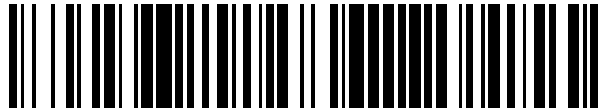


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 667**

51 Int. Cl.:

C12N 9/80 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2008 E 12176321 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 2511369**

54 Título: **Enzimas lisantes de la pared celular estables frente a proteasas**

30 Prioridad:

22.08.2007 US 957351 P
21.12.2007 DE 102007061929
14.05.2008 DE 102008023448
28.02.2008 US 32211 P
22.08.2007 EP 07114785
28.02.2008 EP 08152096

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2014

73 Titular/es:

HYGLOS INVEST GMBH (100.0%)
Am Neuland 1
82347 Bernried, DE

72 Inventor/es:

GRALLERT, HOLGER y
FORCHHEIM, MICHAEL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 442 667 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

Enzimas lisantes de la pared celular estables frente a proteasas

5 La presente invención se refiere a una variante polipeptídica del polipéptido de acuerdo con la SEQ ID N°: 1, seleccionándose la variante polipeptídica del grupo que consiste en: SEQ ID N°: 2, 3, 11, 12 y 13. La invención se refiere además a ácidos nucleicos con una secuencia que codifica para los polipéptidos de acuerdo con la invención.

10 Las bacterias patógenas aparecen en muchos sitios y provocan enormes problemas de salud por infecciones así como altos costes económicos por ejemplo también por ataque bacteriano indeseado en la industria alimentaria, cosmética o medioambiental. En la Sanidad, crecen cada vez más los problemas debidos a gérmenes resistentes a antibióticos, de modo que se buscan desesperadamente alternativas a los antibióticos. En la industria alimentaria y cosmética se intenta cada vez más defenderse sin los conservantes clásicos, que encuentran en la población cada vez menos aceptación. Como solución para estos problemas se ofrece el uso de enzimas lisantes de la pared celular, que suprimen de manera natural el crecimiento de las bacterias indeseadas y destruyen los gérmenes existentes.

20 Ejemplos de enzimas lisantes de la pared celular son endolisinas que se aislaron a partir de bacteriófagos. Los bacteriófagos utilizan estas enzimas al final de su ciclo de reproducción, para liberar los bacteriófagos formados dentro de la célula bacteriana. La envoltura bacteriana se lisa a este respecto y de esta manera se destruye la bacteria huésped. Un ejemplo adicional son enzimas que necesitan el bacteriófago al principio de su ciclo de reproducción y por regla general están localizadas en proteínas de cola de bacteriófago. Estas enzimas se necesitan para la rotura de la pared bacteriana en el caso de la infección bacteriana. Un tercer ejemplo son enzimas que presentan una función similar y con frecuencia también una similitud secuencial con respecto a las endolisinas. Estas enzimas son las autolisinas formadas por bacterias en determinadas circunstancias, que llevan a la autólisis de las bacterias. Un cuarto ejemplo son enzimas que se forman así mismo por bacterias y se conocen como bacteriocinas. Estos cuatro grupos de enzimas lisantes de la pared celular se utilizan ya técnicamente y probablemente en el futuro ganarán importancia.

30 Un campo de aplicación es el uso médico en la prevención y la terapia así como en el diagnóstico de infecciones bacterianas en el ser humano y en animales. Un campo de aplicación adicional es la aplicación en la industria alimentaria, medioambiental y cosmética para impedir un crecimiento bacteriano indeseado y para destruir los gérmenes por ejemplo mediante desinfección así como la detección de bacterias en muestras alimentarias, medioambientales y cosméticas.

35 Prácticamente todas las aplicaciones en las que se usan enzimas que lisan bacterias exigen altos requisitos sobre la estabilidad de las enzimas utilizadas, mereciendo la pena por lo tanto su uso económicamente. En el documento US 6.432.444 B1 se propone para la estabilización de las enzimas lisantes de la pared celular, usar por ejemplo un tampón de estabilización para garantizar la actividad enzimática óptima. Además se propone la adición de sustancias estabilizantes tales como agentes de reducción, quelantes de metal, inmunoglobulinas, sales tampón específicas, valores de pH fisiológicos, agentes conservantes o detergentes suaves.

45 En general la estabilidad de las proteínas se reduce con frecuencia debido a las proteasas presentes. Estrategias para el aumento de la estabilidad de proteínas frente a una degradación por proteasa son por ejemplo la adición de quelantes de metal, para inhibir las proteasas, que para su actividad necesitan iones de metal o la adición de inhibidores de proteasas especiales, tal como pueden obtenerse comercialmente por ejemplo para serina proteasas. Sin embargo, los inhibidores de proteasa pueden utilizarse para la estabilidad de enzimas lisantes de la pared celular sólo en determinados casos, porque perturban también otros componentes esenciales en el sitio de acción. Además los inhibidores específicos son también muy caros. También la elección de otras condiciones del entorno, en las que las proteasas son menos activas, no es posible por regla general, dado que las enzimas lisantes de la pared celular necesitan condiciones muy similares para su actividad que las proteasas. De este modo, las enzimas lisantes de la pared celular trabajan del mejor modo en un entorno acuoso y con valores de pH moderados, en las que la mayor es también la actividad proteasa. Los planteamientos de estabilización conocidos no son adecuados para el uso en el caso de enzimas lisantes de la pared celular.

55 Por lo tanto, la presente invención se basa en el objetivo de proporcionar enzimas estables lisantes de la pared celular.

60 El objetivo se consigue mediante el objeto definido en las reivindicaciones.

Las siguientes figuras sirven para explicar la invención.

65 La figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de tipo natural del dominio CHAP (aminoácido 1-154), la región de ligador (subrayado, aminoácido 155-193) y el dominio de amidasa (aminoácido 194-393) de una endolisina de PlyPitti26. Puntos de corte potenciales para proteasa V8, que corta después del resto de aminoácido E, están resaltados en negrita y se encuentran en las posiciones de aminoácido 163, 179 y 189. El

sitio de escisión de trombina está marcado en gris y se encuentra en la posición R167.

La Figura 2 muestra el resultado de una digestión con proteasa y posterior prueba de actividad de PlyPitti26 no modificada con las proteasas trombina y V8 proteasa. La Figura 2A muestra un gel de SDS-poliacrilamida con muestras de PlyPitti26 no modificada después de una digestión con trombina (T), V8 proteasa (V8) y una digestión de control con plasmina (P), para la que no existe sitio de escisión. PlyPitti26 sin digerir está marcada con "-". M designa patrones de peso molecular con los tamaños de proteína indicados en el borde en kDa. En el borde derecho están indicadas las posiciones de las bandas para el fragmento del extremo N terminal del sitio de escisión de trombina (dominios CHAP), el fragmento del extremo C terminal del sitio de escisión (Ami-CBD) y las bandas de trombina añadida. La Figura 2B muestra el resultado de una prueba de lisis de líquidos para determinar las actividades específicas de PlyPitti26 no modificada digerida y no digerida. La lisis de células bacterianas se sigue mediante una medición de dispersión de la luz en el fotómetro. Están representadas las curvas de lisis para PlyPitti26 sin digerir (—), endolisina digerida con plasmina (-----), así como digerida con trombina (—) o digerida con V8 proteasa (—).

La Figura 3 muestra el resultado de una digestión con proteasa de CHAP-AmiPitti26-CBDUSA modificada y no modificada. La Figura 3A muestra el resultado de una digestión con trombina de CHAP-AmiPitti26-CBDUSA no modificada y de una endolisina de *Staphylococcus* modificada CHAP-AmiPitti26-CBDUSA (mutante 4 en la Tabla 3). CHAP-AmiPitti26-CBDUSA no modificada tiene un sitio de escisión de trombina singular entre el dominio CHAP y amidasa en la posición R167, el polipéptido modificado un intercambio de R con A en la posición 167. La Figura 3A muestra un gel de SDS-poliacrilamida de ambas variantes de enzima antes y después de la digestión con trombina: M - marcador de peso molecular (pesos moleculares en kDa indicados en el borde); 1 - CHAP-AmiPitti26-CBDUSA no modificada sin trombina; 2 - CHAP-AmiPitti26-CBDUSA no modificada después de la digestión con trombina; 3 - CHAP-AmiPitti26-CBDUSA modificada sin trombina; 4 - CHAP-AmiPitti26-CBDUSA modificada después de la adición de trombina.

La Figura 3B muestra el resultado de una digestión con V8 proteasa de CHAP-AmiPitti26-CBDUSA no modificada y de una endolisina de *Staphylococcus* modificada CHAP-AmiPitti26-CBDUSA (mutante 4 en la Tabla 3). CHAPAmiPitti26-CBDUSA no modificada tiene un sitio de escisión de V8 proteasa entre el dominio CHAP y amidasa en la posición E163, el polipéptido modificado un intercambio de E con A en la posición 163. La Figura 3B muestra un gel de SDS-poliacrilamida de ambas variantes de enzima antes y después de digestión con V8-proteasa: M - marcador de peso molecular (pesos moleculares en kDa indicados en el borde); 1 - CHAP-AmiPitti26-CBDUSA no modificada sin V8 proteasa; 2 - CHAP-AmiPitti26-CBDUSA no modificada 15 min de digestión con V8 proteasa; 3 - CHAP-AmiPitti26-CBDUSA no modificada 60 min de digestión con V8 proteasa; 4 - CHAP-AmiPitti26-CBDUSA modificada sin V8 proteasa; 5 - CHAP-AmiPitti26-CBDUSA modificada 15 min de digestión con V8 proteasa; 6 - CHAPAmiPitti26-CBDUSA modificada 60 min digestión con V8 proteasa.

La Figura 4 muestra una comparación de secuencias de aminoácidos de la endolisina modificada del fago de *Cl. difficile* Φ CD119 (CD119) con la endolisina modificada del fago de *Cl. difficile* Φ 630. El sitio de escisión de la caspasa 1 singular existente en Φ CD119 y Φ 630 de tipo natural en el aminoácido D214 se modificó a E214, el sitio de escisión de trombina singular presente en Φ 630 de tipo natural R87 se modificó a K87.

La Figura 5 muestra una comparación de secuencias de aminoácidos de la región del sitio de escisión de trombina de distintas endolisinas de *Staphylococcus aureus*. El residuo de aminoácido R marcado en negrita es la posición R167 en la secuencia de referencia ply_pitti26, denominada P26A. Las otras secuencias de aminoácidos indicadas están alineadas con R167 de ply_pitti26. La comparación de secuencias de aminoácidos se realizó con el programa BLAST; Altschul y col., 1990, J. Mol. Biol., 215, 403-410. El número a la derecha junto a la comparación de secuencias de aminoácidos designa la posición de aminoácidos del último aminoácido en el segmento de secuencia representado de la endolisina respectiva. Los números en el borde izquierdo representan distintas proteínas homólogas de la comparación de secuencias de aminoácidos. P26A representa ply_pitti26, 15 una autolisina (Nacetilmuramoil-L-alanin-amidasa) de *Staphylococcus aureus* (número de acceso a la base de datos P24556), 16 representa una amidasa del bacteriófago 80 alfa (número de acceso a la base de datos AAB39699), 3 representa la endolisina del fago de *Staphylococcus phi* MR11 (número de acceso a la base de datos YP 001604156), 4 representa ORF006 del fago de *Staphylococcus aureus* 88 (número de acceso a la base de datos YP 240699), 5 representa ORF21 del fago de *Staphylococcus aureus* 85 (número de acceso a la base de datos YP 239752), 9 representa la amidasa del fago de *Staphylococcus* 11 (número de acceso a la base de datos NP803306), 10 representa ORF007 del fago de *Staphylococcus* 52A (número de acceso a la base de datos YP 240634), 11 representa la N-acetilmuramoil-L-alanin-amidasa de la cepa *Staphylococcus aureus subsp. aureus* JH9 (número de acceso a la base de datos YP 001246457), 12 representa la hidrolasa de la pared celular putativa del fago phiMR25 (número de acceso a la base de datos YP 001949866), 13 representa ORF007 del fago de *Staphylococcus* 69 (número de acceso a la base de datos YP 239596), 14 representa ORF007 del fago de *Staphylococcus* 55 (número de acceso a la base de datos YP 240484), 2 representa la N-acetilmuramoil-L-alanin-amidasa de la cepa *Staphylococcus aureus subsp. aureus* JH9 (número de acceso a la base de datos YP 001245749), 8 representa ORF007 del fago de *Staphylococcus* 29 (número de acceso a la base de datos YP 240560), 7 representa la autolisina de la cepa *Staphylococcus aureus subsp. aureus* NCTC 8325 (número de acceso a la base de datos YP 0516), 1 representa la amidasa del

fago de *Staphylococcus* phiNM2 (número de acceso a la base de datos ABF73160), 6 representa una amidasa relacionada con fago de la cepa *Staphylococcus aureus* RF122 (número de acceso a la base de datos YP 417165), 17 representa ORF006 del fago de *Staphylococcus* 37 (número de acceso a la base de datos YP 240103) y 18 representa ORF007 del fago de *Staphylococcus* EW (número de acceso a la base de datos YP 240182).

La Figura 6 reproduce secuencias de aminoácidos de CHAP-AmiPitti26-CBDUSA modificada y no modificada. La Figura 6A a D muestra la secuencia de aminoácidos de CHAP-AmiPitti26-CBDUSA sin sustituciones de aminoácidos en sitios de escisión de proteasas (A) y CHAP-AmiPitti26-CBDUSA con sustituciones de aminoácidos en sitios de escisión de proteasas (B a E). La Figura 6F a K muestra la secuencia de aminoácidos de CHAP-AmiPitti26-CBDUSA-Add2 sin sustituciones de aminoácidos en sitios de escisión de proteasas y un residuo 5 de aminoácido adicional en la posición dos (F) y CHAP-AmiPitti26-CBDUSA-Add2 con sustituciones de aminoácidos en sitios de escisión de proteasas y un residuo de aminoácido adicional en la posición dos (G a K).

La Figura 7A muestra la secuencia de aminoácidos de la endolisina modificada de la cepa de *Cl. difficile* 630 con un intercambio de D214 a E214. La Figura 7B muestra la secuencia de aminoácidos de la endolisina de *Cl. difficile* modificada del fago phi CD119 con un intercambio de R87 a K87 y D214 a E214.

La Figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos de la endolisina Ply511. Las posiciones de aminoácidos marcadas en negrita E7, E40 y E89 pueden sustituirse con cualquier otro residuo de aminoácido.

La Figura 9 muestra la secuencia de aminoácidos de la endolisina Ply511. Los posibles sitios de escisión (R en la posición P1) para la proteasa clostripaína están subrayados. Ambos sitios de escisión especialmente sensibles experimentalmente determinados (R92 y R221) están subrayados y marcados en negrita.

La Figura 10 muestra la digestión de la endolisina terapéuticamente utilizable CHAP-Amipitti26_CBDUSA-Add2 (L56H, L57T, E164A, R168A, Y201H) por proteasas existentes en extractos de órgano. La Figura 10A muestra un gel de SDS en el que las bandas de proteínas se separaron después de la incubación con extracto de hígado, riñón y pulmón. A la izquierda está representado un patrón de peso molecular. Los carriles 1 a 3 muestran controles (sólo endolisina, sin extracto de órgano), que no se incubaron en absoluto (carril 1), 18 h a temperatura ambiente (carril 2) o 18 h a 4 °C (carril 3). En los carriles 4 a 6 se añadió extracto de hígado, en el carril 7 a 9 extracto de riñón y en los carriles 10 a 12 extracto de pulmón. Los carriles 4, 7 y 10 sólo contienen extracto de órgano, carriles 5, 8 y 11 extracto de órgano y endolisina después de 18 h de incubación a temperatura ambiente, carriles 6, 9 y 12 extracto de órgano y endolisina después de 18 h de incubación a 4 °C. Las flechas con los números 1 a 7 junto al carril 9 marcan las bandas que se secuenciaron en el extremo N después de la transferencia a una membrana de transferencia. La Figura 10B muestra un gel de SDS en el que las bandas de proteínas se separaron después de la incubación con extracto de corazón o de bazo. A la izquierda está representado un patrón de peso molecular. Los carriles 1 a 3, así como 10, muestran controles (sólo endolisina, sin extracto de órgano), que no se incubaron en absoluto (carril 1 y 10), 18 h a temperatura ambiente (carril 2) o 18 h a 4 °C (carril 3). En los carriles 4 a 6 se añadió extracto de corazón, en el carril 7 a 9 extracto de bazo. Los carriles 4 y 7 sólo contienen extracto de órgano, carriles 5 y 8 extracto de órgano y endolisina después de 18 h de incubación a temperatura ambiente, carriles 6 y 9 extracto de órgano y endolisina después de 18 h de incubación a 4 °C.

La Fig. 11 muestra la secuencia de la endolisina CHAP-Amipitti26_CBDUSA-Add2 (L56H, L57T, E164A, R168A, Y201H) con zonas sensibles a proteasas. Los sitios de escisión (posición P1) que resultaron de la incubación con extracto de riñón están marcados en negrita. Las secuencias de aminoácidos que resultaron en la secuenciación del extremo N de los fragmentos formados están subrayadas. Las regiones de aminoácidos que definen el ligador de dominios están representadas en cursiva. Esto es una región del ligador de dominios entre los dominios CHAP y amidasa 2 (aminoácidos 159 a 198), así como un segundo ligador entre el dominio amidasa 2 y CBD (aminoácidos 347 a 412).

La Fig. 12 muestra una comparación de secuencias de aminoácidos de la región del sitio de escisión de la caspasa 1 de distintas de endolisinas *Staphylococcus*. Se trata de amidasas de los fagos de *Staphylococcus* SAP-2, 44AHJD y el fago 66. Los números de acceso a la base de datos NCBI para las proteínas son YP_001491539, 44AHJD_15 amidasa y YP_239469. La posición D42, después de la cual se escinde, está marcada en negrita, la secuencia de reconocimiento conservada para la caspasa 1 está respectivamente representada en cursiva y rodeada. Las 3 proteínas son idénticas en su longitud total al 89 al 90 %, aminoácidos no conservados para la región de aminoácidos 1 a 60 están marcados con "-". La comparación de secuencias de aminoácidos se realizó con el programa BLAST.

El término "polipéptido" o "proteína" como aquí se usa designa péptidos de al menos ocho aminoácidos. Los polipéptidos pueden ser polipéptidos farmacológica o inmunológicamente activos o polipéptidos usados para fines diagnósticos.

El término “enzimas lisantes de la pared celular” como aquí se usa designa enzimas que pueden romper la pared celular bacteriana al menos parcialmente o dañarla de forma que a continuación se produzca una lisis celular o al menos un efecto bacteriostático. El término designa especialmente endolisinas, autolisinas, proteínas de la cola de bacteriófago y bacteriocinas.

5 El término “endolisina” como aquí se usa designa enzimas que son naturalmente codificadas por bacteriófagos y que las producen éstos al final de su ciclo huésped para lisar la célula huésped y así liberar los bacteriófagos recientemente producidos en la célula huésped. Las endolisinas están construidas por al menos un dominio enzimáticamente activo (EAD) y un dominio de unión a células no enzimáticamente activo (CBD). Los EAD
10 individuales presentan diferentes actividades, presentando las endolisinas al menos un EAD seleccionado del siguiente grupo: N-acetil-muramoyl-L-alanin-amidasa (amidasa, por ejemplo, Ami_2, Ami_5), (endo)-peptidasa (por ejemplo, CHAP, es decir, cisteína, amidohidrolasas/peptidasas dependientes de histidina), transglucosilasa, glucosilhidrolasa, (N-acetil)-muramidasa (lisozima) y N-acetil-glucosaminidasa.

15 El término “autolisina” como aquí se usa designa peptidoglucanohidrolasas bacterianas que en determinadas situaciones conducen a una autólisis de bacterias. Funcionalmente y también estructuralmente son autolisinas y endolisinas frecuentemente relacionadas. Distintos dominios de endolisinas y autolisinas pueden combinarse con frecuencia modularmente y formar quimeras activas.

20 El término “proteína de la cola de bacteriófago” como aquí se usa designa proteínas con estructura de fago que al principio del ciclo de replicación del bacteriófago en la infección cumplen la función de unirse a receptores sobre la superficie bacteriana y a este respecto lisan componentes de la superficie celular mediante su función enzimática. Las proteínas de bacteriófago correspondientes no siempre deben estar localizadas en la cola de fagos, sino que también pueden situarse directamente en la cabeza del fago en fagos sin cola.

