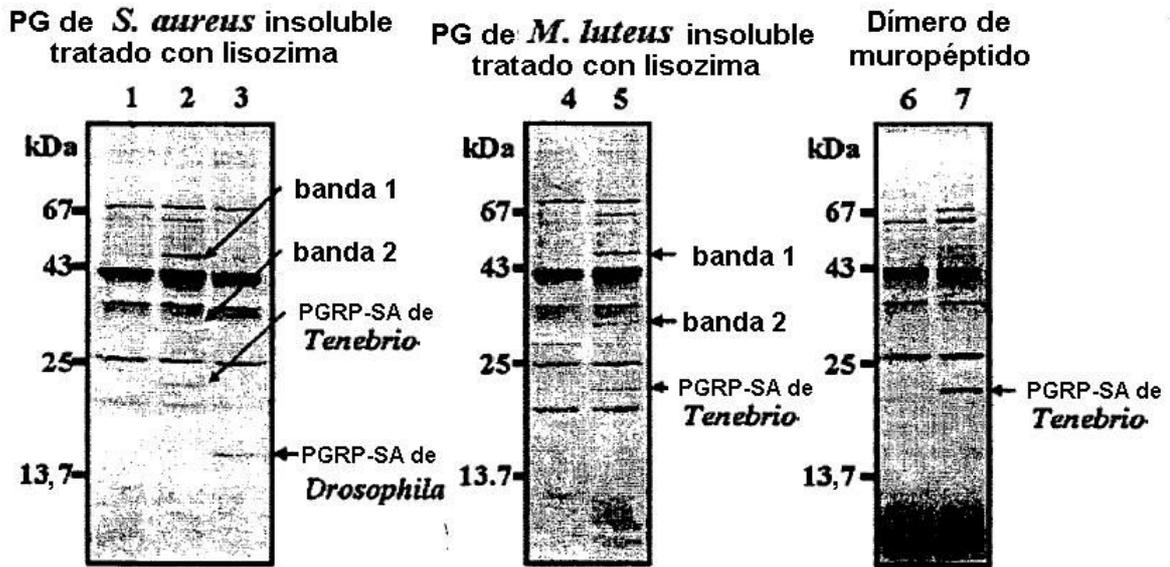
[Fig. 8]



[Fig. 9]



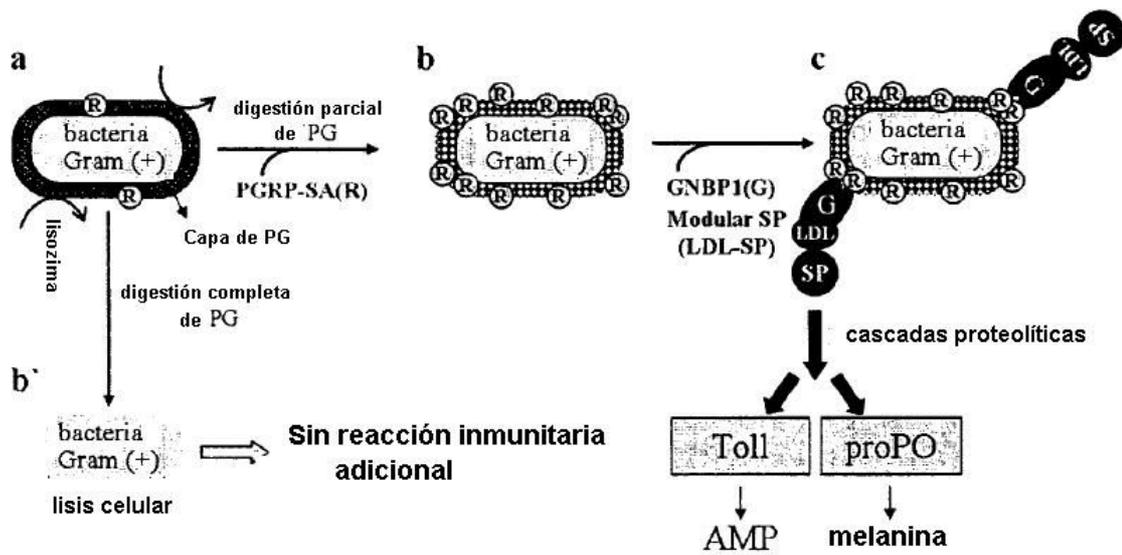
[Fig. 10]



