

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 321**

51 Int. Cl.:

C12N 9/86 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2007 E 07765926 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 2038411**

54 Título: **Beta-lactamasa modificada y método para su preparación**

30 Prioridad:

21.06.2006 FI 20065431

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

31.03.2014

73 Titular/es:

SYNTHETIC BIOLOGICS, INC. (100.0%)
617 Detroit Street
Ann Arbor, MI 48104 , US

72 Inventor/es:

KÄÄRIÄINEN, SUSANNA;
WICKSTRAND, NINA y
KOSKI, PERTTI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 452 321 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

Beta-lactamasa modificada y método para su preparación

Campo de la invención

5 Se usan varios antibióticos en el tratamiento de infecciones bacterianas. Sin embargo, los antibióticos no solo atacan a patógenos, sino que también afectan a la flora bacteriana normal, llevando a efectos secundarios adversos, por ejemplo, en el intestino del paciente. Estos efectos secundarios pueden reducirse administrando enzimas capaces de degradar el antibiótico residual en el intestino. La presente invención se refiere a metalo-beta-lactamasas modificadas que son útiles en el tratamiento y prevención de efectos adversos de los antibióticos que tienen un anillo beta-lactama, o en la preparación de dichas enzimas. La invención se dirige también a un método para preparar las beta-lactamasas modificadas además de a moléculas de nucleótido, vectores y células huésped útiles en ella.

Fundamento de la invención

15 Las enzimas de beta-lactamasa representan un mecanismo principal de resistencia entre bacterias a antibióticos de beta-lactama, que incluyen penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas. Estas enzimas catalizan la hidrólisis irreversible del enlace amida del anillo beta-lactama para crear agentes antimicrobianos inefectivos. En base a la clasificación de estructura molecular y mecanismos catalíticos, las beta-lactamasas pueden dividirse en cuatro clases: A, B, C, y D. Las clases A, C y D son enzimas de serina y comprenden la mayoría de las beta-lactamasas (Ambler, 1980). Estas enzimas generalmente inactivan penicilinas o cefalosporinas y a menudo muestran una preferencia por uno de estos dos antibióticos.

20 La clase B de beta-lactamasas son metalo-enzimas que necesitan uno o dos iones de zinc como un cofactor para la actividad enzimática. Las metalo-beta-lactamasas constituyen el grupo 3 en la clasificación funcional de Bush-Jacoby-Madeiros (Bush, 1998). Este esquema se basa principalmente en perfiles de sustrato, su sensibilidad a EDTA y su resistencia a inhibidores de serina beta-lactamasas. En base a similitudes estructurales en la región que coordina la unión de zinc, las metalo-beta-lactamasas pueden dividirse en tres subgrupos, B1, B2 y B3 (Galleni et al., 2001). El subgrupo B1 posee tres histidinas y una cisteína como los residuos clave de coordinación al zinc. Las estructuras cristalográficas se han descrito para muchas enzimas del subgrupo B1 como BclI de *Bacillus cereus* (Carfi et al, 1995 y 1998a), CcrA de *Bacteroides fragilis* y (Carfi et al., 1998b) e IMP-1 de *Pseudomonas aeruginosa* (Concha et al., 2000). En la misma medida, las lactamasas del subgrupo B2 tienen un residuo de arginina, en vez de histidina, en la primera posición del motivo principal de unión al zinc, NXHXD. Recientemente, la primera estructura cristalina de una enzima del subgrupo B2 (CphA) se ha resuelto por Garau et al. (2005). El subgrupo B3 contiene enzimas con estructura multimérica (Walsh et al., 2005).

25 Las metalo-beta-lactamasas muestran un perfil de sustrato de amplio espectro que incluyen penicilinas y cefalosporinas, y son resistentes a la acción de inhibidores de serina beta-lactamasas convencionales comunes tales como ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Además, a diferencia de la mayoría de las serina betalactamasas, las metalo-beta-lactamasas tienen la capacidad de hidrolizar carbapenemas tales como meropenem e imipenem. Varios números de bacterias se conocen por producir metalo-beta-lactamasas. Se expresan normalmente entre el género *Enterobacteriaceae* (que incluye *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Shigella flexner*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenobacterium maltophilum*, género *Acinetobacter*, *Bacteroides fragilis*, *Bacillus cereus*, *Flavobacterium odoratum* y *Bacteroides fragilis* (Walsh et al., 2005).

35 Las beta-lactamasas pueden utilizarse como proteínas farmacéuticas para inactivar las beta-lactamasas no absorbidas en el tracto gastrointestinal para evitar los efectos adversos inducidos por beta-lactamasas que incluyen alteraciones en la microbiota normal intestinal y el sobrecrecimiento de bacterias resistentes a la beta-lactama (documentos WO93/13795, WO2004/016248). Para una terapia eficiente de beta-lactamasa en el tracto del intestino delgado la enzima debería ser resistente a la acción de proteasas intestinales en presencia de ácidos biliares y conservar alta actividad enzimática en un amplio intervalo de pH (5,5-7,5).