25 El término “bacteriocina” como aquí se usa designa toxinas proteínógenas que son secretadas por bacterias para inhibir el crecimiento del tamaño de géneros de bacterias similares. Están constituidas por un dominio que se une a pared celular, un dominio de translocación y por el “factor de destrucción” (“*killling factor*”). A este respecto, el grupo de bacteriocinas contenido en este contexto ataca membranas bacterianas. Ejemplos son colicina, microcina, nisina, epidermina y lantibióticos (antibióticos que contienen lantionina).
30

El término “pared celular” bacteriana como aquí se usa designa todos los componentes que construyen la envoltura celular externa de las bacterias y así garantizan su integridad. Bajo éste deben entenderse especialmente el peptidoglucano, la membrana externa de bacterias Gram negativas con el lipopolisacárido, la membrana celular bacteriana, pero también capas adicionales soportadas sobre el peptidoglucano como cápsulas, mucosidad o capas de proteínas externas.
35

El término “proteasa” como aquí se usa designa una enzima que está en situación de disociar hidrolíticamente proteínas y/o péptidos.
40

El término “dominio” como aquí se usa designa una región parcial de una secuencia de aminoácidos que está definida funcional y/o estructuralmente. Los dominios pueden preverse frecuentemente muy bien debido a homología mediante programas de búsqueda correspondientes que se apoyan en bases de datos correspondientes con dominios conservados (por ejemplo, Conserved Domain Database (CDD) en el NCBI (Marchler-Bauer y col., 2005, Nucleic Acids Res. 33, D192-6), Pfam (Finn y col., 2006, Nucleic Acids Research 34, D247-D251) o SMART (Schultz y col., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5857-5864, Letunic y col., 2006, Nucleic Acids Res 34, D257-D260).
45

El término “de tipo natural” como aquí se usa designa la secuencia de aminoácidos tal como existe en proteínas naturales y cuya secuencia no se modificó con respecto a sitios de escisión de proteasas. A este respecto puede tratarse de secuencias de aminoácidos, tales como existen naturalmente en un bacteriófago, profago o bacteria. Adicionalmente, el término designa todas las secuencias de aminoácidos de enzimas lisantes de la pared celular existentes en las bases de datos que todavía contienen determinados sitios de escisión de proteasas, incluso cuando las secuencias de aminoácidos ya se modificaron en comparación con proteínas que existen naturalmente.
50

En relación con secuencias de nucleótidos, el término natural también designa las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que presentan una secuencia de aminoácidos anteriormente descrita.
55

La presente invención se refiere a un polipéptido modificado con la actividad biológica para lisar paredes celulares de bacterias, no conteniendo el polipéptido caspasa, enterocinasa, factor Xa, granzima B, peptidasa I de *Staphylococcus* (V8 proteasa), plasmina, estreptopaina, bacilolisina o sitio de escisión de trombina, así como otros sitios de escisión de proteasas, que se determinaron específicamente para el polipéptido respectivo mediante digestión con proteasas con posterior análisis de los fragmentos formados y a continuación se modificaron de la forma descrita. La presente invención se refiere preferiblemente a polipéptidos modificados que lisan bacterias Gram positivas, pudiendo proceder las bacterias del grupo constituido por clostridios, bacilos, listerias, estafilococos, lactobacilos, enterococos, aerococos, pediococos, estreptococos, micoplasmas y/o Leuconostoc. Preferiblemente, el polipéptido de acuerdo con la invención es una endolisina, una proteína de la cola de bacteriófago, una autolisina o
60
65

una bacteriocina.

La presente invención se refiere además a un polipéptido producido por recombinación con la actividad biológica para lisar paredes celulares de bacterias, presentando la secuencia de aminoácidos del polipéptido modificaciones con respecto a la secuencia de tipo natural en posiciones de aminoácidos que son reconocidas por proteasas y/o después de las cuales las proteasas disocian los polipéptidos.

Ha resultado sorprendente que las enzimas lisantes de la pared celular puedan modificarse en su secuencia de aminoácidos de forma que pueda alcanzarse una estabilidad frente a proteasas elevada sin que deban añadirse sustancias estabilizadoras. En general se sabe que distintas proteasas escinden la cadena de polipéptidos en un determinado residuo de aminoácido o necesitan motivos de secuencias de aminoácidos para su actividad enzimática. Los sitios de escisión de proteasas en proteínas pueden predecirse en la secuencia de aminoácidos existente con programas de análisis de secuencias adecuados (por ejemplo, ExPASy PeptideCutter, Gasteiger y col., Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server en John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005)). Así, para una proteína de tamaño medio con aproximadamente 300 a 400 residuos de aminoácidos generalmente resultan muchos más de 100 posibles sitios de escisión de proteasas, de manera que una estabilización de las proteínas sólo puede alcanzarse modificando los sitios de escisión de una pluralidad de proteasas. Sin embargo, esto no es factible, ya que la proteína pierde su acción y actividad cuando se introducen demasiadas modificaciones de aminoácidos. Otra posibilidad para determinar regiones sensibles a proteasas, además de la predicción mediante la secuencia de aminoácidos, sobre todo para proteasas, en las que no se conoce ninguna secuencia de reconocimiento o no se conoce su identidad, es la determinación experimental de sitios de escisión reales mediante una digestión de las proteínas con proteasas que pueden obtenerse comercialmente. Además, para esto pueden usarse proteasas aisladas de organismo o muestras. Especialmente pueden usarse las muestras que contienen proteasas como, por ejemplo, muestras de alimentos, muestras medioambientales, extractos de órgano, muestras médicas, sin aislar previamente las proteasas. A continuación, las mezclas madre de ensayo se someten a un análisis de los productos de degradación formados con ayuda de determinación de secuencias (por ejemplo, secuenciación del extremo N o C terminal, mapeo de péptidos junto con espectrometría de masas) y determinación del tamaño (por ejemplo, espectrometría de masas, análisis de bandas de geles de SDS, filtración en gel analítica). Realmente, los inventores han encontrado en muchas enzimas lisantes de la pared celular sitios de escisión y motivos de secuencias de aminoácidos para proteasas. Esto parece sorprendente cuando se supone que las enzimas lisantes de la pared celular deben evolucionar verdaderamente a una alta estabilidad. Sin embargo, se mostró sorprendentemente que los sitios de escisión y los motivos de secuencias de aminoácidos para las proteasas están presentes en bajo número, frecuentemente incluso en forma singular, en las enzimas lisantes de la pared celular y frecuentemente también están conservados en proteínas homólogas. De esta manera, una modificación de algunos pocos o incluso sólo un sitio de escisión de proteasa es suficiente para elevar la estabilidad de las enzimas lisantes de la pared celular.

En la presente invención sólo se modifican aquellos sitios de escisión de proteasas que son reconocidos por determinadas proteasas potencialmente existentes en el sitio de acción de las enzimas lisantes de la pared celular. A este respecto, las secuencias de aminoácidos de las enzimas lisantes de la pared celular se modifican de forma que ya no puedan ser reconocidas por las proteasas específicas y en consecuencia ya no son escindidas. Esto conduce a una elevada estabilidad de las enzimas lisantes de la pared celular con respecto a proteasas existentes en el sitio de acción. Por lo tanto, se evita una pérdida inducida por proteasas de la actividad de enzimas lisantes de la pared celular y se alcanza una mayor eficacia.

Hay una serie de proteasas que para su actividad enzimática necesitan una secuencia de reconocimiento específica en sus proteínas de sustrato. Algunos ejemplos de éstas se indican en la siguiente tabla. El experto conoce múltiples otras proteasas tal como se describen, por ejemplo, en la base de datos de peptidasas Merops (Rawlings y col., 2008, Nucleic Acids Res 36, D320-D325). Sin embargo, lo siguiente también es válido para sitios de escisión de proteasas de proteasas desconocidas que pueden determinarse experimentalmente. P1 designa la posición del aminoácido, después del cual se escinde, P4, P3 y P2 son las posiciones del extremo N terminal antes del sitio de escisión P1. La denominación P1' y P2' son las posiciones del extremo C terminal a continuación de P1. Esto significa que las proteasas disocian la cadena de polipéptidos entre P1 y P1'. Las letras en mayúsculas indicadas en lugar de los residuos de aminoácidos representan las designaciones internacionalmente usadas de residuos de aminoácidos y son conocidas en general. Si en la descripción de la presente invención se usan letras en mayúscula, se indica el residuo de aminoácido correspondiente.

Tabla 1

Proteasa	Sitio de escisión					
	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'
Caspasa 1	F, W, Y o L	-	H, A o T	D	no P, E, D, Q, K o R	-
Caspasa 2	D	V	A	D	no P, E, D, Q, K o R	-

Caspasa 3	D	M	Q	D	no P, E, D, Q, K o R	-
Caspasa 4	L	E	V	D	no P, E, D, Q, K o R	-
Caspasa 5	L o W	E	H	D	-	-
Caspasa 6	V	E	H o I	D	no P, E, D, Q, K o R	-
Caspasa 7	D	E	V	D	no P, E, D, Q, K o R	-
Caspasa 8	I o L	E	T	D	no P, E, D, Q, K o R	-
Caspasa 9	L	E	H	D	-	-
Caspasa 10	I	E	A	D	-	-
Clostripaína (clostridiopeptidasa B)	-	-	-	R	-	-
Enterocinasa	D o N	D o N	D o N	K	-	-
Factor Xa	A, F, G, I, L, T, V o M	D o E	G	R	-	-
Plasmina (fibrinolisina, fibrinasa)	-	-	-	K o R	-	-
Estreptopaína (peptidasa A de <i>Streptococcus</i>)	-	-	F	F	Y	-
Bacilolisina (proteasa neutra de <i>Bacillus subtilis</i>)	-	G o F o A	G o F	L o F	A o G o L	-
Granzima B	I	E	P	D	-	-
Peptidasa I de <i>Staphylococcus</i> (V8 proteasa)	-	-	no E	E	-	-
Trombina	-	-	G	R	G	-
	A, F, G, I, L, T, V o M	A, F, G, I, L, T, V, W o A	P	R	no D, E	no D, E

- Preferiblemente, la presente invención se refiere a un polipéptido modificado con la actividad biológica para lisar paredes celulares de bacterias, presentando el polipéptido de acuerdo con la invención, con respecto al que existe naturalmente, una o varias modificaciones en su secuencia de aminoácidos en una o varias de las posiciones mostradas en la Tabla 1 o en sitios de escisión de proteasas experimentalmente determinados, existiendo una modificación o varias modificaciones en los aminoácidos de sitios de escisión de proteasas indicados en la Tabla 1 o experimentalmente determinados. De esta manera se aumenta la estabilidad del polipéptido frente a la proteasa o proteasas cuya secuencia de reconocimiento se modificó correspondientemente.
- 5
- 10 En una forma de realización preferida de la presente invención el residuo de aminoácido se sustituye por otro residuo de aminoácido adecuado en la posición después de la cual se escinde (P1), de manera que el polipéptido de acuerdo con la invención ya no es escindido por la proteasa cuyo sitio de reconocimiento se modificó correspondientemente. En lugar de un intercambio del residuo de aminoácido en la posición P1 o también adicionalmente a un intercambio en la posición P1, otros residuos de aminoácidos pueden intercambiarse en el sitio de reconocimiento, preferiblemente, las posiciones indicadas en la Tabla 1 de P4, P3, P2, P1' y/o P2', por otros residuos de aminoácidos. Preferiblemente se efectúan por sitio de reconocimiento 6, 5, 4, 3, 2, 1 sustituciones, de manera especialmente preferente de 1 a 3 sustituciones.
- 15
- 20 En una forma de realización adicional de la presente invención en un polipéptido pueden modificarse uno o varios sitios de escisión de proteasas como se ha descrito previamente.
- Es importante que la variante de proteínas de acuerdo con la invención después de la mutación no sólo presente una mayor estabilidad frente a una degradación por proteasas, sino que además también conserve su actividad lisante de la pared celular. Por tanto, la sustitución de aminoácidos se realiza como se describe a continuación.
- 25
- 30 En el estado de la técnica se conocen una serie de residuos de aminoácidos esenciales que son conocidos para la actividad de las enzimas lisantes de la pared celular, por ejemplo, cisteínas e histidinas conservadas en distintas amidasas o dominios CHAP. Los residuos esenciales correspondientes también pueden encontrarse con programas de análisis de secuencias que buscan especialmente dominios conservados (por ejemplo, Conserved Domain Database (CDD) mediante NCBI (Marchler-Bauer y col., 2005, Nucleic Acids Res. 33, D192-6), Pfam (Finn y col., 2006, Nucleic Acids Research 34, D247-D251) o SMART (Schultz y col., 1998, proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5857-5864, Letunic y col., 2006, Nucleic Acids Res 34, D257-D260).

Para desestabilizar lo menos posible la estabilidad, estructura y función de los polipéptidos de acuerdo con la invención, los residuos de aminoácidos que van a intercambiarse de la secuencia de reconocimiento de proteasas se sustituyen por residuos de aminoácidos que están a ser posible muy relacionados por su estructura y bioquímica y no obstante no son reconocidos por la proteasa. Entretanto es conocimiento especializado general clasificar los 20 aminoácidos existentes en la naturaleza en determinados grupos que se diferencian por su bioquímica (por ejemplo, aminoácidos ácidos, básicos, hidrófobos, polares, aromáticos), pero dentro de los cuales los aminoácidos están relacionados entre sí. Los intercambios para los residuos de aminoácidos en los polipéptidos están resumidos en la Tabla 2. Las posibilidades de intercambio mencionadas en la columna 2 representan alternativas de aminoácidos conservativos que son especialmente similares al residuo de aminoácido en el tipo natural tanto por su estructura como por su función. Esto son variantes de intercambio especialmente preferidas. Sin embargo, para los polipéptidos lisantes de la pared celular de acuerdo con la invención también son posibles otras variantes de intercambio que se mencionan en la columna 3.

Tabla 2

Aminoácido en el tipo natural	Intercambio conservativo	Otras posibilidades de intercambio
A (Ala)	S	T, G, V, E, D
N (Asn)	Q, D	K, H, I, T, S, A
D (Asp)	E, N	A, G, S
R (arg)	K	S, Q, A
C (Cys)	S	M, G, A
E (Glu)	D, Q	A, G, S, A
Q (Gln)	N, E	H, L, R, A
G (Gly)	A	S, N, D
H (His)	Q, N	R, A
I (Ile)	V, L	T, A
L (Leu)	V, I	M, F, A
K (Lys)	R	N, T, S, Q, A
M (Met)	L	K, V, I, C, A
F (Phe)	Y	L, I, M, A
P (Pro)	A	S, Q
S (Ser)	A, T	G, N, K
T (Thr)	S, A	V, K, N
W (Trp)	Y	F, S, R, A
Y (Tyr)	F	H, N, C, A
V (Val)	I, A	L, T

La matriz de Dayhoff representa otra posibilidad para determinar qué residuo de aminoácido se integra en lugar del residuo que va a sustituirse; véase, por ejemplo, en Creighton (Proteins: Structure and Molecular Properties, 2ª ed., 1984, Freeman, Nueva York). A partir de investigaciones de proteínas homólogas se sabe que la mutación al azar de manera puramente estadística al nivel de los ácidos nucleicos no se refleja en la secuencia de aminoácidos de las proteínas correspondientes. Por tanto, parece que para determinadas posiciones de aminoácidos en las proteínas homólogas existe una presión de selección sobre determinados residuos de aminoácidos, lo que se especifica en la matriz de Dayhoff.

Otra posibilidad para determinar qué residuo de aminoácido se integra en lugar del residuo que va a sustituirse se sirve de la ayuda de programas de análisis de secuencias, por ejemplo, del programa BLAST, véase Altschul y col., 1990, J. Mol. Biol., 215, 403-410. Con él pueden buscarse proteínas relacionadas con las enzimas lisantes de la pared celular que van a mutarse. A este respecto, el algoritmo de búsqueda encuentra similitudes al nivel de secuencias. Si se busca al nivel de secuencias de aminoácidos, entonces el programa "Protein BLAST" es adecuado para mostrar parentescos funcionales y/o evolutivos. Si se encuentran variantes de aminoácidos con al menos aproximadamente el 60 % o al menos aproximadamente el 80 % o al menos aproximadamente el 90 % de identidad en una región de aproximadamente 100 o 50 o 20 residuos de aminoácidos como límite alrededor del posible sitio de escisión de proteasas en proteínas estrechamente relacionadas, la secuencia de aminoácidos que se desvía de la secuencia de reconocimiento de proteasas puede integrarse en el polipéptido de acuerdo con la invención. A este respecto, las sustituciones de aminoácidos pueden desviarse de las posibilidades de intercambio indicadas en la Tabla 2.

Hay una serie de endolisinas conocidas que presentan sitios de escisión de proteasas, como están representados en la Tabla 1, especialmente sitios de escisión para las proteasas trombina, caspasa, clostripaína o V8 proteasa. Especialmente sitios de escisión de trombina o caspasa son frecuentemente singulares y pueden sustituirse de acuerdo con la invención, de manera que resulte una endolisina estabilizada. En una forma de realización preferida, el polipéptido de acuerdo con la invención se modifica en una o varias secuencias de reconocimiento de trombina. A este respecto, el residuo de aminoácido designado con R en la posición P1 se intercambia con el residuo de aminoácido designado con K. También se describe un intercambio por S, Q o A. En la primera variante de la secuencia de reconocimiento de trombina (G; R; G), adicional o alternativamente al intercambio de R, ambos G o solo uno de ellos puede intercambiarse preferiblemente por A. En la segunda variante de la secuencia de reconocimiento de trombina (P; R; no D, E; no D, E), R también se intercambia preferiblemente por K o por S, Q o A. Adicionalmente o como alternativa, P en la posición P2 puede intercambiarse por A, S o Q. Además, adicionalmente o como alternativa, una o ambas posiciones P1' y P2' pueden sustituirse con D o E.

En una forma de realización preferida adicional, el residuo de aminoácido D en la posición P1 de un sitio de escisión de caspasa se intercambia por N o A. El residuo de aminoácido R en la posición P1 de un sitio de escisión de clostripaína se intercambia preferiblemente por K o A, el residuo de aminoácido E en la posición P1 de un sitio de escisión de V8 proteasa por Q o A. Otros intercambios preferidos se resumen en la Tabla 2, también pueden realizarse intercambios estabilizadores en el sitio de reconocimiento fuera de la posición P1.

Formas de realización especialmente preferidas se indican en la SEC ID N°: 1, 2, 3, 4 y 5.

La presente invención se refiere además a un polipéptido producido de manera recombinante con la actividad biológica de lisar paredes celulares de bacterias, presentando la secuencia de aminoácidos del polipéptido adiciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de tipo natural. Preferiblemente, el polipéptido de acuerdo con la invención presenta una, dos, tres o cuatro adiciones de residuos de aminoácidos, pudiendo introducirse los residuos de aminoácidos coherentemente o independientemente entre sí. Se prefiere la adición de uno o dos residuos de aminoácidos, especialmente se prefiere la adición de un residuo de aminoácido, se prefiere muy especialmente la adición de un residuo de aminoácido en la posición dos. Las adiciones de aminoácidos pueden introducirse en polipéptidos que presentan modificaciones en posiciones de aminoácidos que son reconocidas por proteasas y/o después de las proteasas disocian los polipéptidos, o también en polipéptidos en los que no se integraron modificaciones de este tipo. Formas de realización especialmente preferidas se indican en la SEC ID N°: 12-17, 19 y 22.

En una forma de realización preferida adicional, el polipéptido de acuerdo con la invención se modifica en una o varias secuencias de reconocimiento de V8 proteasa. A este respecto, el residuo de aminoácido designado con E en la posición P1 se intercambia con otro residuo de aminoácido, preferiblemente, por el residuo de aminoácido designado con A o Q. Una forma de realización especialmente preferida se indica en la SEC ID N°: 6.

En una forma de realización preferida adicional, el polipéptido de acuerdo con la invención se modifica en uno o varios sitios de escisión de clostripaína. A este respecto, el residuo de aminoácido designado con R en la posición P1 se intercambia con otro residuo de aminoácido, preferiblemente, por el residuo de aminoácido designado con K o A. Formas de realización especialmente preferidas se indican en la SEC ID N°: 7 y 8.

En una forma de realización preferida adicional, el polipéptido de acuerdo con la invención se modifica en una o varias secuencias de reconocimiento de caspasa. A este respecto, el residuo de aminoácido designado con D en la posición P1 se intercambia con otro residuo de aminoácido, preferiblemente, por el residuo de aminoácido designado con E o A. Formas de realización especialmente preferidas se indican en la SEC ID N°: 9 y 10.

En una forma de realización preferida adicional, el polipéptido de acuerdo con la invención se modifica en una o varias secuencias de reconocimiento de V8 proteasa y una o varias secuencias de reconocimiento de trombina. A este respecto, el residuo de aminoácido designado con E en la posición P1 se intercambia con otro residuo de aminoácido, preferiblemente, por el residuo de aminoácido designado con Q o A y el residuo de aminoácido designado con R en la posición P1 se intercambia con otro residuo de aminoácido, preferiblemente, por el residuo de aminoácido designado con K o A. Una forma de realización especialmente preferida se indica en la SEC ID N°: 11.

En una forma de realización preferida adicional, el polipéptido de acuerdo con la invención se modifica en una o varias secuencias de reconocimiento de proteasa que se identificaron después de una digestión con extracto de riñón. A este respecto, el residuo de aminoácido designado con Q en la posición P1 se intercambia con otro residuo de aminoácido, preferiblemente, por el residuo de aminoácido designado con N o A y el residuo de aminoácido designado con S en la posición P1 se intercambia con otro residuo de aminoácido, preferiblemente, por el residuo de aminoácido designado con T o A. Formas de realización especialmente preferidas se indican en la SEC ID N°: 12 y 13.