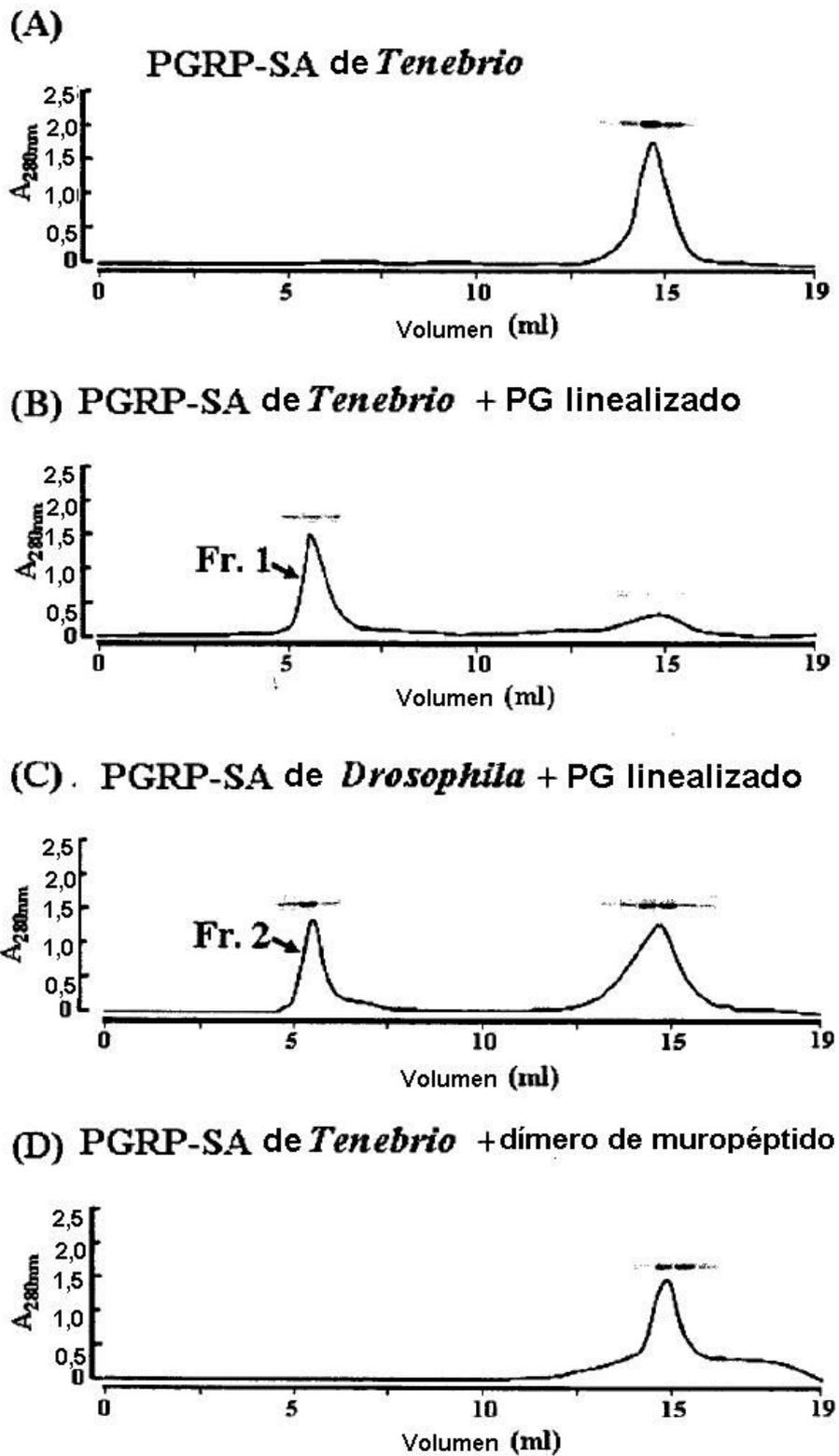
[Fig. 11]