Las sustituciones de aminoácidos introducidas en el marco de la presente invención pueden realizarse con ayuda de técnicas convencionales de biología molecular que son conocidas para el experto y se indican, por ejemplo, en Sambrook y col., Molecular cloning. A laboratory manual; 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989. Así, con

- ayuda de cebadores de ARN, las mutaciones deseadas pueden integrarse en la secuencia de nucleótidos que codifica para los polipéptidos de acuerdo con la invención. Las secuencias de nucleótidos modificadas así obtenidas pueden expresarse luego en un huésped adecuado, preferiblemente *E. coli*, y purificarse los polipéptidos. La secuencia de nucleótidos que codifica para los polipéptidos de acuerdo con la invención puede además adaptarse a las células huésped correspondientes con el llamado uso de codones ("*codon-usage*") para conseguir una mejor expresión. Por tanto, la presente invención se refiere a la secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido de acuerdo con la invención, vectores de expresión correspondientes y células huésped para la producción de los polipéptidos de acuerdo con la invención.
- Los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden investigarse con distintos ensayos para determinar la sensibilidad a proteasas y/o actividad enzimática. Ejemplos de tales ensayos son digestión con proteasas y posterior separación de los fragmentos mediante electroforesis en gel de SDS, espectrometría de masas, ensayo de lisis celular sobre placas de agar, ensayo de lisis de líquidos mediante medición de la dispersión de la luz en el fotómetro, ensayo de zimograma para ensayo de actividad sobre geles.
- Los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden utilizarse en los sectores médico, terapéutico, diagnóstico, de tecnología medioambiental, cosmético o alimentario.
- La presente invención se refiere además a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido de acuerdo con la invención. Además, la presente invención se refiere a un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención.
- Además, la presente invención se refiere a células huésped adecuadas para la expresión del polipéptido de acuerdo con la invención. Una célula huésped adecuada para la expresión de los polipéptidos según la expresión comprende preferiblemente una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención. Preferiblemente, una célula huésped adecuada para la expresión del polipéptido de acuerdo con la invención se transforma con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención.
- A este respecto, en la modificación de los sitios de reconocimiento se modifica preferiblemente el sitio de reconocimiento de aquellas proteasas que existen de acuerdo con la invención en el campo de aplicación deseado. Así, se sabe que en los seres humanos o en animales existen, por ejemplo, las caspasas, trombina, granzima B, enterocinasa, factor Xa. El experto también conoce proteasas específicas para tejido, por ejemplo, las proteasas meprina y renina, que existen en el riñón. Además, también pueden existir proteasas de bacterias patógenas que desencadenan una infección en el ser humano o en animales o están presentes como flora secundaria. A éstas pertenecen, por ejemplo, la V8 proteasa de *Staphylococcus* o clostridiopeptidasa B de clostridios. Si los polipéptidos de acuerdo con la invención se usan en la terapia de aquellas infecciones, preferiblemente se modifican los sitios de reconocimiento para las proteasas que están presentes en las bacterias que son responsables de una infección que va a tratarse con terapia. Las regiones sensibles a proteasas de las enzimas lisantes de la pared celular se determinan preferiblemente de manera experimental mediante una digestión de las proteínas con proteasas que pueden obtenerse comercialmente, proteasas aisladas de organismos o muestras que contienen proteasas como, por ejemplo, muestras de alimentos, muestras medioambientales, extractos de órgano, muestras médicas y un posterior análisis de los productos de degradación formados con ayuda de determinación de secuencias (por ejemplo, secuenciación del extremo N o C terminal, mapeo de péptidos junto con espectrometría de masas) y determinación del tamaño (por ejemplo, espectrometría de masas, análisis de bandas de geles de SDS, filtración en gel analítica). Un campo de aplicación para enzimas lisantes de la pared celular es la aplicación tópica en heridas en forma de pomadas, cremas, tinturas o coberturas para heridas como vendajes o vendas, por ejemplo, en una infección por estafilococos o clostridios. Problemas de estabilidad adicionales para las enzimas lisantes de la pared celular pueden aparecer por el hecho de que en el cuidado de las heridas se usen parcialmente medicamentos o productos médicos que también contienen proteasas. Por ejemplo, en las heridas de la piel se intenta conseguir una ligera limpieza de la herida mediante fibrinólisis. Ejemplos de proteasas que se utilizan en el cuidado de heridas son fibrinolisisina, plasmina, estreptocinasa, clostridiopeptidasa A y proteasa de *Bacillus subtilis*. Los polipéptidos de acuerdo con la invención también presentan preferiblemente modificaciones de los sitios de reconocimiento para estas proteasas.
- En la industria alimentaria, medioambiental y cosmética también pueden estar presentes múltiples proteasas que o bien se producen por bacterias que se usan, por ejemplo, en la preparación de alimentos como lactobacilos, lactococos o distintas cepas de bacilos, o bien serán secretadas por gérmenes no deseados que serán lisados (por ejemplo, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Cl. perfringens*, *Cl. botulinum*). En bacterias que se usan en la preparación de alimentos como, por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. brevis*, *L. helveticus* o *Lactococcus lactis* se conocen, por ejemplo, respectivamente entre 60 y 130 proteasas. Adicionalmente, las proteasas también están presentes en los propios alimentos. Los polipéptidos de acuerdo con la invención presentan preferiblemente aquellas modificaciones de los sitios de reconocimiento de proteasas que existen en la industria alimentaria, medioambiental y cosmética.
- La presente invención se refiere además al polipéptido de acuerdo con la invención como fármaco o composición farmacéutica así como al uso del polipéptido de acuerdo con la invención como fármaco o composición farmacéutica para la prevención o terapia de enfermedades, que se provocan por bacterias Gram positivas, especialmente

clostridios, bacilos, listerias, estafilococos, lactobacilos, enterococos, aerococos, pediococos, estreptococos, micoplasmas y/o Leuconostoc.

5 La presente invención se refiere además al polipéptido de acuerdo con la invención como agente de diagnóstico o composición de diagnóstico, así como al uso del polipéptido de acuerdo con la invención como agente de diagnóstico o composición de diagnóstico en la Medicina para la detección de enfermedades, especialmente las que se provocan por bacterias Gram positivas, especialmente clostridios, bacilos, listerias, estafilococos, lactobacilos, enterococos, aerococos, pediococos, estreptococos, micoplasmas y/o Leuconostoc.

10 El polipéptido de acuerdo con la invención se usa además en el diagnóstico para lisar específicamente las bacterias que van a detectarse, de manera que puedan seguir una o varias etapas de detección que detectan constituyentes celulares específicos de las bacterias como, por ejemplo, ADN, ARN, enzimas, componentes de la pared celular. Por el estado de la técnica se conocen procedimientos adecuados para ello, por ejemplo, PCR, NASBA, hibridación, detecciones basadas en anticuerpos tales como ELISA, detecciones bioquímicas para determinadas enzimas
15 específicas, detecciones colorimétricas.

Además, la presente invención se refiere al uso del polipéptido de acuerdo con la invención para suprimir el crecimiento o la detección de bacterias Gram positivas en la industria medioambiental, alimentaria o cosmética.

20 Los siguientes ejemplos de realización sirven para explicar la invención, pero no deben interpretarse como limitantes.

Ejemplo 1: Digestión con proteasas de PlyPitti26

25 Se realizó una digestión de PlyPitti26 con las proteasas trombina y V8. Respectivamente, 90 µl de disolución de proteína (concentración de proteína 1,35 mg/ml) se mezclaron con 10 µl de trombina y en mezclas madre de control sólo con plasmina. Para la digestión con V8 proteasa se usaron 99 µl de disolución de proteína y 1 µl de disolución de proteasa. La concentración de las disoluciones madre de proteasa ascendió respectivamente a 500 µg/ml. Las
30 mezclas madre de ensayo se incubaron durante la noche a 25 °C en un tampón Tris 20 mM/HCl, pH 7,5, DTE 10 mM, ZnSO₄ 0,1 mM. Una parte de las muestras se mezcló con tampón de aplicación de gel de SDS y después de hervir se analizó sobre geles de SDS-poliacrilamida.

Se comprobó que PlyPitti26 fue completamente degradada por trombina, formándose dos fragmentos de proteína relativamente grandes, de los cuales uno contenía el dominio CHAP y el otro el dominio amidasa y CBD. En una
35 digestión con V8 proteasa se formaron varios fragmentos de proteína más pequeños, pero también definidos. En una digestión de control con plasmina no se realizó la fragmentación de la proteína en las condiciones especificadas. Los resultados se muestran en la Figura 2A.

Ejemplo 2: Ensayo de actividad de PlyPitti26 sin tratar y tratada con proteasas

40 En otros experimentos, las muestras se sometieron a prueba en el ensayo de lisis de líquidos para determinar la reactividad lítica con respecto a células de *Staphylococcus*. El ensayo de lisis de líquidos es un ensayo de actividad para enzimas lisantes de la pared celular en el que se mide la lisis celular bacteriana en tiempo real mediante dispersión de la luz en el fotómetro. A este respecto, la absorción a una longitud de onda de 600 nm es una medida
45 del número de células bacterianas presentes. Si se lisan las células bacterianas, la disolución de muestra se volverá poco a poco clara y la absorción medida disminuirá en el caso ideal hasta un valor de cero. Las bacterias de *Staphylococcus* se cultivaron en medio BHI hasta una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,8. Las células no inactivadas por calor se recogieron y se resuspendieron en tampón TBST (Tris 20 mM/HCl, pH 7,5, NaCl 60 mM, 0,1 % de Tween, CaCl₂ 2 mM) a una DO₆₀₀ de aproximadamente 1. 990 µl de suspensión celular se mezclaron
50 respectivamente con 10 µl de disolución enzimática (concentración de enzima en el ensayo 10 µg/ml) y la reducción de la absorción a 600 nm se siguió a 30 °C.

Se comprobó que en PlyPitti26 no diluida y en el control de plasmina se produjo una lisis completa de los estafilococos después de aproximadamente 1000 s, mientras que en las muestras digeridas con trombina y V8
55 proteasa ya no tuvo lugar una lisis celular visible, es decir, la enzima lisante de la pared celular se inactivó completamente. Los resultados se muestran en la Figura 2B.

Ejemplo 3. Estabilización de CHAP-AmiPitti26-CBDUSA

60 Una variante de endolisina producida sintéticamente activa contra estafilococos que está constituida por los dominios enzimáticamente activos CHAP y Ami de la endolisina de PlyPitti26 y por los dominios que se unen a la pared celular (CBD) de la endolisina del profago ΦSA2USA, que procede del genoma de la cepa de MRSA USA300 (Diep y col., The Lancet, 2006, 367, 731-739; número de acceso de la base de datos NC_007793) se designa
65 CHAP-AmiPitti26-CBDUSA.

Para estabilizar esta proteína frente a la digestión con trombina y digestión por V8 proteasa, tanto el sitio de escisión de trombina como también los sitios de escisión de V8 que se encuentran en el ligador entre el dominio CHAP y amidasa se modificaron por sustituciones de aminoácidos mediante mutagénesis dirigida a sitio. Las mutaciones simples, dobles, triples y cuádruples de acuerdo con la invención realizadas para este fin están resumidas en la

5 Tabla 3. Para todos los mutantes indicados en la Tabla 3, la actividad de endolisina contra estafilococos todavía se detectó después de la mutación en la prueba de lisis en placa como se describe más adelante. Las posiciones de aminoácidos indicadas en la tabla se refieren a las posiciones respectivas de la secuencia de tipo natural o a las

10 posiciones en polipéptidos modificados en los que no se introdujeron residuos de aminoácidos. Por ejemplo, la posición E163 está en una forma de realización de un polipéptido de acuerdo con la invención con una adición de aminoácido en la posición dos E164, entonces la posición E167 es E168. La posición se desplaza correspondientemente en más de una adición de aminoácido. Si un residuo de aminoácido se introduce primero en la posición 174, entonces la posición E163 queda igual, pero la posición E189 cambia a E190.

Tabla 3

15

Mutante	Sitio de escisión V8: V8 proteasa T: trombina	Intercambio
1	E163 (V8) R167 (T)	163Q 167K
2	E163 (V8) R167 (T)	163Q 167A
3	E163 (V8) R167 (T)	163A 167K
4	E163 (V8) R167 (T)	163A 167A
5	E179 (V8)	179Q
6	E179 (V8)	179A
7	E189 (V8)	189Q
8	E189 (V8)	179A
9	E163 (V8) R167 (T) E179 (V8) E189 (V8)	163Q 167A 179Q 189Q
10	E163 (V8) R167 (T) E179 (V8) E189 (V8)	163Q 167A 179A 189Q
11	E163 (V8) R167 (T) E179 (V8) E189 (V8)	163A 167A 179Q 189Q
12	E163 (V8) R167 (T) E179 (V8) E189 (V8)	163A 167A 179 ^a 189Q
13	R167 (T)	167A
14	E163 (V8)	163A
15	E163 (V8)	163Q
16	R167 (T)	167K
17	E179 (V8) E189 (V8)	179A 189Q
18	E179 (V8) E189 (V8)	179Q 189Q
19	E163 (V8) R167 (T) E189 (V8)	163Q 167A 189Q
20	E163 (V8) R167 (T) E189 (V8)	163A 167A 189Q

Las endolisinas se utilizaron a una concentración de 1 mg/ml en la digestión. Para la digestión con trombina se utilizaron 90 µl de proteína y 10 µl de trombina humana (disolución madre con 50 µg/ml). Las mezclas madre de ensayo se incubaron durante la noche a 25 °C en tampón (Tris 20 mM/HCl, pH 7,5, DTE 10 mM, ZnSO₄ 0,1 mM). Una parte de las muestras se mezcló con tampón de aplicación de gel de SDS y después de hervir se analizó sobre geles de SDS-poliacrilamida. La mutación de R en la posición 167 a A conduce a una insensibilización completa frente a trombina. Lo mismo es válido para la mutación de R en la posición 168 a A, después de la adición de A en la posición de aminoácido dos (CHAP-Ami_Pitti26-CBD-USA-Add2).

CHAP-Ami_Pitti26-CBD-USA no modificada, CHAP-Ami_Pitti26-CBD-USA-Add2 y el mutante 4 respectivo (E163A,R167A o E164A, R1678) también se digirieron con V8 proteasa. Las endolisinas se utilizaron en una concentración de 1 mg/ml en la digestión. Para la digestión con V8 proteasa se utilizaron 99 µl de proteína y 1 µl de V8 proteasa (disolución madre con 500 µg/ml). Las mezclas madre de ensayo se incubaron durante 15 min o 60 min en tampón Tris 20 mM/HCl, pH 7,5, DTE 10 mM, ZnSO₄ 0,1 mM. Una parte de las muestras se mezcló con tampón de aplicación de gel de SDS y después de hervir se analizó sobre geles de SDS-poliacrilamida. Aunque la mutación de E en la posición 163, o 164, a A no conduce a una insensibilización completa en comparación con V8 proteasa, el mutante según la invención está claramente estabilizado en comparación con el tipo natural en el que se produjo una digestión completa. El sitio de escisión de trombina modificado en la posición 167/168 no desempeñó ninguna función en la digestión con V8 proteasa realizada. En los polipéptidos modificados, dos fragmentos de aproximadamente 40 kDa todavía están presentes tanto después de 15 min como también después de 60 min, que en los polipéptidos no modificados sólo estuvieron presentes débilmente después de 15 min y después de 60 min ya no estuvieron presentes.

Ejemplo 4. Ensayo de lisis con endolisinas sensibles a proteasas y resistentes a proteasas

Para investigar si los polipéptidos de acuerdo con la invención todavía tienen la actividad deseada después del intercambio de aminoácidos, se sometieron a prueba en un ensayo de lisis en placa con distintas cepas de *Staphylococcus*. Las cepas de bacterias se cultivaron durante la noche en cultivos de 5 ml en medio BHI y las células bacterianas se centrifugaron 5 min a 4000 rpm en la centrífuga de mesa. El sedimento celular se resuspendió a continuación en 200 µl de tampón PBS (fosfato de Na 10 mM, NaCl 144 mM, KCl 50 mM, pH 7,4) y las células se inactivaron con calor 30 min a 80 °C. Las células inactivadas con calor se vertieron con 15 ml de agar superior en placas de Petri y se secaron. A continuación se salpicaron respectivamente 5 µg de proteína y las placas de agar se incubaron durante 1 h a 30 °C. Las coronas de lisis celular formadas en los sitios de las proteínas salpicadas se evaluaron visualmente y dependiendo del tamaño se valoraron con +++, ++ y + o con -, en caso de que no se produjera la lisis.

El resultado de la prueba para algunos de los polipéptidos de acuerdo con la invención está resumido en la Tabla 4.

Tabla 4

Especies de <i>Staphylococcus</i>	PlyPitti26 (no modificada)	Mutante 10 de la Tabla 3 (E163Q,R167A, E179A, E189Q)	Mutante 4 de la Tabla 3 (E163A, R167A)	CHAP-AmiPitti26-CBDUSA (no modificada)
MRSA de <i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	+++	+++
MRSA de <i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	+++	+++
MRSA de <i>Staphylococcus aureus</i>	++	+++	+++	+++
<i>Staphylococcus epidermis</i>	+++	+++	+++	+++
<i>Staphylococcus equorum</i>	+	++	++	++
<i>Staphylococcus sciuri</i>	-	++	+	++
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	+++	++	+++
<i>Staphylococcus sciuri</i>	-	-	-	-
MRSA de <i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	+++	+++

<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+++	+++	+++	+++
Negativa para coagulasa de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	++	++	++	++
Negativa para coagulasa de <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	++	++	++	++
Negativa para coagulasa de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	+++	+++	+++	+++

Tanto PlyPitti26 no modificada como también CHAP-AmiPitti26-CBDUSA presentaron un amplio espectro de lisis con respecto a distintas cepas de *Staphylococcus*, mostrando CHAP-AmiPitti26-CBDUSA una actividad lítica algo mejor. Los dos polipéptidos modificados de acuerdo con la invención mostrados en la tabla, Mutante 4 y Mutante 10 con los intercambios de aminoácidos en los sitios de escisión de trombina o distintos de V8 proteasa presentaron una actividad prácticamente idéntica a la de la proteína no modificada CHAP-AmiPitti26-CBDUSA. Esto mostró que las mutaciones de acuerdo con la invención no influyeron negativamente en la actividad de las enzimas lisantes de la pared celular. Lo mismo era válido para CHAP-Ami_Pitti26-CBD-USA-Add2 no modificada, así como los polipéptidos de CHAP-Ami_Pitti26-CBD-USA-Add2 modificada correspondientes.

Ejemplo 5: Enzimas que se unen a la pared celular modificadas contra *Clostridium difficile*

Dos endolisinas de distintos fagos de *Cl. difficile* (números de acceso YP_529586 para la endolisina del fago Φ CD119 y YP_001087453 para la endolisina de la cepa *Cl. difficile* 630) presentaron un sitio de escisión de la caspasa 1 singular después de los aminoácidos D214, mientras que un sitio de escisión de trombina singular sólo apareció en la endolisina del fago Φ CD119 en la posición 87. Debido a la alta similitud de secuencias de ambas endolisinas, además de las modificaciones de los sitios de escisión de la caspasa 1 de D214 a E214 en Φ CD119, la endolisina R en la posición 87 se intercambió por K, que en la endolisina homóloga de la cepa *Cl. difficile* 630 estaba presente en esta posición y no se reconoce por trombina como sitio de escisión. Otras modificaciones de acuerdo con la invención están representadas en la Tabla 2.

Ejemplo 6: Determinación de regiones sensibles a proteasas dentro de la secuencia de Ply511.

Ply511 tiene 6 posibles sitios de escisión para la peptidasa I de *Staphylococcus* (6 glutamatos) debido a su secuencia de aminoácidos. Para descubrir qué regiones de la endolisina Ply511 son especialmente sensibles a proteasas se realizaron experimentos de digestión con proteasas con la peptidasa I de *Staphylococcus*. Para la degradación con peptidasa I de *Staphylococcus* se usaron 99 μ l de disolución de proteína (concentración de aproximadamente 1 mg/ml) y 1 μ l de disolución de proteasa (concentración de aproximadamente 0,5 mg/ml). Las mezclas madre de ensayo se incubaron durante distintos intervalos de tiempo (minutos a varias horas) a 37 °C en un tampón con Tris 20 mM/HCl, NaCl 100 mM, pH 8,0. Las bandas de proteínas se separaron sobre geles de SDS. Los fragmentos de degradación formados se transfirieron a membranas de PVDF (poli(fluoruro de vinilideno)), se cortaron bandas bien separadas y se secuenció el extremo N terminal. Resultaron tres sitios de escisión preferidos para peptidasa I de *Staphylococcus* después de los aminoácidos E7, E40 y E89.

Ejemplo 7: Eliminación de sitios de escisión de peptidasa I de *Staphylococcus* en Ply511

En las posiciones E7, E40 y E89, las sustituciones se realizaron tanto como sustitución individual como en combinación, de manera que en los mutantes formados aparecieron otros aminoácidos, excepto glutamato, en las posiciones respectivas, que ya no se escinden por peptidasa I de *Staphylococcus*. Los mutantes así obtenidos se utilizaron en la digestión con proteasas descrita en el Ejemplo 6 y a continuación se analizaron sobre geles de SDS, si las bandas de degradación correspondientes todavía aparecían o no. Demostraron ser especialmente adecuadas las mutaciones E7A y E7Q, así como E40A y E40Q.

Ejemplo 8: Resistencia frente a trombina y V8 proteasa de distintas variantes de Plypitti26 y CHAP-AmiPitti26-CBDUSA.

Distintas combinaciones de mutantes de acuerdo con la invención de la Tabla 3 se introdujeron en la variante de Plypitti26 CHAP-AmiPitti26-CBDUSA y CHAP-AmiPitti26-CBDUSA-Add2 y se combinaron en parte con otras mutaciones. A continuación, estas variantes de endolisina se sometieron a prueba para determinar su resistencia frente a trombina y V8 proteasa, así como la actividad enzimática (detección como se ha descrito en el Ejemplo 3). Los resultados están resumidos en la Tabla 5 para CHAP-AmiPitti26-CBDUSA y sus modificaciones. Los resultados

ES 2 442 667 T3

para CHAP-AmiPitti26-CBDUSA-Add2 y sus modificaciones (las posiciones de aminoácidos están desplazadas una posición en la dirección del extremo C terminar con respecto a las posiciones en la tabla respectivamente) son idénticos y no se reproducen de nuevo en la Tabla 5.