(A)	banda 1	1	EFV IPEVTLE	AYEPKGFRAS	IPALNGIQMF	30
	Tc-GNBP	21	QFVIPDVTLE	AYAPKGFRAS	IPALPGIQMF	50
	Tm-GRP	18	QFEVPDALVE	VFRPRGLRVS	IPDQEGIKLF	47
	Ag-GNBP1	17	AYTIPAVRFE	YPTMRGFRAS	IPDTPGLQMF	46
	Dm-GNBP1	19	AYKIPTPTVE	LLET-GFSVS	IPDEEGVKVV	47
(B)	banda 2	1	IVNGKPVKKG	DYPWQQALYT	20	
	Tc-SP	369	IVNGKTAKRG	TYPWQAAIYT	388	
	Ms-HP14	405	VLGGERAQFG	ELPWQAGIYT	424	
	Ag-SP	336	IIGGRNVSIA	EMPWHMAIYK	355	
	Dm-SP	375	INNT-VV---	--PWHVGLYV	388	
(C)	Pico 1	1	DN SDEIRATCWNVRC	PGFTHK	21	
	Tc-SP	149	DR SDEIRATCWNLRC	PIYSYK	170	
	Pico 2	2	YGACINIALECDPK	14		
	Tc-SP	86	YGACISADLECDGK	99		

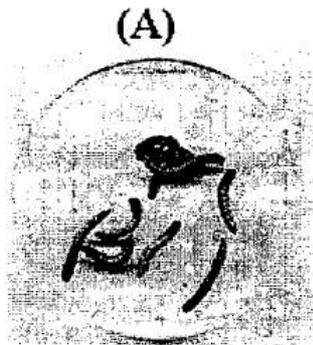
[Fig. 12]



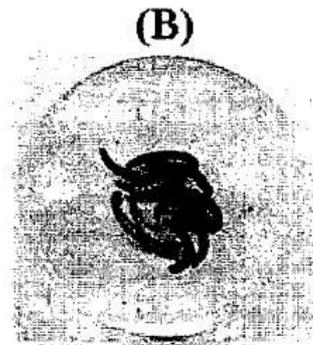
[Fig. 13]



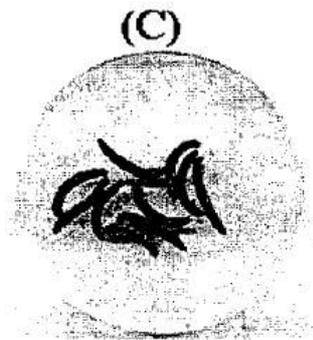
[Fig. 14]