Tabla 5: Resistencia frente a trombina y V8 proteasa de distintos mutantes de CHAP-Ampitti26_CBDUSA (en la tabla se denomina EADpitti26_CBDUSA) en comparación con el tipo natural de Plypitti26

Construceto de endolisina	plypitti26	EADpitti26_CBDUSA	EADpitti26_CBDUSA	EADpitti26_CBDUSA	EADpitti26_CBDUSA	EADpitti26_CBDUSA	EADpitti26_CBDUSA	EADpitti26_CBDUSA
Mutaciones		E163A, R167A, Y200H	E163A, R167A, E179A, E189Q, Y200H	L55H, L56T, E163A, R167A, Y200H	L55H, L56T, E163A, R167A, E179A, E189Q, Y200H	L55H, L56T, E163A, R167A, E179A, E189Q, Y200H	L55H, L56T, E163A, R167A	
Propiedad	Ensayo							
Resistencia frente a trombina	SDS-PAGE	+++	++	+++	+++	+++	+++	+
Resistencia frente a trombina	Flüssiglyse	-	-	++	++	++	-	+
Resistencia frente a V8 Proteasa	SDS-PAGE	-	+	-	-	+	-	-

Se mostró que las variantes de endolisina de acuerdo con la invención CHAP-Amipitti26_CBDUSA (E163A, R167A, Y200H), CHAP-Amipitti26_CBDUSA (E163A, R167A, E179A, E189Q, Y200H), CHAP-Amipitti26_CBDUSA (L55H, L56T, E163A, R167A, Y200H), CHAP-Amipitti26_CBDUSA (L55H, L56T, E163A, R167A, E179A, E189Q, Y200H) y CHAPAmipitti26_CBDUSA (E163A, R167A), así como CHAP-Amipitti26_CBDUSA-Add2 (E164A, R168A, Y201H), CHAPAmipitti26_CBDUSA-Add2 (E164A, R168A, E180A, E190Q, Y201H), CHAP-Amipitti26_CBDUSA-5 Add2 (L56H, L57T, E164A, R168A, Y201H), CHAP-Amipitti26_CBDUSA-Add2 (L56H, L57T, E164A, R168A, E180A, E190Q, Y201H) y CHAP-Amipitti26_CBDUSA-Add2 (E164A, R168A) presentaban una resistencia de buena a muy buena frente a la digestión con trombina. Las variantes de endolisina CHAP-Amipitti26_CBDUSA (L55H, L56T, E163A, R167A, Y200H) y CHAP-Amipitti26_CBDUSA (L55H, L56T, E163A, R167A, E179A, E189Q, Y200H), así como CHAP-Amipitti26_CBDUSA-Add2 (L56H, L57T, E164A, R168A, Y201H) y CHAP-Amipitti26_CBDUSA-Add2 (L56H, L57T, E164A, R168A, E180A, E190Q, Y201H), también mostraron en el ensayo de lisis de líquidos una alta actividad enzimática después de la digestión con trombina. Las variantes de endolisina CHAP-Amipitti26_CBDUSA (E163A, R167A, E179A, E189Q, Y200H) y CHAP-Amipitti26_CBDUSA (L55H, L56T, E163A, R167A, E179A, E189Q, Y200H), así como CHAP-Amipitti26_CBDUSA-Add2 (E164A, R168A, E180A, E190Q, Y201H) y CHAPAmipitti26_CBDUSA-Add2 (L56H, L57T, E164A, R168A, E180A, E190Q, Y201H), presentaban una resistencia mejorada frente a la digestión con V8 proteasas. Especialmente las sustituciones E179A y E189Q o E180A y E190Q demostraron ser ventajosas en este caso.

Ejemplo 9: Endolisinas con sitios de escisión de proteasas de acuerdo con la invención

Si una sustitución de acuerdo con la invención de un residuo de aminoácido demuestra ser ventajosa, puede detectarse mediante las detecciones descritas anteriormente para estabilidad de proteasas y actividad de endolisina. En la Tabla 6 se muestra una serie de ejemplos de endolisinas, que lisan representantes de distintos géneros de bacterias y que pueden estabilizar de acuerdo con la invención contra degradación por proteasas. Los sitios de escisión de proteasas se determinaron con el programa PeptideCutter (Gasteiger y col., Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server in John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005)).

Tabla 6: Endolisinas con sitios de escisión de proteasas de acuerdo con la Tabla 1

Endolisina (lisis de bacterias del genero)	Fuente para la secuencia de aminoácido (número de acceso de NCBI)	Sitios de escisión de proteasas para			V8 proteasa; número
		Trombina; número de aminoácidos P1 y secuencia de reconocimiento	Caspasa 1; número de aminoácidos P1 y secuencia de reconocimiento	Clostripaina; número	
PlyPitti26 (<i>Staphylococcus</i>)	Neu	167 (TAPR)		20	24
CHAP-AmiPitti26-CBDUSA (<i>Staphylococcus</i>)	Neu	167 (TAPR)		21	23
Amidasa del fago de <i>Staphylococcus</i> SAP-2	(YP_001491539)	39	42 (YIIDG)	7	9
Endolisina E1 (<i>Enterococcus</i>)	(NP_814147)	106 (FLPR)	358 (YGI ^U DY)	6	15
Endolisina E2 (<i>Enterococcus</i>)	(NP_815016)		330 (YIADG) y Caspasa 10 31 (I ^U AD)	13	13
Endolisina E5 (<i>Enterococcus</i>)	(NP_815749)		147 (WLADY)	8	13
Fab25 (<i>Enterococcus</i>)	Neu		112 (LLHDL)	14	9
B30-PlyGBS (<i>Streptococcus</i>)	(AAR99416)		388 (LSIDY)	12	18
Pal amidasa (<i>Streptococcus</i>)	(CAB07986)			14	13
Cp1 Lisina (<i>Streptococcus</i>)	(2IU_A)		133 (ETHDN)	7	12
LysK (<i>Staphylococcus</i>)	(YP_024461)		60 (LIIDY) y 67 (W ^U LIDN)	16	18
Ply187 (<i>Staphylococcus</i>)	(CAA69022)		596 (YATDI)	23	20
Lisostafina (<i>Staphylococcus</i>)	(AAB53783)			9	51
Ply511 (<i>Listeria</i>)	(Q38653)			6	6
Ply118 (<i>Listeria</i>)	Documento EP0781349 B1; SEQ ID N°: 4	262 (GTPR)	129 (YGI ^U DT)	8	6
PlyA500 (<i>Listeria</i>)	(AAY52812)			12	12
Ply21 (<i>Bacillus</i>)	(CAA72267)	82 (GRG)		15	13
PlyBA (<i>Bacillus</i>)	(CAA72266)			11	25
Ply12 (<i>Bacillus</i>)	(CAA72264)			14	10
PlyCD119 (<i>Clostridium</i>)	Neu	87 (GRG)	214 (LVTDI)	7	13
Ply3626 (<i>Clostridium</i>)	Documento US 7.371.375 B2; SEQ ID N°:2			17	27

Ejemplo 10: Determinación de sitios de escisión de clostripaína en endolisinas de *Listeria*

Como se puede ver en la Tabla 6, posibles sitios de escisión para clostripaína en endolisinas están frecuentemente presentes en mayor número (de 6 a 23 en los ejemplos descritos). Dado que una sustitución de todos los posibles sitios de escisión puede influir negativamente en la actividad de la endolisina, es útil determinar para la proteasa sitios de escisión accesibles y sólo modificar éstos. La endolisina de *Listeria* Ply511 contiene seis posibles sitios de escisión para clostripaína. Se realizó una digestión con clostripaína de Ply511 para determinar las regiones sensibles a clostripaína de la endolisina. Ply511 (0,1 mg/ml) se digirió durante 3 h o durante la noche a temperatura ambiente con 5 unidades de clostripaína (definición de unión según datos del fabricante, Sigma) en 60 µl de volumen de muestra con la siguiente composición: fosfato de sodio 25 mM, acetato de calcio 1 mM, DTT 2,5 mM, pH 7,6. Los fragmentos de proteína formados se separaron por electroforesis en gel de SDS (geles de gradiente 10 - 20 % de acrilamida). Aparecieron 3 bandas (pesos moleculares aproximadamente 25 kDa, aproximadamente 14 kDa, aproximadamente 10 kDa) que se transfirieron a membranas de PVDF, luego se cortaron y se secuenciaron mediante degradación de Edman del extremo N terminal.

Resultaron las siguientes secuencias del N terminales para los fragmentos:

1. (M)V K Y T V E N K; la metionina del N se disoció en parte
2. DKLAK
3. TSNATTF

Este resultado muestra que de los seis posibles sitios de escisión de clostripaína (R46, R62, R92, R221, R312, R326), dos son reconocidos por la proteasa, concretamente R92 y R221. Variantes estabilizadas de acuerdo con la invención de Ply511 tienen en estas posiciones intercambios de R a otros residuos de aminoácidos, especialmente R62K o R62A, así como R221K o R221A.

Ejemplo 11: Degradación por proteasas de una proteína terapéuticamente utilizable en distintos órganos y determinación de regiones sensibles a proteasas

En estudios de farmacocinética se comprobó que la endolisina utilizada contra estafilococos CHAP-Amipitti26_CBDUSA-Add2 (L56H, L57T, E164A, R168A, Y201H) ya no era detectable en diferentes órganos a distintas velocidades. Para someter a prueba si esto se atribuía a la degradación por proteasas, la endolisina se incubó con extractos de órgano y se analizaron posibles bandas de degradación sobre geles de SDS. Se congelaron muestras de tejido de hígado, corazón, bazo, riñón y pulmón de ratas, se descongelaron de nuevo y se homogeneizaron en el mismo volumen de tampón PBS. Por mezcla madre de ensayo se mezclaron 40 µl de CHAP-Amipitti26_CBDUSA-Add2 (L56H, L57T, E164A, R168A, Y201H) (1 mg/ml en Tris 20 mM, pH 8,0) y 10 µl de extracto de órgano (diluido 1:20 con PBS) y se incubaron durante 18 h a temperatura ambiente o a 4 °C. En los controles de proteína sólo se añadió tampón PBS en lugar de extracto de órgano y se incubó durante estos mismos tiempos, así como se preparó un control de proteína sin tiempo de incubación. Como otros controles se analizó respectivamente extracto de órgano sin adición de endolisina. Las muestras se mezclaron con tampón de muestra y se aplicaron sobre geles de SDS al 12 %.

Se mostró que sólo en las muestras en las que se añadió extracto de riñón tuvo lugar una significativa degradación de proteína durante el periodo de tiempo del experimento, en todos los otros extractos de órgano, así como los controles, la endolisina permaneció estable. En la incubación con el extracto de riñón se formaron fragmentos de proteína más grandes con tamaño definido, de manera que fue probable que la endolisina fuera degradada por una o menos proteasas específicas para riñón. Para determinar las regiones sensibles para esta(s) proteasa(s), las bandas formadas (marcadas con flechas y los números 1 a 7) se transfirieron a una membrana de PVDF y los polipéptidos se secuenciaron en el extremo N terminal mediante degradación de Edman. El tamaño aproximado de los fragmentos formados se derivó mediante una curva estándar que se creó a partir de las distancias recorridas de las bandas del patrón de peso molecular en el que se conocía el peso molecular. Resultaron los siguientes fragmentos que están resumidos en la Tabla 7. Los segmentos de proteínas formados se determinaron a partir de las secuencias N terminales determinadas junto con los tamaños de fragmentos.

Tabla 7: Fragmentos de la endolisina CHAP-Amipitti26_CBDUSA-Add2 (L56H, L57T, E164A, R168A, Y201H) después de la degradación mediante proteasa(s) específica(s) de riñón

Nº de banda	Tamaño (calculado a partir de la distancia recorrida en el gel) kDa	Secuencia N terminal	Segmento de proteína	Tamaño (calculado a partir de la secuencia de aminoácidos) kDa
1	58	ASIIMEV	Proteína completa, M N terminal disociada	55

2	43	ASIIM	Fragmento N terminal. Dominio CHAP y amidasa. EAD completo hasta el sitio de escisión antes de la banda 5 (ASSNTV)	44
3	25	ASKKETAPQ	Dominio de amidasa. Hasta el sitio de escisión antes de la banda 5 (ASSNTV).	24
4	19	ASIIMEVAT MQ	Fragmento N terminal. Dominio CHAP hasta el sitio de escisión antes de la banda 3 (ASKKETAPQ).	19
5	15	ASSNTV	Fragmento C terminal. CBD.	12
6	20	ASIIMEVAT	Fragmento N terminal. Dominio CHAP hasta el sitio de escisión antes de la banda 7 (XPTQA).	20
7	41	XPTQA	Fragmento C terminal. Dominio de amidasa y CBD.	36
X: aminoácido que no pudo definirse				

A partir de la determinación de las secuencias N terminales junto con la determinación del tamaño de los fragmentos formados resultó que las proteasas existentes en el extracto de riñón escindieron la endolisina CHAP-Amipitti26_CBDUSA-Add2 en 3 posiciones, concretamente después de los aminoácidos Q171, Q175 y S384. Una búsqueda de dominios conservados dentro de la endolisina CHAP-Amipitti26_CBDUSA-Add2 en CDD (*conserved domain database*) dio 3 dominios conservados, concretamente del extremo N terminal un dominio CHAP (aminoácidos 28 a 158), seguido de un dominio amidasa_2 (aminoácidos 199 a 346), así como un dominio SH3_5 situado en el extremo C terminal (aminoácidos 413 a 478). El dominio CHAP y amidasa 2 son los EAD, mientras que el dominio SH3_5 forma el CBD. Entre el dominio CHAP y amidasa 2 se encuentra una región de ligador de dominios (aminoácidos 159 a 198), así como un segundo ligador entre el dominio amidasa 2 y el CBD (aminoácidos 347 a 412). Los tres sitios de escisión encontrados se encontraron en medio de las regiones de ligador de dominios que han demostrado ser menos estables que los dominios conservados. No pudieron identificarse las proteasas de riñón que eran responsables de la degradación, pero llamó la atención que al menos una proteasa necesitara una Q en la posición P1, así como que los tres sitios de reconocimiento de proteasas fueran ricos en serinas y alaninas.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Biomerieux S.A. Hyglos Invest GmbH
- <120> Enzimas lisantes de la pared celular estables frente a proteasas
- <130> PRO-029 PCT/EP DIV 1
- <140> desconocido
- <141> 13-07-2012
- <150> Documento EP 07 114 785.4
- <151> 22-08-2007
- <150> Documento US 60/957 351
- <151> 22-08-2007
- <150> Documento DE 10 2007 061 929.6
- <151> 21-12-2007
- <150> Documento EP 08 152 096.7

<151> 28-08-2008

<150> Documento US 61/032 211

<151> 28-08-2008

5

<150> Documento DE 10 2008 023 448.6

<151> 14-05-2008

<160> 22

10

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 496

15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido que comprende sustitución en R167

20

<400> 1

Met Ser Ile Ile Met Glu Val Ala Thr Met Gln Ala Lys Leu Thr Lys
1 5 10 15

Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Thr Ser Glu Gly Lys Gln Phe Asn
20 25 30

Val Asp Leu Trp Tyr Gly Phe Gln Cys Phe Asp Tyr Ala Asn Ala Gly
35 40 45

Trp Lys Val Leu Phe Gly Leu Leu Leu Lys Gly Leu Gly Ala Lys Asp
50 55 60

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

Thr Pro Asp Phe Leu Ala Gln Pro Gly Asp Met Val Val Phe Gly Ser

ES 2 442 667 T3

				85						90					95				
Asn	Tyr	Gly	Ala	Gly	Tyr	Gly	His	Val	Ala	Trp	Val	Ile	Glu	Ala	Thr				
			100					105					110						
Leu	Asp	Tyr	Ile	Ile	Val	Tyr	Glu	Gln	Asn	Trp	Leu	Gly	Gly	Gly	Trp				
		115					120					125							
Thr	Asp	Arg	Ile	Glu	Gln	Pro	Gly	Trp	Gly	Trp	Glu	Lys	Val	Thr	Arg				
	130					135					140								
Arg	Gln	His	Ala	Tyr	Asp	Phe	Pro	Met	Trp	Phe	Ile	Arg	Pro	Asn	Phe				
145					150					155					160				
Lys	Ser	Glu	Thr	Ala	Pro	Ala	Ser	Ile	Gln	Ser	Pro	Thr	Gln	Ala	Ser				
				165					170					175					
Lys	Lys	Glu	Thr	Ala	Lys	Pro	Gln	Pro	Lys	Ala	Val	Glu	Leu	Lys	Ile				
			180					185					190						
Ile	Lys	Asp	Val	Val	Lys	Gly	Tyr	Asp	Leu	Pro	Lys	Arg	Gly	Gly	Asn				
		195					200					205							
Pro	Lys	Gly	Ile	Val	Ile	His	Asn	Asp	Ala	Gly	Ser	Lys	Gly	Ala	Thr				
	210					215					220								
Ala	Glu	Ala	Tyr	Arg	Asn	Gly	Leu	Val	Asn	Ala	Pro	Ser	Ser	Arg	Leu				
225					230					235					240				
Glu	Ala	Gly	Ile	Ala	His	Ser	Tyr	Val	Ser	Gly	Asn	Thr	Val	Trp	Gln				
				245					250					255					
Ala	Leu	Asp	Glu	Ser	Gln	Val	Gly	Trp	His	Thr	Ala	Asn	Gln	Leu	Gly				
		260						265					270						
Asn	Lys	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Glu	Val	Cys	Gln	Ser	Met	Gly	Ala	Asp				
		275					280					285							
Asn	Ala	Thr	Phe	Leu	Lys	Asn	Glu	Gln	Ala	Thr	Phe	Gln	Glu	Cys	Ala				
	290					295					300								
Arg	Leu	Leu	Lys	Lys	Trp	Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	Arg	Asn	Thr	Ile	Arg				
305					310					315					320				
Leu	His	Asn	Glu	Phe	Thr	Ser	Thr	Ser	Cys	Pro	His	Arg	Ser	Ser	Val				
				325					330					335					
Leu	His	Thr	Gly	Phe	Asp	Pro	Val	Thr	Arg	Gly	Leu	Leu	Pro	Glu	Asp				
			340					345						350					

ES 2 442 667 T3

Lys Arg Leu Gln Leu Lys Asp Tyr Phe Ile Lys Gln Ile Arg Ala Tyr
 355 360 365

Met Asp Gly Lys Ile Pro Val Ala Thr Val Ser Asn Glu Ser Ser Ala
 370 375 380

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

Ala Gly Tyr Thr Leu Asp Lys Asn Asn Val Pro Tyr Lys Lys Glu Gln
 405 410 415

Gly Asn Tyr Thr Val Ala Asn Val Lys Gly Asn Asn Val Arg Asp Gly
 420 425 430

Tyr Ser Thr Asn Ser Arg Ile Thr Gly Val Leu Pro Asn Asn Thr Thr
 435 440 445

Ile Thr Tyr Asp Gly Ala Tyr Cys Ile Asn Gly Tyr Arg Trp Ile Thr
 450 455 460

Tyr Ile Ala Asn Ser Gly Gln Arg Arg Tyr Ile Ala Thr Gly Glu Val
 465 470 475 480

Asp Ile Ala Gly Asn Arg Ile Ser Ser Phe Gly Lys Phe Ser Ala Val
 485 490 495

<210> 2
 <211> 496
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido que comprende sustitución en E163 y R167

10

<400> 2

ES 2 442 667 T3

Met Ser Ile Ile Met Glu Val Ala Thr Met Gln Ala Lys Leu Thr Lys
1 5 10 15

Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Thr Ser Glu Gly Lys Gln Phe Asn
20 25 30

Val Asp Leu Trp Tyr Gly Phe Gln Cys Phe Asp Tyr Ala Asn Ala Gly
35 40 45

Trp Lys Val Leu Phe Gly Leu Leu Leu Lys Gly Leu Gly Ala Lys Asp
50 55 60

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

ES 2 442 667 T3

Leu His Thr Gly Phe Asp Pro Val Thr Arg Gly Leu Leu Pro Glu Asp
 340 345 350

Lys Arg Leu Gln Leu Lys Asp Tyr Phe Ile Lys Gln Ile Arg Ala Tyr
 355 360 365

Met Asp Gly Lys Ile Pro Val Ala Thr Val Ser Asn Glu Ser Ser Ala
 370 375 380

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

Ala Gly Tyr Thr Leu Asp Lys Asn Asn Val Pro Tyr Lys Lys Glu Gln
 405 410 415

Gly Asn Tyr Thr Val Ala Asn Val Lys Gly Asn Asn Val Arg Asp Gly
 420 425 430

Tyr Ser Thr Asn Ser Arg Ile Thr Gly Val Leu Pro Asn Asn Thr Thr
 435 440 445

Ile Thr Tyr Asp Gly Ala Tyr Cys Ile Asn Gly Tyr Arg Trp Ile Thr
 450 455 460

Tyr Ile Ala Asn Ser Gly Gln Arg Arg Tyr Ile Ala Thr Gly Glu Val
 465 470 475 480

Asp Ile Ala Gly Asn Arg Ile Ser Ser Phe Gly Lys Phe Ser Ala Val
 485 490 495

5 <210> 3
 <211> 496
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido que comprende sustitución en E163, R167, E179, E189

ES 2 442 667 T3

<400> 3

Met Ser Ile Ile Met Glu Val Ala Thr Met Gln Ala Lys Leu Thr Lys
1 5 10 15

Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Thr Ser Glu Gly Lys Gln Phe Asn
 20 25 30

Val Asp Leu Trp Tyr Gly Phe Gln Cys Phe Asp Tyr Ala Asn Ala Gly
 35 40 45

Trp Lys Val Leu Phe Gly Leu Leu Leu Lys Gly Leu Gly Ala Lys Asp

ES 2 442 667 T3

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

Leu His Asn Glu Phe Thr Ser Thr Ser Cys Pro His Arg Ser Ser Val
 325 330 335
 Leu His Thr Gly Phe Asp Pro Val Thr Arg Gly Leu Leu Pro Glu Asp
 340 345 350
 Lys Arg Leu Gln Leu Lys Asp Tyr Phe Ile Lys Gln Ile Arg Ala Tyr
 355 360 365
 Met Asp Gly Lys Ile Pro Val Ala Thr Val Ser Asn Glu Ser Ser Ala
 370 375 380
 Ser Ser Asn Thr Val Lys Pro Val Ala Glu Leu Met Pro Pro Val Pro
 385 390 395 400
 Ala Gly Tyr Thr Leu Asp Lys Asn Asn Val Pro Tyr Lys Lys Glu Gln
 405 410 415
 Gly Asn Tyr Thr Val Ala Asn Val Lys Gly Asn Asn Val Arg Asp Gly
 420 425 430
 Tyr Ser Thr Asn Ser Arg Ile Thr Gly Val Leu Pro Asn Asn Thr Thr
 435 440 445
 Ile Thr Tyr Asp Gly Ala Tyr Cys Ile Asn Gly Tyr Arg Trp Ile Thr
 450 455 460
 Tyr Ile Ala Asn Ser Gly Gln Arg Arg Tyr Ile Ala Thr Gly Glu Val
 465 470 475 480
 Asp Ile Ala Gly Asn Arg Ile Ser Ser Phe Gly Lys Phe Ser Ala Val
 485 490 495

<210> 4
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido que comprende sustitución en D214