Solución salina de insecto



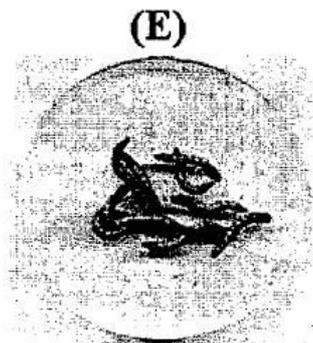
PG insoluble



PG insoluble
tratado con lisozima



PG insoluble +
inhibidor de lisozima



inhibidor de lisozima

[Fig. 15]

```

      10      20      30      40      50      60
ATGTTTGCTAAAGCAATAATATTGTTTCTTATATTAACCACTTTCCAATGTCATGGAGAA
H F A K A I I L F L I L T T F Q C H G E

      70      80      90      100     110     120
TTTGTATACCGGAAGTGACGTTAGAAAGCGTACGAACCGAAAAGGGTTTAGAGCATCAATT
F V I P E V T L E A Y E P K G F R A S I

      130     140     150     160     170     180
CCAGCCTTAAATGGAATACAGATGTTTGCTTTTCATGGGAATATAAACAAACCAATATCG
P A L N G I Q M F A F H G N I N K P I S

      190     200     210     220     230     240
CAGGTTGATCCTGGAGAGTACAGTCAAGATTATACTTCTCCAAGTGGTAATACGTGGTCT
Q V D P G E Y S Q D Y T S P T I G N T W S

      250     260     270     280     290     300
TATTTTAAACAAAGACTTGAAGCTAAAAGCCGGGGATGTAATTCATTACTGGGTATTTATC
Y F N K D L K L K A G D V I H Y W V F I

      310     320     330     340     350     360
CAATTTTAAAAATTAGGATATAGAAAAGACAATCAAGTGTGGAACGTAACAGAAGTGGTG
Q F L K L G Y R K D N Q V W N V T E L V

      370     380     390     400     410     420
CAGTTAAAAAACTCATCCTGTGAGACAAGTCTACAACAGTTAGAGGAAGATCTGTGATT
Q L K N S S C E T S P T T V R G R S V I

      430     440     450     460     470     480
TGTA AAAAATAGCATTATTTTTGAAGAAAATTTCAACGGGGAAAGGAATTGACACCAAGAAA
C K N S I I F E E N F N G E G I D T K K

      490     500     510     520     530     540
TGGCTTATCGAACAAATATATTTCCACGTATACCAGCCTGGATTATGAATTTGTTTCTTAT
U L I E Q Y I P T Y T S L D Y E F V S Y

      550     560     570     580     590     600
CAAAATGACCCAACTGTATGTTTTTAAATGACAATAAACTATTTATAAAACCAAAATAT
Q N D P T V C F L N D N K L F I K P K Y

```

[Fig. 16]

610 620 630 640 650 660
 GCACAAAGTGAAGCCGAAGTAAATGGTGAAGTAGATTTTTAGAACAGATGTACTAGGAAA
 A Q S E A E V N G E L D F R N R C T R K

 670 680 690 700 710 720
 ACAGATGAAGAATGTTATAAAAAACGAGAAATTTATTTTCATAATTCACCTGTGACTTCT
 T D E E C Y K K R E I Y F I I P P V T S

 730 740 750 760 770 780
 GGAAGACTTGTTTCTGATTTTCGATTTAAATATGGTAAAGTTGAAATTAGGGCGAAGTTA
 G R L V S D F R F K Y G K V E I R A K L

 790 800 810 820 830 840
 CCTGCAGGGGACTGGATATATCCACAAATGTAAGTAAAGTAAATGATCCAAAAAAG
 P A G D W I Y P Q N Y L E Q V N D P K K

 850 860 870 880 890 900
 AAAATATGGATTGGTTATGCCAGAGGAAATAATAAATTACTGGCAAATAATCAGGARGAC
 K I W I G Y A R G N N K L L A N N Q E D

 910 920 930 940 950 960
 ATTGGAGGCAATTTACTTTTTGGTGGACCTGTTTTAGATCCAGAAGAACCTCATAGAAGT
 I G G N L L F G C P V L D P E E P H R S

 970 980 990 1000 1010 1020
 CAATATTTGAAAAGTACTCGGAACAGCAAACCTTTTACAAGTCAAATGCACACTCTTGT
 Q Y L K S T R N S K P P T S Q M H T L V

 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 GTACTTTGGGATGAAGATCACATTTTCGTTACAATTAATGGTATTGAATATGGCAAGATC
 V L W D E D H I S L Q L N G I E Y G K I

 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 GATAAAAGGACAATGCAAGAAGTAAACTTTGCAGATAACGATATGGTCCGCTTAGTTCTT
 D K R T M Q E V N F A D N D M V R L V L

 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GGAGTAGGGGTGGGAGGAGTCAATGATTTCCAGATGATTTCCGATCAGGAACCTAACGTA
 G V G V G G V N D F P D D F R S G T N V

[Fig. 17]

1210 1220 1230 1240 1250 1260
AAACCTTGGCGCAACAAAGACAATAAACAAGTTAAAAATTTCTTTACGGCAAGAAGTGAA
K P W R N K D N K Q V K N F F T A R S E