<400> 4

ES 2 442 667 T3

Met Lys Ile Gly Ile Asn Cys Gly His Thr Lys Thr Gly Ala Gly Ser
1 5 10 15

Gly Ala Ile Gly Lys Ile Asn Glu Ser Ile Glu Thr Arg Asn Val Gly
20 25 30

Tyr Lys Val Ile Asp Lys Leu Lys Lys Leu Gly Asn Asn Val Val Asp

ES 2 442 667 T3

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

<210> 5
 <211> 271
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido que comprende sustitución en R87 y D214

5

<400> 5

ES 2 442 667 T3

Met Lys Ile Gly Val Asn Cys Gly His Thr Lys Thr Gly Ala Gly Ser
1 5 10 15

Gly Ala Ile Gly Lys Ile Asn Glu Ser Ile Glu Thr Arg Asn Val Gly
20 25 30

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

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

Ala Thr Gln Ala Asn Arg Gln Asp Leu Asp Trp Phe Ile Ser Ile His
65 70 75 80

Phe Asn Ala Gly Lys Gly Lys Gly Cys Glu Val Tyr Thr Tyr Lys Gly
85 90 95

Lys Gln Tyr Gln Asp Ala Ile Asp Val Cys Lys Lys Ile Ser Asp Leu
100 105 110

Gly Phe Thr Asn Arg Gly Val Lys Asp Gly Ser Gly Leu Tyr Val Val
115 120 125

Lys Lys Thr Lys Ala Lys Ser Met Leu Ile Glu Val Cys Phe Val Asp
130 135 140

Ser Glu Asp Ala Asn Lys Tyr Leu Ser Leu Gly Ala Asp Lys Leu Ala
145 150 155 160

Thr Ala Ile Val Glu Ala Ile Thr Lys His Ile Ser Ser Ala Glu Glu
165 170 175

Asn Asn Tyr Asn Arg Tyr Lys His Thr Ile Val Tyr Ser Gly Asp Asp
180 185 190

Lys Val Ser Ala Asp Ile Leu Gly Leu Tyr Tyr Lys Arg Lys Lys Glu
195 200 205

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

Asn Leu Tyr Val Ile Gly Gly Val Thr Cys Asn Lys Met Lys Glu Met
225 230 235 240

Ser Lys Thr Thr Gly Glu Lys Phe Thr Gln Leu Tyr Gly Asn Asp Val

ES 2 442 667 T3

245

250

255

Trp Ser Thr Met Asp Lys Ala Ile Glu Phe Val Lys Glu Lys Leu
260 265 270

<210> 6
<211> 341
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Polipéptido que comprende sustitución en E7 y E40

10

<400> 6

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

Pro Ser Thr Pro Ser Thr Asn Leu Asp Lys Leu Gly Leu Val Asp Tyr
 195 200 205

Met Asn Ala Lys Lys Met Asp Ser Ser Tyr Ser Asn Arg Asp Lys Leu
 210 215 220

Ala Lys Gln Tyr Gly Ile Ala Asn Tyr Ser Gly Thr Ala Ser Gln Asn
 225 230 235 240

Thr Thr Leu Leu Ser Lys Ile Lys Gly Gly Ala Pro Lys Pro Ser Thr
 245 250 255

Pro Ala Pro Lys Pro Ser Thr Ser Thr Ala Lys Lys Ile Tyr Phe Pro
 260 265 270

Pro Asn Lys Gly Asn Trp Ser Val Tyr Pro Thr Asn Lys Ala Pro Val
 275 280 285

Lys Ala Asn Ala Ile Gly Ala Ile Asn Pro Thr Lys Phe Gly Gly Leu
 290 295 300

Thr Tyr Thr Ile Gln Lys Asp Arg Gly Asn Gly Val Tyr Glu Ile Gln
 305 310 315 320

Thr Asp Gln Phe Gly Arg Val Gln Val Tyr Gly Ala Pro Ser Thr Gly
 325 330 335

Ala Val Ile Lys Lys
 340

<210> 7
 <211> 341
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Polipéptido que comprende sustitución en R92K, R221K

<400> 7

5

10

ES 2 442 667 T3

Met Val Lys Tyr Thr Val Glu Asn Lys Ile Ile Ala Gly Leu Pro Lys
1 5 10 15

Gly Lys Leu Lys Gly Ala Asn Phe Val Ile Ala His Glu Thr Ala Asn
20 25 30

Ser Lys Ser Thr Ile Asp Asn Glu Val Ser Tyr Met Thr Arg Asn Trp
35 40 45

Lys Asn Ala Phe Val Thr His Phe Val Gly Gly Gly Gly Arg Val Val
50 55 60

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

Thr Asp Gln Phe Gly Arg Val Gln Val Tyr Gly Ala Pro Ser Thr Gly
325 330 335

Ala Val Ile Lys Lys
340

- 5 <210> 8
- <211> 341
- <212> PRT
- <213> artificial

- 10 <220>
- <223> Polipéptido que comprende sustitución en R92A, R221A

- <400> 8

ES 2 442 667 T3

Met Val Lys Tyr Thr Val Glu Asn Lys Ile Ile Ala Gly Leu Pro Lys
 1 5 10 15

Gly Lys Leu Lys Gly Ala Asn Phe Val Ile Ala His Glu Thr Ala Asn
 20 25 30

Ser Lys Ser Thr Ile Asp Asn Glu Val Ser Tyr Met Thr Arg Asn Trp
 35 40 45

Lys Asn Ala Phe Val Thr His Phe Val Gly Gly Gly Gly Arg Val Val
 50 55 60

Gln Val Ala Asn Val Asn Tyr Val Ser Trp Gly Ala Gly Gln Tyr Ala
 65 70 75 80

Asn Ser Tyr Ser Tyr Ala Gln Val Glu Leu Cys Ala Thr Ser Asn Ala
 85 90 95

Thr Thr Phe Lys Lys Asp Tyr Glu Val Tyr Cys Gln Leu Leu Val Asp
 100 105 110

Leu Ala Lys Lys Ala Gly Ile Pro Ile Thr Leu Asp Ser Gly Ser Lys
 115 120 125

Thr Ser Asp Lys Gly Ile Lys Ser His Lys Trp Val Ala Asp Lys Leu
 130 135 140

Gly Gly Thr Thr His Gln Asp Pro Tyr Ala Tyr Leu Ser Ser Trp Gly
 145 150 155 160

Ile Ser Lys Ala Gln Phe Ala Ser Asp Leu Ala Lys Val Ser Gly Gly
 165 170 175

Gly Asn Thr Gly Thr Ala Pro Ala Lys Pro Ser Thr Pro Ala Pro Lys
 180 185 190

Pro Ser Thr Pro Ser Thr Asn Leu Asp Lys Leu Gly Leu Val Asp Tyr
 195 200 205

Met Asn Ala Lys Lys Met Asp Ser Ser Tyr Ser Asn Ala Asp Lys Leu
 210 215 220

Ala Lys Gln Tyr Gly Ile Ala Asn Tyr Ser Gly Thr Ala Ser Gln Asn
 225 230 235 240

Thr Thr Leu Leu Ser Lys Ile Lys Gly Gly Ala Pro Lys Pro Ser Thr
 245 250 255

Pro Ala Pro Lys Pro Ser Thr Ser Thr Ala Lys Lys Ile Tyr Phe Pro
 260 265 270

Pro Asn Lys Gly Asn Trp Ser Val Tyr Pro Thr Asn Lys Ala Pro Val
 275 280 285

Lys Ala Asn Ala Ile Gly Ala Ile Asn Pro Thr Lys Phe Gly Gly Leu
 290 295 300

Thr Tyr Thr Ile Gln Lys Asp Arg Gly Asn Gly Val Tyr Glu Ile Gln
 305 310 315 320

Thr Asp Gln Phe Gly Arg Val Gln Val Tyr Gly Ala Pro Ser Thr Gly
 325 330 335

Ala Val Ile Lys Lys
 340

<210> 9
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido que comprende sustitución en D112E

10

<400> 9

ES 2 442 667 T3

Met Ala Tyr Lys Val Glu Arg Arg Ile Arg Pro Gly Leu Pro Gln Val
1 5 10 15

Gly Tyr Ala Pro Tyr Gly Gln Val His Ala His Ser Thr Gly Asn Pro
20 25 30

Arg Ser Thr Ala Gln Asn Glu Ala Asp Tyr Phe Gln Thr Lys Asp Ile
35 40 45

Thr Thr Gly Phe Tyr Thr His Leu Val Gly Asn Gly Arg Val Ile Gln
50 55 60

ES 2 442 667 T3

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

<210> 10
<211> 317
<212> PRT
<213> artificial

5

<220>
<223> Polipéptido que comprende sustitución en D112A

10

<400> 10

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

ES 2 442 667 T3

Ala Gly Gly Gln Pro Tyr Asn Tyr Gly Tyr Val Phe Leu Leu Asp Ala
225 230 235 240

Lys Thr Gly Lys Glu Ile Ala Arg Gln Leu Ala Gly Ala Val Ser Arg
245 250 255

Pro Asp Val Thr Lys Ala Tyr Gly Val Lys Gly Gly Thr Asn Tyr Gly
260 265 270

Leu Asp Val Thr Phe Asp Val Lys Lys Leu Lys Gly Lys Lys Phe Tyr
275 280 285

Ala Met Phe Arg Arg Thr Asn Asp Lys Ala Gly Asn Thr Ala Gly Gly
290 295 300

His Lys Asp Ile Gly Phe Asn Glu Phe Tyr Phe Thr Leu
305 310 315

<210> 11
<211> 496
<212> PRT
<213> artificial

5

<220>
<223> Polipéptido que comprende sustitución en E163, R167

10

<400> 11

ES 2 442 667 T3

Met Ser Ile Ile Met Glu Val Ala Thr Met Gln Ala Lys Leu Thr Lys
 1 5 10 15

Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Thr Ser Glu Gly Lys Gln Phe Asn
 20 25 30

Val Asp Leu Trp Tyr Gly Phe Gln Cys Phe Asp Tyr Ala Asn Ala Gly
 35 40 45

Trp Lys Val Leu Phe Gly Leu Leu Leu Lys Gly Leu Gly Ala Lys Asp
 50 55 60

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

Thr Pro Asp Phe Leu Ala Gln Pro Gly Asp Met Val Val Phe Gly Ser
 85 90 95

Asn Tyr Gly Ala Gly Tyr Gly His Val Ala Trp Val Ile Glu Ala Thr
 100 105 110

Leu Asp Tyr Ile Ile Val Tyr Glu Gln Asn Trp Leu Gly Gly Gly Trp

ES 2 442 667 T3

115	120	125																		
Thr	Asp	Arg	Ile	Glu	Gln	Pro	Gly	Trp	Gly	Trp	Glu	Lys	Val	Thr	Arg					
130						135					140									
Arg	Gln	His	Ala	Tyr	Asp	Phe	Pro	Met	Trp	Phe	Ile	Arg	Pro	Asn	Phe					
145					150					155					160					
Lys	Ser	Gln	Thr	Ala	Pro	Ala	Ser	Ile	Gln	Ser	Pro	Thr	Gln	Ala	Ser					
				165					170					175						
Lys	Lys	Glu	Thr	Ala	Lys	Pro	Gln	Pro	Lys	Ala	Val	Glu	Leu	Lys	Ile					
			180					185					190							
Ile	Lys	Asp	Val	Val	Lys	Gly	Tyr	Asp	Leu	Pro	Lys	Arg	Gly	Gly	Asn					
		195					200					205								
Pro	Lys	Gly	Ile	Val	Ile	His	Asn	Asp	Ala	Gly	Ser	Lys	Gly	Ala	Thr					
	210					215					220									
Ala	Glu	Ala	Tyr	Arg	Asn	Gly	Leu	Val	Asn	Ala	Pro	Ser	Ser	Arg	Leu					
225					230					235					240					
Glu	Ala	Gly	Ile	Ala	His	Ser	Tyr	Val	Ser	Gly	Asn	Thr	Val	Trp	Gln					
				245					250					255						
Ala	Leu	Asp	Glu	Ser	Gln	Val	Gly	Trp	His	Thr	Ala	Asn	Gln	Leu	Gly					
		260						265					270							
Asn	Lys	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Glu	Val	Cys	Gln	Ser	Met	Gly	Ala	Asp					
		275					280					285								
Asn	Ala	Thr	Phe	Leu	Lys	Asn	Glu	Gln	Ala	Thr	Phe	Gln	Glu	Cys	Ala					
	290					295					300									
Arg	Leu	Leu	Lys	Lys	Trp	Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	Arg	Asn	Thr	Ile	Arg					
305					310					315					320					
Leu	His	Asn	Glu	Phe	Thr	Ser	Thr	Ser	Cys	Pro	His	Arg	Ser	Ser	Val					
				325					330					335						
Leu	His	Thr	Gly	Phe	Asp	Pro	Val	Thr	Arg	Gly	Leu	Leu	Pro	Glu	Asp					
			340					345					350							
Lys	Arg	Leu	Gln	Leu	Lys	Asp	Tyr	Phe	Ile	Lys	Gln	Ile	Arg	Ala	Tyr					
		355					360					365								
Met	Asp	Gly	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Thr	Val	Ser	Asn	Glu	Ser	Ser	Ala					
	370					375					380									

ES 2 442 667 T3

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

Ala Gly Tyr Thr Leu Asp Lys Asn Asn Val Pro Tyr Lys Lys Glu Gln
405 410 415

Gly Asn Tyr Thr Val Ala Asn Val Lys Gly Asn Asn Val Arg Asp Gly
420 425 430

Tyr Ser Thr Asn Ser Arg Ile Thr Gly Val Leu Pro Asn Asn Thr Thr
435 440 445

Ile Thr Tyr Asp Gly Ala Tyr Cys Ile Asn Gly Tyr Arg Trp Ile Thr
450 455 460

Tyr Ile Ala Asn Ser Gly Gln Arg Arg Tyr Ile Ala Thr Gly Glu Val
465 470 475 480

Asp Ile Ala Gly Asn Arg Ile Ser Ser Phe Gly Lys Phe Ser Ala Val
485 490 495

<210> 12

<211> 497

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> Polipéptido que comprende sustituciones en L56, L57, E164, R168, Y201, Q171, Q175, S384

<400> 12

Met Ala Ser Ile Ile Met Glu Val Ala Thr Met Gln Ala Lys Leu Thr
1 5 10 15

Lys Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Thr Ser Glu Gly Lys Gln Phe
20 25 30

Asn Val Asp Leu Trp Tyr Gly Phe Gln Cys Phe Asp Tyr Ala Asn Ala
35 40 45

Gly Trp Lys Val Leu Phe Gly His Thr Leu Lys Gly Leu Gly Ala Lys
50 55 60

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

Asn Thr Pro Asp Phe Leu Ala Gln Pro Gly Asp Met Val Val Phe Gly
85 90 95

Ser Asn Tyr Gly Ala Gly Tyr Gly His Val Ala Trp Val Ile Glu Ala
100 105 110

Thr Leu Asp Tyr Ile Ile Val Tyr Glu Gln Asn Trp Leu Gly Gly Gly
115 120 125

Trp Thr Asp Arg Ile Glu Gln Pro Gly Trp Gly Trp Glu Lys Val Thr
130 135 140

Arg Arg Gln His Ala Tyr Asp Phe Pro Met Trp Phe Ile Arg Pro Asn
145 150 155 160

Phe Lys Ser Ala Thr Ala Pro Ala Ser Ile Asn Ser Pro Thr Asn Ala
165 170 175

Ser Lys Lys Glu Thr Ala Lys Pro Gln Pro Lys Ala Val Glu Leu Lys
180 185 190

Ile Ile Lys Asp Val Val Lys Gly His Asp Leu Pro Lys Arg Gly Gly
195 200 205

Asn Pro Lys Gly Ile Val Ile His Asn Asp Ala Gly Ser Lys Gly Ala
210 215 220

Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Asn Gly Leu Val Asn Ala Pro Ser Ser Arg
225 230 235 240

Leu Glu Ala Gly Ile Ala His Ser Tyr Val Ser Gly Asn Thr Val Trp
245 250 255

Gln Ala Leu Asp Glu Ser Gln Val Gly Trp His Thr Ala Asn Gln Leu
260 265 270

Gly Asn Lys Tyr Tyr Tyr Gly Ile Glu Val Cys Gln Ser Met Gly Ala
275 280 285

Asp Asn Ala Thr Phe Leu Lys Asn Glu Gln Ala Thr Phe Gln Glu Cys
290 295 300

Ala Arg Leu Leu Lys Lys Trp Gly Leu Pro Ala Asn Arg Asn Thr Ile
305 310 315 320

Arg Leu His Asn Glu Phe Thr Ser Thr Ser Cys Pro His Arg Ser Ser
325 330 335

Val Leu His Thr Gly Phe Asp Pro Val Thr Arg Gly Leu Leu Pro Glu
340 345 350

Asp Lys Arg Leu Gln Leu Lys Asp Tyr Phe Ile Lys Gln Ile Arg Ala

ES 2 442 667 T3

	355		360		365														
	Tyr	Met	Asp	Gly	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Thr	Val	Ser	Asn	Glu	Ser	Thr			
	370						375					380							
	Ala	Ser	Ser	Asn	Thr	Val	Lys	Pro	Val	Ala	Glu	Leu	Met	Pro	Pro	Val			
	385					390					395					400			
	Pro	Ala	Gly	Tyr	Thr	Leu	Asp	Lys	Asn	Asn	Val	Pro	Tyr	Lys	Lys	Glu			
					405					410					415				
	Gln	Gly	Asn	Tyr	Thr	Val	Ala	Asn	Val	Lys	Gly	Asn	Asn	Val	Arg	Asp			
				420					425					430					
	Gly	Tyr	Ser	Thr	Asn	Ser	Arg	Ile	Thr	Gly	Val	Leu	Pro	Asn	Asn	Thr			
			435					440					445						
	Thr	Ile	Thr	Tyr	Asp	Gly	Ala	Tyr	Cys	Ile	Asn	Gly	Tyr	Arg	Trp	Ile			
	450						455					460							
	Thr	Tyr	Ile	Ala	Asn	Ser	Gly	Gln	Arg	Arg	Tyr	Ile	Ala	Thr	Gly	Glu			
	465					470					475					480			
	Val	Asp	Ile	Ala	Gly	Asn	Arg	Ile	Ser	Ser	Phe	Gly	Lys	Phe	Ser	Ala			
					485					490					495				
	Val																		

<210> 13
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido que comprende sustituciones en L56, L57, E164, R168, Y201, Q171, Q175, S384

10

<400> 13

ES 2 442 667 T3

Met Ala Ser Ile Ile Met Glu Val Ala Thr Met Gln Ala Lys Leu Thr
1 5 10 15

Lys Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Thr Ser Glu Gly Lys Gln Phe
20 25 30

Asn Val Asp Leu Trp Tyr Gly Phe Gln Cys Phe Asp Tyr Ala Asn Ala
35 40 45

Gly Trp Lys Val Leu Phe Gly His Thr Leu Lys Gly Leu Gly Ala Lys
50 55 60

ES 2 442 667 T3

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

Arg Leu His Asn Glu Phe Thr Ser Thr Ser Cys Pro His Arg Ser Ser
 325 330 335

Val Leu His Thr Gly Phe Asp Pro Val Thr Arg Gly Leu Leu Pro Glu
 340 345 350

Asp Lys Arg Leu Gln Leu Lys Asp Tyr Phe Ile Lys Gln Ile Arg Ala
 355 360 365

Tyr Met Asp Gly Lys Ile Pro Val Ala Thr Val Ser Asn Glu Ser Ala
 370 375 380

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

Pro Ala Gly Tyr Thr Leu Asp Lys Asn Asn Val Pro Tyr Lys Lys Glu
 405 410 415

Gln Gly Asn Tyr Thr Val Ala Asn Val Lys Gly Asn Asn Val Arg Asp
 420 425 430

Gly Tyr Ser Thr Asn Ser Arg Ile Thr Gly Val Leu Pro Asn Asn Thr
 435 440 445

Thr Ile Thr Tyr Asp Gly Ala Tyr Cys Ile Asn Gly Tyr Arg Trp Ile
 450 455 460

Thr Tyr Ile Ala Asn Ser Gly Gln Arg Arg Tyr Ile Ala Thr Gly Glu
 465 470 475 480

Val Asp Ile Ala Gly Asn Arg Ile Ser Ser Phe Gly Lys Phe Ser Ala
 485 490 495

Val

- <210> 14
- <211> 497
- <212> PRT
- <213> artificial

5

- <220>
- <223> Polipéptido que comprende sustitución en R168

10

- <400> 14

ES 2 442 667 T3

Met Ala Ser Ile Ile Met Glu Val Ala Thr Met Gln Ala Lys Leu Thr
1 5 10 15

Lys Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Thr Ser Glu Gly Lys Gln Phe
 20 25 30

ES 2 442 667 T3

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

Asp Asn Ala Thr Phe Leu Lys Asn Glu Gln Ala Thr Phe Gln Glu Cys
 290 295 300
 Ala Arg Leu Leu Lys Lys Trp Gly Leu Pro Ala Asn Arg Asn Thr Ile
 305 310 315 320
 Arg Leu His Asn Glu Phe Thr Ser Thr Ser Cys Pro His Arg Ser Ser
 325 330 335
 Val Leu His Thr Gly Phe Asp Pro Val Thr Arg Gly Leu Leu Pro Glu
 340 345 350
 Asp Lys Arg Leu Gln Leu Lys Asp Tyr Phe Ile Lys Gln Ile Arg Ala
 355 360 365
 Tyr Met Asp Gly Lys Ile Pro Val Ala Thr Val Ser Asn Glu Ser Ser
 370 375 380
 Ala Ser Ser Asn Thr Val Lys Pro Val Ala Glu Leu Met Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Pro Ala Gly Tyr Thr Leu Asp Lys Asn Asn Val Pro Tyr Lys Lys Glu
 405 410 415
 Gln Gly Asn Tyr Thr Val Ala Asn Val Lys Gly Asn Asn Val Arg Asp
 420 425 430
 Gly Tyr Ser Thr Asn Ser Arg Ile Thr Gly Val Leu Pro Asn Asn Thr
 435 440 445
 Thr Ile Thr Tyr Asp Gly Ala Tyr Cys Ile Asn Gly Tyr Arg Trp Ile
 450 455 460
 Thr Tyr Ile Ala Asn Ser Gly Gln Arg Arg Tyr Ile Ala Thr Gly Glu
 465 470 475 480
 Val Asp Ile Ala Gly Asn Arg Ile Ser Ser Phe Gly Lys Phe Ser Ala
 485 490 495

Val

<210> 15
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>

<223> Polipéptido que comprende sustitución en E163 y R167

<400> 15

5

ES 2 442 667 T3

Met Ala Ser Ile Ile Met Glu Val Ala Thr Met Gln Ala Lys Leu Thr
 1 5 10 15

Lys Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Thr Ser Glu Gly Lys Gln Phe
 20 25 30

Asn Val Asp Leu Trp Tyr Gly Phe Gln Cys Phe Asp Tyr Ala Asn Ala
 35 40 45

Gly Trp Lys Val Leu Phe Gly Leu Leu Leu Lys Gly Leu Gly Ala Lys
 50 55 60

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

Asn Thr Pro Asp Phe Leu Ala Gln Pro Gly Asp Met Val Val Phe Gly
 85 90 95

Ser Asn Tyr Gly Ala Gly Tyr Gly His Val Ala Trp Val Ile Glu Ala
 100 105 110

Thr Leu Asp Tyr Ile Ile Val Tyr Glu Gln Asn Trp Leu Gly Gly Gly
 115 120 125

Trp Thr Asp Arg Ile Glu Gln Pro Gly Trp Gly Trp Glu Lys Val Thr
 130 135 140

Arg Arg Gln His Ala Tyr Asp Phe Pro Met Trp Phe Ile Arg Pro Asn
 145 150 155 160

Phe Lys Ser Ala Thr Ala Pro Ala Ser Ile Gln Ser Pro Thr Gln Ala
 165 170 175

Ser Lys Lys Glu Thr Ala Lys Pro Gln Pro Lys Ala Val Glu Leu Lys
 180 185 190

Ile Ile Lys Asp Val Val Lys Gly Tyr Asp Leu Pro Lys Arg Gly Gly
 195 200 205

Asn Pro Lys Gly Ile Val Ile His Asn Asp Ala Gly Ser Lys Gly Ala
 210 215 220

Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Asn Gly Leu Val Asn Ala Pro Ser Ser Arg
 225 230 235 240

Leu Glu Ala Gly Ile Ala His Ser Tyr Val Ser Gly Asn Thr Val Trp
 245 250 255

Gln Ala Leu Asp Glu Ser Gln Val Gly Trp His Thr Ala Asn Gln Leu
 260 265 270

Gly Asn Lys Tyr Tyr Tyr Gly Ile Glu Val Cys Gln Ser Met Gly Ala
 275 280 285

Asp Asn Ala Thr Phe Leu Lys Asn Glu Gln Ala Thr Phe Gln Glu Cys
 290 295 300

Ala Arg Leu Leu Lys Lys Trp Gly Leu Pro Ala Asn Arg Asn Thr Ile
 305 310 315 320

Arg Leu His Asn Glu Phe Thr Ser Thr Ser Cys Pro His Arg Ser Ser
 325 330 335

Val Leu His Thr Gly Phe Asp Pro Val Thr Arg Gly Leu Leu Pro Glu
 340 345 350

Asp Lys Arg Leu Gln Leu Lys Asp Tyr Phe Ile Lys Gln Ile Arg Ala
 355 360 365

Tyr Met Asp Gly Lys Ile Pro Val Ala Thr Val Ser Asn Glu Ser Ser
 370 375 380

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

Pro Ala Gly Tyr Thr Leu Asp Lys Asn Asn Val Pro Tyr Lys Lys Glu
 405 410 415

Gln Gly Asn Tyr Thr Val Ala Asn Val Lys Gly Asn Asn Val Arg Asp
 420 425 430

Gly Tyr Ser Thr Asn Ser Arg Ile Thr Gly Val Leu Pro Asn Asn Thr
 435 440 445

Thr Ile Thr Tyr Asp Gly Ala Tyr Cys Ile Asn Gly Tyr Arg Trp Ile
 450 455 460

Thr Tyr Ile Ala Asn Ser Gly Gln Arg Arg Tyr Ile Ala Thr Gly Glu
 465 470 475 480

Val Asp Ile Ala Gly Asn Arg Ile Ser Ser Phe Gly Lys Phe Ser Ala
 485 490 495

Val

ES 2 442 667 T3

<210> 16
<211> 497
<212> PRT
<213> artificial

5

<220>
<223> Polipéptido que comprende sustitución en E163, R167, E179, E189

10

<400> 16

ES 2 442 667 T3

Met Ala Ser Ile Ile Met Glu Val Ala Thr Met Gln Ala Lys Leu Thr
1 5 10 15

Lys Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Thr Ser Glu Gly Lys Gln Phe
20 25 30

Asn Val Asp Leu Trp Tyr Gly Phe Gln Cys Phe Asp Tyr Ala Asn Ala
35 40 45

Gly Trp Lys Val Leu Phe Gly Leu Leu Leu Lys Gly Leu Gly Ala Lys
50 55 60

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

Asn Thr Pro Asp Phe Leu Ala Gln Pro Gly Asp Met Val Val Phe Gly
85 90 95

Ser Asn Tyr Gly Ala Gly Tyr Gly His Val Ala Trp Val Ile Glu Ala
100 105 110

Thr Leu Asp Tyr Ile Ile Val Tyr Glu Gln Asn Trp Leu Gly Gly Gly
115 120 125

Trp Thr Asp Arg Ile Glu Gln Pro Gly Trp Gly Trp Glu Lys Val Thr
130 135 140

Arg Arg Gln His Ala Tyr Asp Phe Pro Met Trp Phe Ile Arg Pro Asn
145 150 155 160

Phe Lys Ser Gln Thr Ala Pro Ala Ser Ile Gln Ser Pro Thr Gln Ala
165 170 175

Ser Lys Lys Ala Thr Ala Lys Pro Gln Pro Lys Ala Val Gln Leu Lys
180 185 190

Ile Ile Lys Asp Val Val Lys Gly Tyr Asp Leu Pro Lys Arg Gly Gly
195 200 205

Asn Pro Lys Gly Ile Val Ile His Asn Asp Ala Gly Ser Lys Gly Ala
210 215 220

Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Asn Gly Leu Val Asn Ala Pro Ser Ser Arg
 225 230 235 240

Leu Glu Ala Gly Ile Ala His Ser Tyr Val Ser Gly Asn Thr Val Trp
 245 250 255

Gln Ala Leu Asp Glu Ser Gln Val Gly Trp His Thr Ala Asn Gln Leu
 260 265 270

Gly Asn Lys Tyr Tyr Tyr Gly Ile Glu Val Cys Gln Ser Met Gly Ala
 275 280 285

Asp Asn Ala Thr Phe Leu Lys Asn Glu Gln Ala Thr Phe Gln Glu Cys
 290 295 300

Ala Arg Leu Leu Lys Lys Trp Gly Leu Pro Ala Asn Arg Asn Thr Ile
 305 310 315 320

Arg Leu His Asn Glu Phe Thr Ser Thr Ser Cys Pro His Arg Ser Ser
 325 330 335

Val Leu His Thr Gly Phe Asp Pro Val Thr Arg Gly Leu Leu Pro Glu
 340 345 350

Asp Lys Arg Leu Gln Leu Lys Asp Tyr Phe Ile Lys Gln Ile Arg Ala
 355 360 365

Tyr Met Asp Gly Lys Ile Pro Val Ala Thr Val Ser Asn Glu Ser Ser
 370 375 380

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

Pro Ala Gly Tyr Thr Leu Asp Lys Asn Asn Val Pro Tyr Lys Lys Glu
 405 410 415

Gln Gly Asn Tyr Thr Val Ala Asn Val Lys Gly Asn Asn Val Arg Asp
 420 425 430

Gly Tyr Ser Thr Asn Ser Arg Ile Thr Gly Val Leu Pro Asn Asn Thr
 435 440 445

Thr Ile Thr Tyr Asp Gly Ala Tyr Cys Ile Asn Gly Tyr Arg Trp Ile
 450 455 460

Thr Tyr Ile Ala Asn Ser Gly Gln Arg Arg Tyr Ile Ala Thr Gly Glu
 465 470 475 480

Val Asp Ile Ala Gly Asn Arg Ile Ser Ser Phe Gly Lys Phe Ser Ala

485

490

495

Val

5 <210> 17
<211> 497
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Polipéptido que comprende sustitución en E163, R167

<400> 17

Met Ala Ser Ile Ile Met Glu Val Ala Thr Met Gln Ala Lys Leu Thr
1 5 10 15

Lys Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Thr Ser Glu Gly Lys Gln Phe
20 25 30

Asn Val Asp Leu Trp Tyr Gly Phe Gln Cys Phe Asp Tyr Ala Asn Ala
35 40 45

Gly Trp Lys Val Leu Phe Gly Leu Leu Leu Lys Gly Leu Gly Ala Lys
50 55 60

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

Asn Thr Pro Asp Phe Leu Ala Gln Pro Gly Asp Met Val Val Phe Gly
85 90 95

Ser Asn Tyr Gly Ala Gly Tyr Gly His Val Ala Trp Val Ile Glu Ala
100 105 110

Thr Leu Asp Tyr Ile Ile Val Tyr Glu Gln Asn Trp Leu Gly Gly Gly
115 120 125

Trp Thr Asp Arg Ile Glu Gln Pro Gly Trp Gly Trp Glu Lys Val Thr
130 135 140

Arg Arg Gln His Ala Tyr Asp Phe Pro Met Trp Phe Ile Arg Pro Asn
145 150 155 160

Phe Lys Ser Gln Thr Ala Pro Ala Ser Ile Gln Ser Pro Thr Gln Ala
165 170 175

Ser Lys Lys Glu Thr Ala Lys Pro Gln Pro Lys Ala Val Glu Leu Lys
180 185 190

ES 2 442 667 T3

Ile Ile Lys Asp Val Val Lys Gly Tyr Asp Leu Pro Lys Arg Gly Gly
 195 200 205

Asn Pro Lys Gly Ile Val Ile His Asn Asp Ala Gly Ser Lys Gly Ala
 210 215 220

Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Asn Gly Leu Val Asn Ala Pro Ser Ser Arg
 225 230 235 240

Leu Glu Ala Gly Ile Ala His Ser Tyr Val Ser Gly Asn Thr Val Trp
 245 250 255

Gln Ala Leu Asp Glu Ser Gln Val Gly Trp His Thr Ala Asn Gln Leu
 260 265 270

Gly Asn Lys Tyr Tyr Tyr Gly Ile Glu Val Cys Gln Ser Met Gly Ala
 275 280 285

Asp Asn Ala Thr Phe Leu Lys Asn Glu Gln Ala Thr Phe Gln Glu Cys
 290 295 300

Ala Arg Leu Leu Lys Lys Trp Gly Leu Pro Ala Asn Arg Asn Thr Ile
 305 310 315 320

Arg Leu His Asn Glu Phe Thr Ser Thr Ser Cys Pro His Arg Ser Ser
 325 330 335

Val Leu His Thr Gly Phe Asp Pro Val Thr Arg Gly Leu Leu Pro Glu
 340 345 350

Asp Lys Arg Leu Gln Leu Lys Asp Tyr Phe Ile Lys Gln Ile Arg Ala
 355 360 365

Tyr Met Asp Gly Lys Ile Pro Val Ala Thr Val Ser Asn Glu Ser Ser
 370 375 380

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

Pro Ala Gly Tyr Thr Leu Asp Lys Asn Asn Val Pro Tyr Lys Lys Glu
 405 410 415

Gln Gly Asn Tyr Thr Val Ala Asn Val Lys Gly Asn Asn Val Arg Asp
 420 425 430

Gly Tyr Ser Thr Asn Ser Arg Ile Thr Gly Val Leu Pro Asn Asn Thr
 435 440 445

Thr Ile Thr Tyr Asp Gly Ala Tyr Cys Ile Asn Gly Tyr Arg Trp Ile

ES 2 442 667 T3

450

455

460

Thr Tyr Ile Ala Asn Ser Gly Gln Arg Arg Tyr Ile Ala Thr Gly Glu
465 470 475 480

Val Asp Ile Ala Gly Asn Arg Ile Ser Ser Phe Gly Lys Phe Ser Ala
485 490 495

Val

<210> 18

<211> 496

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> CHAP-AMIpitti26-CBDUSA

<400> 18

ES 2 442 667 T3

Met Ser Ile Ile Met Glu Val Ala Thr Met Gln Ala Lys Leu Thr Lys
 1 5 10 15

Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Thr Ser Glu Gly Lys Gln Phe Asn
 20 25 30

Val Asp Leu Trp Tyr Gly Phe Gln Cys Phe Asp Tyr Ala Asn Ala Gly
 35 40 45

Trp Lys Val Leu Phe Gly Leu Leu Leu Lys Gly Leu Gly Ala Lys Asp
 50 55 60

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

Thr Pro Asp Phe Leu Ala Gln Pro Gly Asp Met Val Val Phe Gly Ser
 85 90 95

Asn Tyr Gly Ala Gly Tyr Gly His Val Ala Trp Val Ile Glu Ala Thr
 100 105 110

Leu Asp Tyr Ile Ile Val Tyr Glu Gln Asn Trp Leu Gly Gly Gly Trp
 115 120 125

Thr Asp Arg Ile Glu Gln Pro Gly Trp Gly Trp Glu Lys Val Thr Arg
 130 135 140

Arg Gln His Ala Tyr Asp Phe Pro Met Trp Phe Ile Arg Pro Asn Phe
 145 150 155 160

ES 2 442 667 T3

Lys Ser Glu Thr Ala Pro Arg Ser Ile Gln Ser Pro Thr Gln Ala Ser
 165 170 175
 Lys Lys Glu Thr Ala Lys Pro Gln Pro Lys Ala Val Glu Leu Lys Ile
 180 185 190
 Ile Lys Asp Val Val Lys Gly Tyr Asp Leu Pro Lys Arg Gly Gly Asn
 195 200 205
 Pro Lys Gly Ile Val Ile His Asn Asp Ala Gly Ser Lys Gly Ala Thr
 210 215 220
 Ala Glu Ala Tyr Arg Asn Gly Leu Val Asn Ala Pro Ser Ser Arg Leu
 225 230 235 240
 Glu Ala Gly Ile Ala His Ser Tyr Val Ser Gly Asn Thr Val Trp Gln
 245 250 255
 Ala Leu Asp Glu Ser Gln Val Gly Trp His Thr Ala Asn Gln Leu Gly
 260 265 270
 Asn Lys Tyr Tyr Tyr Gly Ile Glu Val Cys Gln Ser Met Gly Ala Asp
 275 280 285
 Asn Ala Thr Phe Leu Lys Asn Glu Gln Ala Thr Phe Gln Glu Cys Ala
 290 295 300
 Arg Leu Leu Lys Lys Trp Gly Leu Pro Ala Asn Arg Asn Thr Ile Arg
 305 310 315 320
 Leu His Asn Glu Phe Thr Ser Thr Ser Cys Pro His Arg Ser Ser Val
 325 330 335
 Leu His Thr Gly Phe Asp Pro Val Thr Arg Gly Leu Leu Pro Glu Asp
 340 345 350
 Lys Arg Leu Gln Leu Lys Asp Tyr Phe Ile Lys Gln Ile Arg Ala Tyr
 355 360 365
 Met Asp Gly Lys Ile Pro Val Ala Thr Val Ser Asn Glu Ser Ser Ala
 370 375 380
 Ser Ser Asn Thr Val Lys Pro Val Ala Glu Leu Met Pro Pro Val Pro
 385 390 395 400
 Ala Gly Tyr Thr Leu Asp Lys Asn Asn Val Pro Tyr Lys Lys Glu Gln
 405 410 415
 Gly Asn Tyr Thr Val Ala Asn Val Lys Gly Asn Asn Val Arg Asp Gly

ES 2 442 667 T3

420 425 430

Tyr Ser Thr Asn Ser Arg Ile Thr Gly Val Leu Pro Asn Asn Thr Thr
435 440 445

Ile Thr Tyr Asp Gly Ala Tyr Cys Ile Asn Gly Tyr Arg Trp Ile Thr
450 455 460

Tyr Ile Ala Asn Ser Gly Gln Arg Arg Tyr Ile Ala Thr Gly Glu Val
465 470 475 480

Asp Ile Ala Gly Asn Arg Ile Ser Ser Phe Gly Lys Phe Ser Ala Val
485 490 495

5 <210> 19
<211> 497
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> CHAP-AMIpitti26- CBDUSA-Add2
<400> 19

ES 2 442 667 T3

Met Ala Ser Ile Ile Met Glu Val Ala Thr Met Gln Ala Lys Leu Thr
1 5 10 15

Lys Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Thr Ser Glu Gly Lys Gln Phe
20 25 30

Asn Val Asp Leu Trp Tyr Gly Phe Gln Cys Phe Asp Tyr Ala Asn Ala
35 40 45

Gly Trp Lys Val Leu Phe Gly Leu Leu Leu Lys Gly Leu Gly Ala Lys
50 55 60

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

Asn Thr Pro Asp Phe Leu Ala Gln Pro Gly Asp Met Val Val Phe Gly
85 90 95

Ser Asn Tyr Gly Ala Gly Tyr Gly His Val Ala Trp Val Ile Glu Ala
100 105 110

Thr Leu Asp Tyr Ile Ile Val Tyr Glu Gln Asn Trp Leu Gly Gly Gly
115 120 125

Trp Thr Asp Arg Ile Glu Gln Pro Gly Trp Gly Trp Glu Lys Val Thr
130 135 140

Arg Arg Gln His Ala Tyr Asp Phe Pro Met Trp Phe Ile Arg Pro Asn
 145 150 155 160

Phe Lys Ser Glu Thr Ala Pro Arg Ser Ile Gln Ser Pro Thr Gln Ala
 165 170 175

Ser Lys Lys Glu Thr Ala Lys Pro Gln Pro Lys Ala Val Glu Leu Lys
 180 185 190

Ile Ile Lys Asp Val Val Lys Gly Tyr Asp Leu Pro Lys Arg Gly Gly
 195 200 205

Asn Pro Lys Gly Ile Val Ile His Asn Asp Ala Gly Ser Lys Gly Ala
 210 215 220

Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Asn Gly Leu Val Asn Ala Pro Ser Ser Arg
 225 230 235 240

Leu Glu Ala Gly Ile Ala His Ser Tyr Val Ser Gly Asn Thr Val Trp
 245 250 255

Gln Ala Leu Asp Glu Ser Gln Val Gly Trp His Thr Ala Asn Gln Leu
 260 265 270

Gly Asn Lys Tyr Tyr Tyr Gly Ile Glu Val Cys Gln Ser Met Gly Ala
 275 280 285

Asp Asn Ala Thr Phe Leu Lys Asn Glu Gln Ala Thr Phe Gln Glu Cys
 290 295 300

Ala Arg Leu Leu Lys Lys Trp Gly Leu Pro Ala Asn Arg Asn Thr Ile
 305 310 315 320

Arg Leu His Asn Glu Phe Thr Ser Thr Ser Cys Pro His Arg Ser Ser
 325 330 335

Val Leu His Thr Gly Phe Asp Pro Val Thr Arg Gly Leu Leu Pro Glu
 340 345 350

Asp Lys Arg Leu Gln Leu Lys Asp Tyr Phe Ile Lys Gln Ile Arg Ala
 355 360 365

Tyr Met Asp Gly Lys Ile Pro Val Ala Thr Val Ser Asn Glu Ser Ser
 370 375 380

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

Pro Ala Gly Tyr Thr Leu Asp Lys Asn Asn Val Pro Tyr Lys Lys Glu

ES 2 442 667 T3

					405					410						415
Gln	Gly	Asn	Tyr	Thr	Val	Ala	Asn	Val	Lys	Gly	Asn	Asn	Val	Arg	Asp	
			420					425					430			
Gly	Tyr	Ser	Thr	Asn	Ser	Arg	Ile	Thr	Gly	Val	Leu	Pro	Asn	Asn	Thr	
		435					440						445			
Thr	Ile	Thr	Tyr	Asp	Gly	Ala	Tyr	Cys	Ile	Asn	Gly	Tyr	Arg	Trp	Ile	
	450					455					460					
Thr	Tyr	Ile	Ala	Asn	Ser	Gly	Gln	Arg	Arg	Tyr	Ile	Ala	Thr	Gly	Glu	
465					470					475					480	
Val	Asp	Ile	Ala	Gly	Asn	Arg	Ile	Ser	Ser	Phe	Gly	Lys	Phe	Ser	Ala	
				485					490						495	

Val

- <210> 20
- <211> 393
- 5 <212> PRT
- <213> artificial
- <220>
- 10 <223> CHAP-AMIpitti26
- <400> 20

ES 2 442 667 T3

Met Ser Ile Ile Met Glu Val Ala Thr Met Gln Ala Lys Leu Thr Lys
 1 5 10 15

Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Thr Ser Glu Gly Lys Gln Phe Asn
 20 25 30