1270 1280 1290 1300 1310 1320
TGGGGGAAAACCTTGGAGCGGTGACAATTGTGCTTTACAGGTTGATTATATTAAGTGCG
W G K T W S G D N C A L Q V D Y I K V W

1330
GCTTTATAG
A L *

[Fig. 18]

```

      10      20      30      40      50      60
ATGTGCAATGTAAGAACATTACTGCAGGTGATTTGTTTAAAGTCTTATTGTTATACAGACA
M C N V R T L L Q V I C L S L I V I Q T

      70      80      90      100     110     120
                               CCA
GTCGATAGCTACAGTTTTGCACTAAGCAAATTTACGAGAATTCGACGCCAAGCCCGACGA
V D S Y S F A L S K F T R I R R Q A R R
                               P

      130     140     150     160     170     180
ACCTGTACAAGTACTGAGTTTGCTTGCAAATCCGGAGAATGCATCGACGAAGATAAAGAG
T C T S T E F A C K S G E C I D E D K E

      190     200     210     220     230     240
      GTA
TGTGACGGTATTGTGGACTGTACAGATGCCAGCGACGAGACCAACGCCCTGTCACAGGATC
C D G I V D C T D A S D E T N A C H R I

      250     260     270     280     290     300
AAATGCCCAATTATCTGTCCGGTGCAAATATGGCGCTTGCATCAATCCGGACCTGGAG
K C P N Y L F R C K Y G A C I N P D L E

      310     320     330     340     350     360
                               GCG
TCCGACGGCAAACCGGACTGCATGGACGGATCCGACGAGAAAACGTGCGAAATGTAAACCC
C D G K P D C M D G S D E K I S K C K P
                               A

      370     380     390     400     410     420
GACGATTCGTCGCCGGAGTGCAAAGCGAACGAGTTTCGGTGCAGCTCCGGTCAGTGCATC
D D S S P E C K A N E F R C S S G Q C I

      430     440     450     460     470     480
      TAC  TGC
CCGGAGGACTTCAAATGTGACGGCAAAGCCGAGTGCAAGGATAACTCCGACGAGATTAGA
P E D F K C D G K A E C K D N S D E I R
      Y

```

[Fig. 19]

```

    490      500      510      520      530      540
GCCACCTGCTGGAAGGTCGGCTGTCCAGGATTCACGCACAAGTGCAAATACGGAGCTTGC
A T C W N V R C P G F T H K C K Y G A C

    550      560      570      580      590      600
GTGAGCGGTAAACCGGAGTGCAACGGAATCGTTCGAGTGTTCGACGGTTCAGACGAAGAT
V S G N A E C N G I V E C F D G S D E D

    610      620      630      640      650      660
      AAG   GAA       AAA
CCGGCGATTTCGAAAATAAACCGACACCAAGGCCGACGCGACTCCAGGAACTCCGGGC
P A I C K T [K] P T P [R] P T P T P G T P G
           [E]       [K]

    670      680      690      700      710      720
CCGCAACCGACACAGGGTGGCTGCGTCTTGCCGAATCATCCCGAATTTGGTGAGTGGCAA
P Q P T O G G C V L P N H P E F G E W O

    730      740      750      760      770      780
      GCG
GTGTACGGAATTCCTGGACAAATCTCTCCAGGAATGGTGATTAGAGCTGGTGCAACTTTG
V Y G I P G Q F S P G M [M] I R A G A T L
                        [A]

    790      800      810      820      830      840
CGAATACAGTGCAAGAAACGTTACAAACTCGAAGGAAAAAACGCCATCTTTTTCGAAAAT
R I Q C K K R Y K L E G K N A I F C E N

    850      860      870      880      890      900
GGGAAGTGGTCGGATGCAGTCGGTCATTGCTTAAAGTTGTGCCCTTCCATCCAAAGTACT
G K W S D A V G H C L K L C P S I Q S T

    910      920      930      940      950      960
TCAACAATGAGGGTTACTTGATTTATAACAAACACGAAGAGACTGAAAACGACACAGAA
S T M R V T C I Y N K H E E T E N C T E