Val Asp Leu Trp Tyr Gly Phe Gln Cys Phe Asp Tyr Ala Asn Ala Gly
 35 40 45

Trp Lys Val Leu Phe Gly Leu Leu Leu Lys Gly Leu Gly Ala Lys Asp
 50 55 60

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

Thr Pro Asp Phe Leu Ala Gln Pro Gly Asp Met Val Val Phe Gly Ser
 85 90 95

Asn Tyr Gly Ala Gly Tyr Gly His Val Ala Trp Val Ile Glu Ala Thr
 100 105 110

Leu Asp Tyr Ile Ile Val Tyr Glu Gln Asn Trp Leu Gly Gly Gly Trp
 115 120 125
 Thr Asp Arg Ile Glu Gln Pro Gly Trp Gly Trp Glu Lys Val Thr Arg
 130 135 140
 Arg Gln His Ala Tyr Asp Phe Pro Met Trp Phe Ile Arg Pro Asn Phe
 145 150 155 160
 Lys Ser Glu Thr Ala Pro Arg Ser Ile Gln Ser Pro Thr Gln Ala Ser
 165 170 175
 Lys Lys Glu Thr Ala Lys Pro Gln Pro Lys Ala Val Glu Leu Lys Ile
 180 185 190
 Ile Lys Asp Val Val Lys Gly Tyr Asp Leu Pro Lys Arg Gly Gly Asn
 195 200 205
 Pro Lys Gly Ile Val Ile His Asn Asp Ala Gly Ser Lys Gly Ala Thr
 210 215 220
 Ala Glu Ala Tyr Arg Asn Gly Leu Val Asn Ala Pro Ser Ser Arg Leu
 225 230 235 240
 Glu Ala Gly Ile Ala His Ser Tyr Val Ser Gly Asn Thr Val Trp Gln
 245 250 255
 Ala Leu Asp Glu Ser Gln Val Gly Trp His Thr Ala Asn Gln Leu Gly
 260 265 270
 Asn Lys Tyr Tyr Tyr Gly Ile Glu Val Cys Gln Ser Met Gly Ala Asp
 275 280 285
 Asn Ala Thr Phe Leu Lys Asn Glu Gln Ala Thr Phe Gln Glu Cys Ala
 290 295 300
 Arg Leu Leu Lys Lys Trp Gly Leu Pro Ala Asn Arg Asn Thr Ile Arg
 305 310 315 320
 Leu His Asn Glu Phe Thr Ser Thr Ser Cys Pro His Arg Ser Ser Val
 325 330 335
 Leu His Thr Gly Phe Asp Pro Val Thr Arg Gly Leu Leu Pro Glu Asp
 340 345 350
 Lys Arg Leu Gln Leu Lys Asp Tyr Phe Ile Lys Gln Ile Arg Ala Tyr
 355 360 365
 Met Asp Gly Lys Ile Pro Val Ala Thr Val Ser Asn Glu Ser Ser Ala

ES 2 442 667 T3

370

375

380

Ser Ser Asn Thr Val Lys Pro Val Ala
385 390

- 5 <210> 21
<211> 341
<212> PRT
<213> Bacteriófago A511

<400> 21

Met Val Lys Tyr Thr Val Glu Asn Lys Ile Ile Ala Gly Leu Pro Lys
 1 5 10 15

 Gly Lys Leu Lys Gly Ala Asn Phe Val Ile Ala His Glu Thr Ala Asn
 20 25 30

 Ser Lys Ser Thr Ile Asp Asn Glu Val Ser Tyr Met Thr Arg Asn Trp
 35 40 45

 Lys Asn Ala Phe Val Thr His Phe Val Gly Gly Gly Gly Arg Val Val
 50 55 60

 Gln Val Ala Asn Val Asn Tyr Val Ser Trp Gly Ala Gly Gln Tyr Ala
 65 70 75 80

 Asn Ser Tyr Ser Tyr Ala Gln Val Glu Leu Cys Arg Thr Ser Asn Ala
 85 90 95

 Thr Thr Phe Lys Lys Asp Tyr Glu Val Tyr Cys Gln Leu Leu Val Asp
 100 105 110

 Leu Ala Lys Lys Ala Gly Ile Pro Ile Thr Leu Asp Ser Gly Ser Lys
 115 120 125

 Thr Ser Asp Lys Gly Ile Lys Ser His Lys Trp Val Ala Asp Lys Leu
 130 135 140

 Gly Gly Thr Thr His Gln Asp Pro Tyr Ala Tyr Leu Ser Ser Trp Gly
 145 150 155 160

 Ile Ser Lys Ala Gln Phe Ala Ser Asp Leu Ala Lys Val Ser Gly Gly
 165 170 175

 Gly Asn Thr Gly Thr Ala Pro Ala Lys Pro Ser Thr Pro Ala Pro Lys
 180 185 190

 Pro Ser Thr Pro Ser Thr Asn Leu Asp Lys Leu Gly Leu Val Asp Tyr
 195 200 205

ES 2 442 667 T3

Met Asn Ala Lys Lys Met Asp Ser Ser Tyr Ser Asn Arg Asp Lys Leu
 210 215 220

Ala Lys Gln Tyr Gly Ile Ala Asn Tyr Ser Gly Thr Ala Ser Gln Asn
 225 230 235 240

Thr Thr Leu Leu Ser Lys Ile Lys Gly Gly Ala Pro Lys Pro Ser Thr
 245 250 255

Pro Ala Pro Lys Pro Ser Thr Ser Thr Ala Lys Lys Ile Tyr Phe Pro
 260 265 270

Pro Asn Lys Gly Asn Trp Ser Val Tyr Pro Thr Asn Lys Ala Pro Val
 275 280 285

Lys Ala Asn Ala Ile Gly Ala Ile Asn Pro Thr Lys Phe Gly Gly Leu
 290 295 300

Thr Tyr Thr Ile Gln Lys Asp Arg Gly Asn Gly Val Tyr Glu Ile Gln
 305 310 315 320

Thr Asp Gln Phe Gly Arg Val Gln Val Tyr Gly Ala Pro Ser Thr Gly
 325 330 335

Ala Val Ile Lys Lys
 340

<210> 22
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Polipéptido que comprende sustituciones en L56, L57, E164, R168, Y201

<400> 22

5

10

ES 2 442 667 T3

Met Ala Ser Ile Ile Met Glu Val Ala Thr Met Gln Ala Lys Leu Thr
1 5 10 15

Lys Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Thr Ser Glu Gly Lys Gln Phe
20 25 30

Asn Val Asp Leu Trp Tyr Gly Phe Gln Cys Phe Asp Tyr Ala Asn Ala
35 40 45

Gly Trp Lys Val Leu Phe Gly His Thr Leu Lys Gly Leu Gly Ala Lys
50 55 60

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

Val Leu His Thr Gly Phe Asp Pro Val Thr Arg Gly Leu Leu Pro Glu
 340 345 350

Asp Lys Arg Leu Gln Leu Lys Asp Tyr Phe Ile Lys Gln Ile Arg Ala
 355 360 365

Tyr Met Asp Gly Lys Ile Pro Val Ala Thr Val Ser Asn Glu Ser Ser
 370 375 380

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

Pro Ala Gly Tyr Thr Leu Asp Lys Asn Asn Val Pro Tyr Lys Lys Glu
 405 410 415

Gln Gly Asn Tyr Thr Val Ala Asn Val Lys Gly Asn Asn Val Arg Asp
 420 425 430

Gly Tyr Ser Thr Asn Ser Arg Ile Thr Gly Val Leu Pro Asn Asn Thr
 435 440 445

Thr Ile Thr Tyr Asp Gly Ala Tyr Cys Ile Asn Gly Tyr Arg Trp Ile
 450 455 460

Thr Tyr Ile Ala Asn Ser Gly Gln Arg Arg Tyr Ile Ala Thr Gly Glu
 465 470 475 480

Val Asp Ile Ala Gly Asn Arg Ile Ser Ser Phe Gly Lys Phe Ser Ala
 485 490 495

Val

REIVINDICACIONES

- 5 1. Variante polipeptídica del polipéptido de acuerdo con la SEQ ID N°: 1, seleccionándose la variante polipeptídica del grupo que consiste en: SEQ ID N°: 2, 3, 11, 12 y 13.
2. Molécula de ácido nucleico, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1.
- 10 3. Vector de expresión, que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2.
4. Célula huésped que contiene una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2 o un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 3.
- 15 5. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 como fármaco o como agente de diagnóstico.
6. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso como fármaco para la prevención o la terapia de enfermedades provocadas por bacterias Gram positivas, en particular clostridios, bacilos, listerias, estafilococos, lactobacilos, enterococos, aerococos, pediococos, estreptococos, micoplasmas y/o Leuconostoc.
- 20 7. Uso del polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 para la supresión del crecimiento de bacterias Gram positivas en las industrias medioambiental, alimentaria o cosmética.
- 25 8. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso como agente de diagnóstico en medicina e industrias medioambiental, alimentaria o cosmética.

Fig. 1

10	20	30	40	50	60
MSIIMEVATM	QAKLTKKEFI	EWLKTSEGKQ	FNVDLWYGFQ	CFDYANAGWK	VLFGLLLKGL
70	80	90	100	110	120
GAKDIPFANN	FDGLATVYQN	TPDFLAQPGD	MVVFGSNYGA	GYGHVAWVIE	ATLDYIIVYE
130	140	150	160	170	180
QNWLGGGWID	RIEQPGWWE	KVTRRQHAYD	FPMWFIRPNF	KSETAPRSIQ	SPTQASKKET
190	200	210	220	230	240
AKPQPKAVEL	KIIKDVVKGY	DLPKRGGNPK	GIVIHNDAGS	KGATAEAYRN	GLVNAPSSRL
250	260	270	280	290	300
EAGIAHSYVS	GNTVWQALDE	SQVGWHTANQ	LGNKYYYGIE	VCQSMGADNA	TFLKNEQATF
310	320	330	340	350	360
QECARLLKKW	GLPANRNTIR	LHNEFTSTSC	PHRSSVLHTG	FDPVIRGLLP	EDKRLQLKDY
370	380	390			
FIKQIRAYMD	GKIPVATVSN	ESSASSNTVK	PVA		

Fig. 2

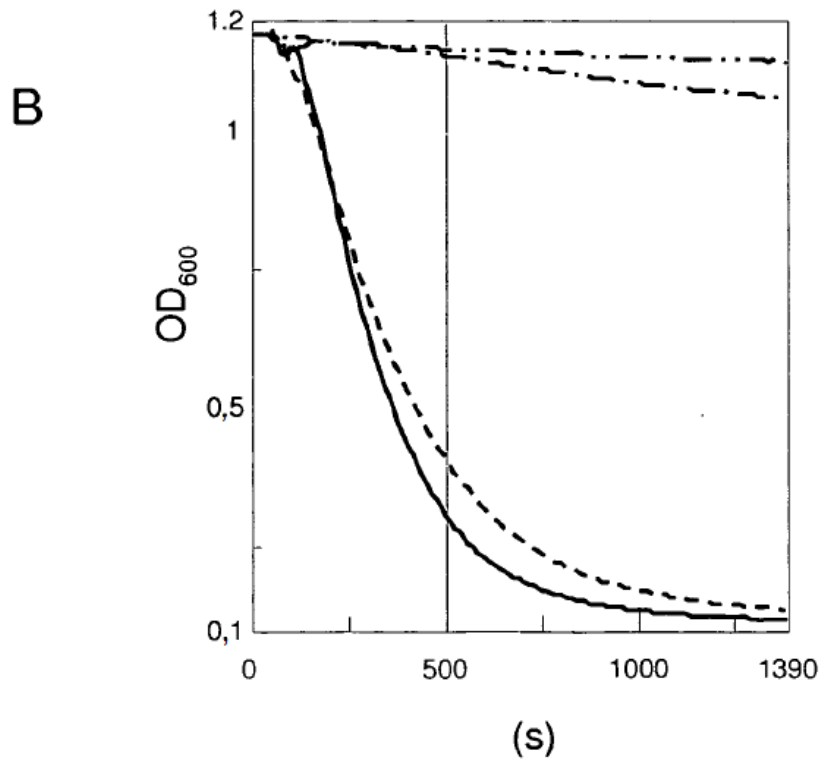
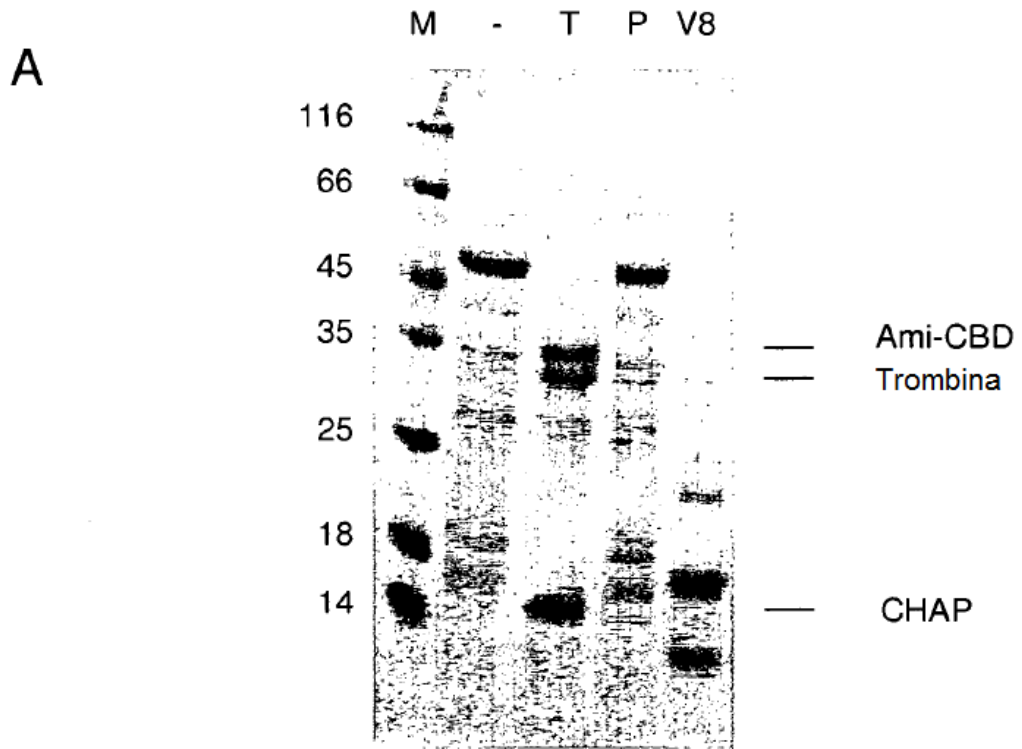
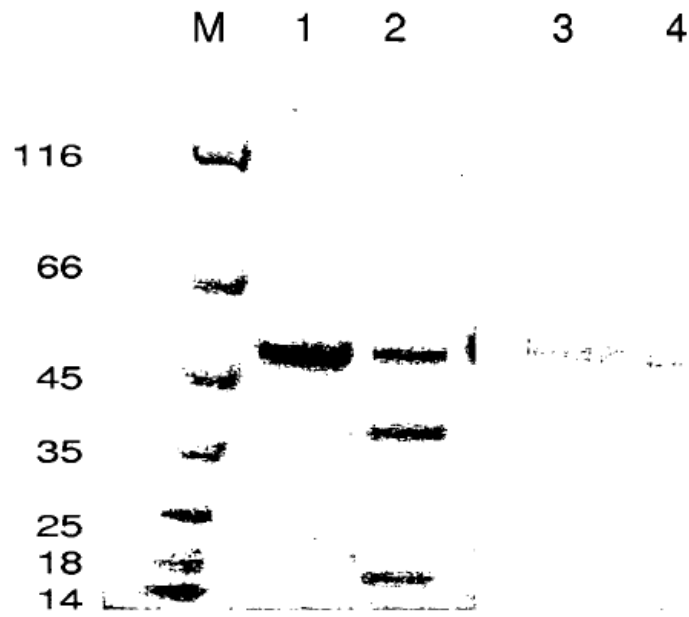


Fig. 3

A



B

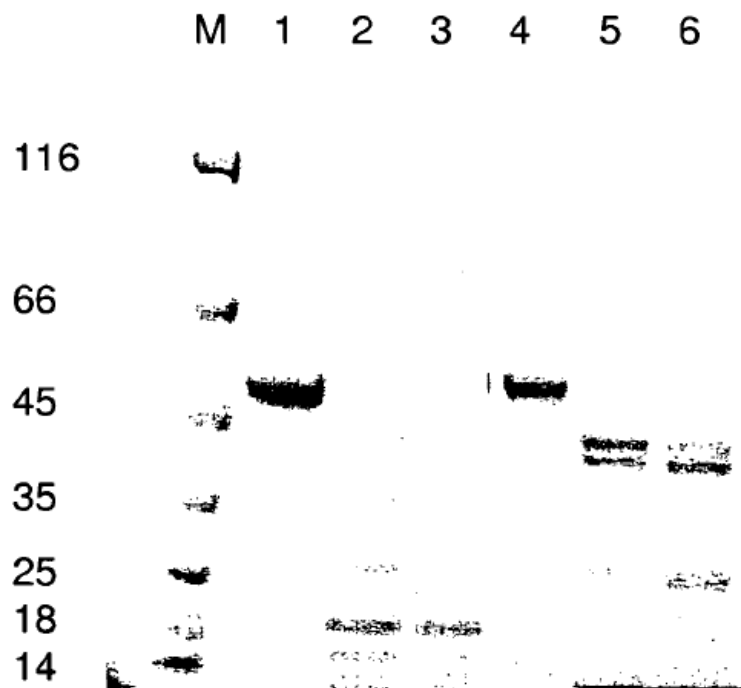


Fig. 4

CD119 630	MKIGVNCGHKTKGAGSGAIGKINESIETRNVGYKVIDKLLKLNNDVCTIDKASTQSEC 60 MKIGVNCGHKTKGAGSGAIGKINESIETRNVGYKVIDKLLKLNNDVCTIDKASTQSEC 60 *****
	<u>Trombina</u>
CD119 630	LSKIATQANRQDLDFWISIHFNAGKGRGCEVYTYKQYQDAIDVCKKISDLGFTNRGVK 120 LSKIATQANRQDLDFWISIHFNAGKGRGCEVYTYKQYQDAIDVCKKISDLGFTNRGVK 120 *****
CD119 630	DGSGLYVVKTKAKSMLIEVCFVDSEDANKYLSLGADKLATAIVEAITKHISAEENNYN 180 DGSGLYVVKTKAKSMLIEVCFVDSEDANKYLSLGADKLATAIVEAITKHISAEENNYN 180 *****
	<u>Caspasa 1</u>
CD119 630	RYKHTIVYSGDDKVSADILGLYKRKKESYLVTDIKDYKPHRTQNLVYIGGVTCNKMKEM 240 RYKHTIVYSGDDKVSADILGLYKRKKESYLVTDIKDYKPHRTQNLVYIGGVTCNKMKEM 240 *****
CD119 630	SKTIGEKFTQLYGNVWSTMDKAIIEFVKEKL 271 SKTIGEKFTQLYGNVWSTMDKAIIEFVKEKL 271 *****

Fig. 5

15	QNWLGCGWTDGIEQPGVGKLLQDDNMLMISLCGLSVRILK-VRQRHDQFNLLHKKHPKKE 170
16	QNWLGCGWTDGIEQPGVGKLLQDDNMLMISLCGLSVRILK-VRQRHDQFNLLHKKHPKKE 170
3	QNWLGCGWTDRIEQPGWGWEKVTRRQHAYDFPMWFIKPNFK-SETAPRSIQSPTQASKKE 170
4	QNWLGCGWTDRIEQPGWGWEKVTRRQHAYDFPMWFIKPNFK-SETAPRSIQSPTQASKKE 170
5	QNWLGCGWTDRIEQPGWGWEKVTRRQHAYDFPMWFIKPNFK-SETAPRSIQSPTQASKKE 170
F26A	QNWLGCGWTDRIEQPGWGWEKVTRRQHAYDFPMWFIKPNFK-SETAPRSIQSPTQASKKE 179
9	QNWLGCGWTDGIEQPGWGWEKVTRRQHAYDFPMWFIKPNFK-SETAPRSVQSPTQAPKKE 170
10	QNWLGCGWTDGIEQPGWGWEKVTRRQHAYDFPMWFIKPNFK-SEIAPRSVQSPTQAPKKE 170
11	QNWLGCGWTDGIEQPGWGWEKVTRRQHAYDFPMWFIKPNFK-SEIAPRSVQSPTQAPKKE 170
12	QNWLGCGWTDGIEQPGWGWEKVTRRQHAYDFPMWFIKPNFK-SETAPRSVQSPTQAPKKE 170
13	QNWLGCGWTDGIEQPGWGWEKVTRRQHAYDFPMWFIKPNFK-SEIAPRSVQSPTQAPKKE 170
14	QNWLGCGWTDGIEQPGWGWEKVTRRQHAYDFPMWFIKPNFK-SEIAPRSVQSPTQAPKKE 170
2	QNWLGCGWTDGIEQPGWGWEKVTRRQHAYDFPMWFIKPNFK-SETAPRSVQSPTQAPKKE 179
8	QNWLGCGWTDGIEQPGWGWEKVTRRQHAYDFPMWFIKPNFK-SETAPRSVQSPTQAPKKE 170
7	QNWLGCGWTDGIEQPGWGWEKVTRRQHAYDFPMWFIKPNFK-SETAPRSVQSPTQAPKKE 170
1	QNWLGCGWTDGIEQPGWGWEKVTRRQHAYDFPMWFIKPNFK-SETAPRSVQSPTQAPKKE 170
6	QNWLGCGWTDGVQQPGSGWEKVTRRQHAYDFPMWFIKPNFK-SETAPRSVQSPTQASKKE 170
17	QNWLGCGWTDGIEQPGWGWEKVTRRQHAYDFPMWFIKPNFK-TATATRSVQSPTQASKKE 170
18	QNWLGCGWTDGIEQPGWGWEKVTRRQHAYDFPMWFIKPNFKQIDVTVKSSQSAIVGDGKKS 171 *****: * . :*

(A) CHAP-Ami_Pitti26-CBD_USA

MSIIMEVATM	QAKLTKKEFI	EWLKTSEGKQ	FNVDLWYGFQ	CFDYANAGWK	VLFGLLLKGL	60
GAKDIPFANN	FDGLATVYQN	TPDFLAQPGD	MVVFGSNYGA	GYGHVAVVIE	ATLDYIIVYE	120
QNLWGGGWTD	RIEQPGWGE	KVTRRQHAYD	FPMWFIRPNF	KSETAPRSIQ	SPTQASKKET	180
AKPQPKAVEL	KIIKDVVVKY	DLPKRGGNPK	GIVIHNDAGS	KGATAEAYRN	GLVNAPSSRL	240
EAGIAHSYVS	GNTVWQALDE	SQVGWHTANQ	LGNKYYYGIE	VCQSMGADNA	TFLKNEQATF	300
QECARLLKKW	GLPANRNTIR	LHNEFTSTSC	PHRSSVLHTG	FDPVTRGLLP	EDKRLQLKDY	360
FIKQIRAYMD	GKIPVATVSN	ESSASSNTVK	PVAELMPPVP	AGYTLDKNNV	PYKKEQGNYS	420
VANVKGNNVR	DGYSTNSRIT	GVLPNNTTIT	YDGAYCINGY	RWITYIANS	QRRYIATGEV	480
DIAGNRISSE	GKFSAV					

(B) CHAP-Ami_Pitti26-CBD_USA Mutante 4, Tabla 3

MSIIMEVATM	QAKLTKKEFI	EWLKTSEGKQ	FNVDLWYGFQ	CFDYANAGWK	VLFGLLLKGL	60
GAKDIPFANN	FDGLATVYQN	TPDFLAQPGD	MVVFGSNYGA	GYGHVAVVIE	ATLDYIIVYE	120
QNLWGGGWTD	RIEQPGWGE	KVTRRQHAYD	FPMWFIRPNF	KSATAPASIQ	SPTQASKKET	180
AKPQPKAVEL	KIIKDVVVKY	DLPKRGGNPK	GIVIHNDAGS	KGATAEAYRN	GLVNAPSSRL	240
EAGIAHSYVS	GNTVWQALDE	SQVGWHTANQ	LGNKYYYGIE	VCQSMGADNA	TFLKNEQATF	300
QECARLLKKW	GLPANRNTIR	LHNEFTSTSC	PHRSSVLHTG	FDPVTRGLLP	EDKRLQLKDY	360
FIKQIRAYMD	GKIPVATVSN	ESSASSNTVK	PVAELMPPVP	AGYTLDKNNV	PYKKEQGNYS	420
VANVKGNNVR	DGYSTNSRIT	GVLPNNTTIT	YDGAYCINGY	RWITYIANS	QRRYIATGEV	480
DIAGNRISSE	GKFSAV					

(C) CHAP-Ami_Pitti26-CBD_USA Mutante 10, Tabla 3

MSIIMEVATM	QAKLTKKEFI	EWLKTSEGKQ	FNVDLWYGFQ	CFDYANAGWK	VLFGLLLKGL	60
GAKDIPFANN	FDGLATVYQN	TPDFLAQPGD	MVVFGSNYGA	GYGHVAVVIE	ATLDYIIVYE	120
QNLWGGGWTD	RIEQPGWGE	KVTRRQHAYD	FPMWFIRPNF	KSQATAPASIQ	SPTQASKKAT	180
AKPQPKAVEL	KIIKDVVVKY	DLPKRGGNPK	GIVIHNDAGS	KGATAEAYRN	GLVNAPSSRL	240
EAGIAHSYVS	GNTVWQALDE	SQVGWHTANQ	LGNKYYYGIE	VCQSMGADNA	TFLKNEQATF	300
QECARLLKKW	GLPANRNTIR	LHNEFTSTSC	PHRSSVLHTG	FDPVTRGLLP	EDKRLQLKDY	360
FIKQIRAYMD	GKIPVATVSN	ESSASSNTVK	PVAELMPPVP	AGYTLDKNNV	PYKKEQGNYS	420
VANVKGNNVR	DGYSTNSRIT	GVLPNNTTIT	YDGAYCINGY	RWITYIANS	QRRYIATGEV	480
DIAGNRISSE	GKFSAV					

(D) CHAP-Ami_Pitti26-CBD_USA Mutante 13, Tabla 3

MSIIMEVATM	QAKLTKKEFI	EWLKTSEGKQ	FNVDLWYGFQ	CFDYANAGWK	VLFGLLLKGL	60
GAKDIPFANN	FDGLATVYQN	TPDFLAQPGD	MVVFGSNYGA	GYGHVAVVIE	ATLDYIIVYE	120
QNLWGGGWTD	RIEQPGWGE	KVTRRQHAYD	FPMWFIRPNF	KSETAPASIQ	SPTQASKKET	180
AKPQPKAVEL	KIIKDVVVKY	DLPKRGGNPK	GIVIHNDAGS	KGATAEAYRN	GLVNAPSSRL	240
EAGIAHSYVS	GNTVWQALDE	SQVGWHTANQ	LGNKYYYGIE	VCQSMGADNA	TFLKNEQATF	300
QECARLLKKW	GLPANRNTIR	LHNEFTSTSC	PHRSSVLHTG	FDPVTRGLLP	EDKRLQLKDY	360
FIKQIRAYMD	GKIPVATVSN	ESSASSNTVK	PVAELMPPVP	AGYTLDKNNV	PYKKEQGNYS	420
VANVKGNNVR	DGYSTNSRIT	GVLPNNTTIT	YDGAYCINGY	RWITYIANS	QRRYIATGEV	480
DIAGNRISSE	GKFSAV					

(E) CHAP-Ami_Pitti26-CBD_USA Mutante 2, Tabla 3

MSIIMEVATM	QAKLTKKEFI	EWLKTSEGKQ	FNVDLWYGFQ	CFDYANAGWK	VLFGLLLKGL	60
GAKDIPFANN	FDGLATVYQN	TPDFLAQPGD	MVVFGSNYGA	GYGHVAVVIE	ATLDYIIVYE	120
QNLWGGGWTD	RIEQPGWGE	KVTRRQHAYD	FPMWFIRPNF	KSQATAPASIQ	SPTQASKKET	180
AKPQPKAVEL	KIIKDVVVKY	DLPKRGGNPK	GIVIHNDAGS	KGATAEAYRN	GLVNAPSSRL	240
EAGIAHSYVS	GNTVWQALDE	SQVGWHTANQ	LGNKYYYGIE	VCQSMGADNA	TFLKNEQATF	300
QECARLLKKW	GLPANRNTIR	LHNEFTSTSC	PHRSSVLHTG	FDPVTRGLLP	EDKRLQLKDY	360
FIKQIRAYMD	GKIPVATVSN	ESSASSNTVK	PVAELMPPVP	AGYTLDKNNV	PYKKEQGNYS	420
VANVKGNNVR	DGYSTNSRIT	GVLPNNTTIT	YDGAYCINGY	RWITYIANS	QRRYIATGEV	480
DIAGNRISSE	GKFSAV					

Fig. 6/2

(F) CHAP-Ami_Pitti26-CBD_USA-Add2

MASIIMEVAT	MQAKLTKKEF	IEWLKTSE GK	QFNVDLWYGF	QCFDYANAGW	KVLFGLLLKG	60
LGAKDIPFAN	NFDGLATVYQ	NTPDFLAQPG	DMVVFGSNYG	AGYGHVAWVI	EATLDYIIVY	120
EQNWLGGGWT	DRIEQPGWGW	EKVTRRQHAY	DFPMWFIRPN	FKSETAPRSI	QSPTQASKKE	180
TAKPQPKAVE	LKI IKDVVKG	YDLPKRGGNP	KGIVIHNDAG	SKGATAEAYR	NGLVNAPSSR	240
LEAGIAHSYV	SGNTVWQALD	ESQVGWHTAN	QLGNKYYYGI	EVCQSMGADN	ATFLKNEQAT	300
FQECARLLKK	WGLPANRNTI	RLHNEFTSTS	CPHRSSVLHT	GFDPVTRGLL	PEDKRLQLKD	360
YFIKQIRAYM	DGKIPVATVS	NESSASSNTV	KPVAELMPPV	PAGYTLDKNN	VPYKKEQGNV	420
TVANVKGNNV	RDGYSTNSRI	TGVLPNNTTI	TYDGAYCING	YRWITYIANS	GQRRYIATGE	480
VDIAGNRIS	FGKFSAV					497

(G) CHAP-Ami_Pitti26-CBD_USA-Add2 como Mutante 4, Tabla 3

MASIIMEVAT	MQAKLTKKEF	IEWLKTSE GK	QFNVDLWYGF	QCFDYANAGW	KVLFGLLLKG	60
LGAKDIPFAN	NFDGLATVYQ	NTPDFLAQPG	DMVVFGSNYG	AGYGHVAWVI	EATLDYIIVY	120
EQNWLGGGWT	DRIEQPGWGW	EKVTRRQHAY	DFPMWFIRPN	FKSATAPASI	QSPTQASKKE	180
TAKPQPKAVE	LKI IKDVVKG	YDLPKRGGNP	KGIVIHNDAG	SKGATAEAYR	NGLVNAPSSR	240
LEAGIAHSYV	SGNTVWQALD	ESQVGWHTAN	QLGNKYYYGI	EVCQSMGADN	ATFLKNEQAT	300
FQECARLLKK	WGLPANRNTI	RLHNEFTSTS	CPHRSSVLHT	GFDPVTRGLL	PEDKRLQLKD	360
YFIKQIRAYM	DGKIPVATVS	NESSASSNTV	KPVAELMPPV	PAGYTLDKNN	VPYKKEQGNV	420
TVANVKGNNV	RDGYSTNSRI	TGVLPNNTTI	TYDGAYCING	YRWITYIANS	GQRRYIATGE	480
VDIAGNRIS	FGKFSAV					497

(H) CHAP-Ami_Pitti26-CBD_USA-Add2 como Mutante 10, Tabla 3

MASIIMEVAT	MQAKLTKKEF	IEWLKTSE GK	QFNVDLWYGF	QCFDYANAGW	KVLFGLLLKG	60
LGAKDIPFAN	NFDGLATVYQ	NTPDFLAQPG	DMVVFGSNYG	AGYGHVAWVI	EATLDYIIVY	120
EQNWLGGGWT	DRIEQPGWGW	EKVTRRQHAY	DFPMWFIRPN	FKSQTAPASI	QSPTQASKKA	180
TAKPQPKAVE	LKI IKDVVKG	YDLPKRGGNP	KGIVIHNDAG	SKGATAEAYR	NGLVNAPSSR	240
LEAGIAHSYV	SGNTVWQALD	ESQVGWHTAN	QLGNKYYYGI	EVCQSMGADN	ATFLKNEQAT	300
FQECARLLKK	WGLPANRNTI	RLHNEFTSTS	CPHRSSVLHT	GFDPVTRGLL	PEDKRLQLKD	360
YFIKQIRAYM	DGKIPVATVS	NESSASSNTV	KPVAELMPPV	PAGYTLDKNN	VPYKKEQGNV	420
TVANVKGNNV	RDGYSTNSRI	TGVLPNNTTI	TYDGAYCING	YRWITYIANS	GQRRYIATGE	480
VDIAGNRIS	FGKFSAV					497

(I) CHAP-Ami_Pitti26-CBD_USA-Add2 como Mutante 13, Tabla 3

MASIIMEVAT	MQAKLTKKEF	IEWLKTSE GK	QFNVDLWYGF	QCFDYANAGW	KVLFGLLLKG	60
LGAKDIPFAN	NFDGLATVYQ	NTPDFLAQPG	DMVVFGSNYG	AGYGHVAWVI	EATLDYIIVY	120
EQNWLGGGWT	DRIEQPGWGW	EKVTRRQHAY	DFPMWFIRPN	FKSETAPASI	QSPTQASKKE	180
TAKPQPKAVE	LKI IKDVVKG	YDLPKRGGNP	KGIVIHNDAG	SKGATAEAYR	NGLVNAPSSR	240
LEAGIAHSYV	SGNTVWQALD	ESQVGWHTAN	QLGNKYYYGI	EVCQSMGADN	ATFLKNEQAT	300
FQECARLLKK	WGLPANRNTI	RLHNEFTSTS	CPHRSSVLHT	GFDPVTRGLL	PEDKRLQLKD	360
YFIKQIRAYM	DGKIPVATVS	NESSASSNTV	KPVAELMPPV	PAGYTLDKNN	VPYKKEQGNV	420
TVANVKGNNV	RDGYSTNSRI	TGVLPNNTTI	TYDGAYCING	YRWITYIANS	GQRRYIATGE	480
VDIAGNRIS	FGKFSAV					497

(K) CHAP-Ami_Pitti26-CBD_USA-Add2 como Mutante 2, Tabla 3

MASIIMEVAT	MQAKLTKKEF	IEWLKTSE GK	QFNVDLWYGF	QCFDYANAGW	KVLFGLLLKG	60
LGAKDIPFAN	NFDGLATVYQ	NTPDFLAQPG	DMVVFGSNYG	AGYGHVAWVI	EATLDYIIVY	120
EQNWLGGGWT	DRIEQPGWGW	EKVTRRQHAY	DFPMWFIRPN	FKSQTAPASI	QSPTQASKKE	180
TAKPQPKAVE	LKI IKDVVKG	YDLPKRGGNP	KGIVIHNDAG	SKGATAEAYR	NGLVNAPSSR	240
LEAGIAHSYV	SGNTVWQALD	ESQVGWHTAN	QLGNKYYYGI	EVCQSMGADN	ATFLKNEQAT	300
FQECARLLKK	WGLPANRNTI	RLHNEFTSTS	CPHRSSVLHT	GFDPVTRGLL	PEDKRLQLKD	360
YFIKQIRAYM	DGKIPVATVS	NESSASSNTV	KPVAELMPPV	PAGYTLDKNN	VPYKKEQGNV	420
TVANVKGNNV	RDGYSTNSRI	TGVLPNNTTI	TYDGAYCING	YRWITYIANS	GQRRYIATGE	480
VDIAGNRIS	FGKFSAV					497

Fig. 7

(A)

```

1 mkigincght ktgagsgaig kinesietrn vgykvidklk klgnnvvdct idkastqsec
61 lskitaqanr qdldwfish fnagggkqce vytykgkqyq daidvckkis dlghtnrgvk
121 dgsglyvvkk tkaksmliev cfvdtedank ylslgadkla taiveaitkh issaeennyn
181 rykhtivysg ddkvsadilg lyykrkkesy lvteikdykp hrtqnlyvig gvtcnkmkem
241 skttgekftq lygndvwstm dkaiefvkek 1

```

(B)

```

1 mkigvncght ktgagsgaig kinesietrn vgykvidklk tlgnnvvdct idkastqsec
61 lskiatqanr qdldwfish fnagggkqce vytykgkqyq daidvckkis dlghtnrgvk
121 dgsglyvvkk tkaksmliev cfvdsedank ylslgadkla taiveaitkh issaeennyn
181 rykhtivysg ddkvsadilg lyykrkkesy lvteikdykp hrtqnlyvig gvtcnkmkem
241 skttgekftq lygndvwstm dkaiefvkek 1

```

Fig. 8

MVKYTV**EN**KI IAGLPKGKLK GANFVIAHET ANSKSTID**NE** VSYMTRNWKN AFVTHFVGGG
 GRVVQVANVN YVSWGAGQYA NSYSYAQ**VEL** CRTSNATTFK KDYEVCYQLL VDLAKKAGIP
 ITLDSGSKTS DKGIKSHKWV ADKLGGTTHQ DPYAYLSSWG ISKAQFASDL AKVSGGGNTG
 TAPAKPSTPA PKPSTPSTNL DKLGLVDYMN AKKMDSSYSN RDKLAKQYGI ANYSGTASQN
 TLLSKIKGG APKPSTPAPK PSTSTAKKIY FPPNKGNSV YPTNKAPVKA NAIGAINPTK
 FGGLTYTIQK DRGNGVYEIQ TDQFGRVQVY GAPSTGAVIK K

Fig. 9

MVKYTVENKI IAGLPKGK^uLK GANFVIAHET ANSKSTIDNE VSYMTR^uNWKN AFVTHFVGGG
 GR^uVVQVANVN YVSWGAGQYA NSYSYAQVEL C^uRTSNATTFK KDYE^uVYCQLL VDLAKKAGIP
 ITLDSGSKTS DKGIKSHK^uWV ADKLG^uGTTHQ DP^uYAYLSSWG ISKAQFASDL AKVSGGGNTG
 TAPAKPSTPA PKPSTPSTNL DKLGLVDYMN AKKMDSSYSN **R**DKLAKQYGI ANYSGTASQN
 TTLLSKIKGG APKPSTPAPK PSTSTAKKIY FPPNKG^uNWSV YPTNKAPVKA NAIGAINPTK
 FGGLTYTIQK DR^uGNGVYEIQ TDQFGR^uVQVY GAPSTGAVIK K

Fig. 10

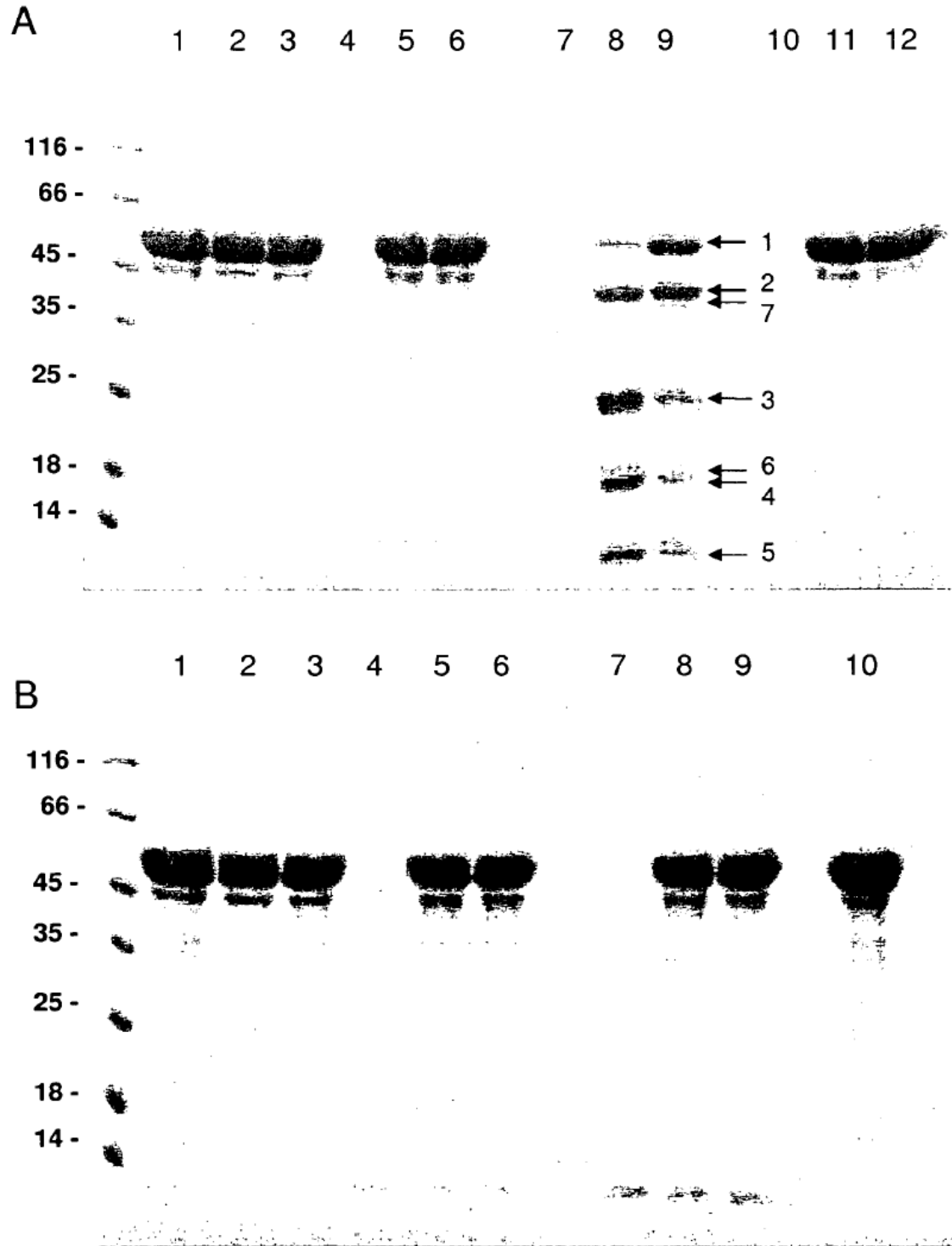


Fig. 11

10 20 30 40 50 60
 MASIIMEVAT MQAKLTKKEF IEWLKTSE GK QFNVDLWYGF QCFDYANAGW KVLFGHTLKG

70 80 90 100 110 120
 LGAKDIPFAN NFDGLATVYQ NTPDFLAQPG DMVVFGSNYG AGYGHVAWVI EATLDYIIIVY

130 140 150 160 170 180
 EQNWLGGGW I DRIEQPGWGW EKVTRRQHAY DFPWFIRPN FKSATAPASI QSPTQASKKE

190 200 210 220 230 240
TAKPQPKAVE LKIIKDVVKG HDLPKRGGNP KGIVIHNDAG SKGATAEAYR NGLVNAPSSR

250 260 270 280 290 300
 LEAGIAHSYV SGNTVWQALD ESQVGWHTAN QLGNKYYYGI EVCQSMGADN ATFLKNEQAT

310 320 330 340 350 360
 FQECARLLKK WGLPANRNTI RLHNEFTSTS CPHRSSVLHT GFDPVTRGLL PEDKRLQLKD

370 380 390 400 410 420
 YFIKQIRAYM DGKIPVATVS NESSASSNTV KPVAELMPPV PAGYTLDKNN VPYKKEQGNV

430 440 450 460 470 480
 TVANVKGNNV RDGYSTNSRI TGVLPNNTTI TYDGAYCING YRWITYIANS GQRRYIATGE

490
 VDIAGNRIS FGKFSAV

Fig. 12

		1		60
Fago	SAP-2	MKSQQQAKDWIYKHEGVGVDFDGAYGFQCMDLAVAYIY	<u>YITDG</u>	KVVMWGNAKDAINNDFK
Fago	44AHJD	MKSQQQAKEWIYKHEGAGVDFDGAYGFQCMDLSVAYVY	<u>YITDG</u>	KVVMWGNAKDAINNDFK
Fago	66	MKSQQQAKEWIYNHEGAGVDFDGAYGFQCMDLAVAYVY	<u>YITDG</u>	KVVMWGNAKDAINNDFK
		- - -	- -	