```

[Fig. 20]

970	980	990	1000	1010	1020
GCTGTTGAGGGTACTCTTGTGAGGTTTGATTGCGCAOCCGTTTTATGAAGATTGGGATTG					
A V E G T L V R F D C A P F Y E D L G L					
1030	1040	1050	1060	1070	1080
TCGAGACATCCTATTCATATCTGCCGAGATGGTTCTGGGACCAGAGGAGACCAGAATGT					
S R H P I H I C R D G S W D Q R R P E C					
1090	1100	1110	1120	1130	1140
ACACCAGTGTGTGGGCAAAAGTCAGTTAACGCTCAAACATTAATTGTCAACGGGAAACCC					
T P V C G Q K S V N A Q T L I V N G K P					
1150	1160	1170	1180	1190	1200
CCA					
GTGAAGAAAGGAGATTATCCGTGGCAAGTCGCGTTATACACTTTGAACGATAAAGAGTTG					
V K K G D Y P W Q V A L Y T L N D K E L					
1210	1220	1230	1240	1250	1260
ATCTGTGGAGGATCCCTGTTAAACCAGCGAGTCGTTCTGACAGCTGCCATTGTATAACT					
I C G G S L L N Q R V V L T A A H C I T					
1270	1280	1290	1300	1310	1320
GACGATAAGGGAAAATTGTTATCAAAGGAAAATTATATGGTGGCTGTGGGAAAGTACTAC					
D D K G K L L S K E N Y M V A V G K Y Y					
1330	1340	1350	1360	1370	1380
TCC					
CGACCATTCAATGACTCTCGAGACCGCAACGAAGCCAGTTTTCTGAGGTAAAACACATG					
R P F N D S R D R N E A Q F S E V K H M					
1390	1400	1410	1420	1430	1440
CCA					
TTTATTCCCGAAGTGTACAAGGGTTCCACACAAAACACTACGTCGGAGATATCGCTATCTTG					
F I P E L Y K G S T Q N Y V G D I A I L					

[Fig. 21]

1450 1460 1470 1480 1490 1500
 GTAACACGAGTCACTTTACCCCTTCCAGGAGAGTTCCAGCCGGTGTGCATCGACTACGGT
 V T R V T F T L S R R V Q P V C I D Y G

1510 1520 1530 1540 1550 1560
 TTAAAATACACCTCTTATACAAACGAATTTGGATACGTTACGGGTTGGGGTTACACTCTG
 L K Y T S Y T N E F G Y V T G W G Y T L

1570 1580 1590 1600 1610 1620
 CAAAATGACAAACCTCCGACGTGCTCAAAGAATTGAAAGTTCCAGCAGTTAGTACAGAA
 Q N D K P S D V L K E L K V P A V S T E

1630 1640 1650 1660 1670 1680
 ATA
 CAATGTAGTAGCGCTATTCCTGAAGATTATGACATCTACCTTACACACGATAAACTGTGC
 Q C S S A I P E D Y D I Y L T H D K L C

1690 1700 1710 1720 1730 1740
 GCT
 GCCGGCTATTTAGACAATGGTACTTCCGTGTGTAGCCGAGACAGTGGTGGAGGTTTGGTG
 A G Y L D N G T S V C S G D S G G G L V

1750 1760 1770 1780 1790 1800
 TTTAAATTTGATGGCAGGTACTACGTTACTGGGATTGTGAGTCTTTCTCCACAAGCATCA
 F K F D G R Y Y V T G I V S L S P Q A S

1810 1820 1830 1840 1850 1860
 ACAGGCGGCTGTGATACTCAACAATATGGTCTTTATACAAAGGTTGGCACCTACATTTCG
 T G G C D T Q Q Y G L Y T K V G T Y I S

1870 1880 1890 1900
 GATTTTATTATCAAAACGGAATCGCAGTTTAGGCCATAA
 D F I I K T E S Q F R P *