45 La viabilidad de la terapia enzimática dirigida en modelos caninos y de ratón se demostró empleando una serina betalactamasa de *Bacillus licheniformis* durante la medicación de ampicilina parenteral (Harmoinen et al., 2004, Mentula et al., 2004, Stiefel et al., 2003). Sin embargo, el perfil de sustrato de esta enzima limita esencialmente su uso como una sustancia farmacológica ya que tiene pobre capacidad para hidrolizar cefalosporinas, carbapenemas o penicilinas en presencia de inhibidores de beta-lactamasa. Por consiguiente, una nueva enzima betalactamasa resistente a proteasa con amplio espectro de beta-lactama es indispensable para extender el uso de la terapia de beta-lactamasa entre los pacientes hospitalizados bajo medicación intravenosa con varias beta-lactamasas.

55 Las metalo-beta-lactamasas se conocen por inactivar varios tipos de beta-lactamasas y son resistentes a inhibidores de serina beta-lactamasas. Las cepas de *Bacillus cereus* se conocen por producir metalo-beta-lactamasa que pertenece al grupo B1. Una muestra de metalo-beta-lactamasa producida de forma recombinante semi purificada de un aislado clínico de *Bacillus cereus* 98ME1552 se mostró para eliminar el sobrecrecimiento de bacterias patógenas potenciales en un modelo de ratón (Stiefel et al., 2005). Sin embargo, se ha encontrado que este preparado de metalo-beta-lactamasa contenía una mezcla de variantes de beta-lactamasa, que disminuye su valor como una proteína farmacéutica, ya que variaciones de una sustancia farmacológica reduce la solidez del

procedimiento de producción, aumenta las variaciones carga a carga, y hace difícil los ensayos clínicos, lo que por supuesto tiene un impacto negativo en su registro como un medicamento.

5 Se ha encontrado previamente heterogeneidad también entre betalactamasas de *Pseudomonas aeruginosa* (Walther-Rasmussen et al., 1999), mientras no se encontró heterogeneidad del extremo N-terminal en la expresión de metalo-beta-lactamasa de *Aeromonas veronii* bv. *sobria* en *E. coli* (Crawford et al., 2004). El papel de una extensión amino terminal en una metalo-beta-lactamasa de *Stenotrophomonas maltophilia* se describe en Simm et al., 2002. Las beta-lactamasas en estas referencias difieren de las de la presente invención.

10 La presente invención proporciona actualmente medios para reducir la heterogeneidad amino terminal que se encontró que estaba asociada con la producción recombinante de una metalo-beta-lactamasa. La invención proporciona además metalo-beta-lactamasas modificadas que pueden producirse en forma esencialmente pura y que pueden usarse en la fabricación de composiciones farmacéuticas.

Compendio de la invención

La invención proporciona una proteína metalo-beta-lactamasa modificada que tiene la fórmula general:



15 en donde

K es lisina

T es treonina

E es ácido glutámico, y

20 Δ BL es una proteína metalo-beta-lactamasa que se ha truncado en el extremo amino terminal de manera que deja cuatro cadenas beta antes de la primera hélice alfa de la estructura secundaria predicha de dicha proteína, y la secuencia E - Δ BL tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácido secuenciales 6-221 de SEQ ID NO:3.

25 La invención proporciona además una molécula de nucleótidos aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína metalo-beta-lactamasa modificada, además de un vector de expresión que contiene la molécula de nucleótidos, y una célula huésped capaz de expresar la proteína metalo-beta-lactamasa codificada por la molécula de nucleótidos.

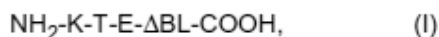
La invención proporciona además una proteína metalo-beta-lactamasa modificada que tiene la fórmula general



en donde

30 E y ABL son como se definen anteriormente.

La invención proporciona aún más un método para preparar una proteína metalo-beta-lactamasa modificada, comprendiendo dicho método cultivar dicha célula huésped bajo condiciones que permiten la expresión de una metalo-beta-lactamasa que tiene la fórmula general:



35 en donde

K es lisina

T es treonina

E es ácido glutámico, y

40 Δ BL es una proteína metalo-beta-lactamasa que se ha truncado en el extremo amino terminal de manera que deja cuatro cadenas beta antes de la primera hélice alfa de la estructura secundaria predicha de dicha proteína, y la secuencia E - Δ BL tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácido secuenciales 6-221 de SEQ ID NO:3.

y realizar la modificación postraducciona que da por resultado una metalo-beta-lactamasa modificada que tiene la fórmula general:



en donde E y Δ BL son como se definen anteriormente, y

opcionalmente aislar y purificar la proteína modificada de forma postraduccional obtenida.

5 Como aspectos adicionales la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína metalo-beta-lactamasa modificada de fórmula II, la metalo-beta-lactamasa modificada de fórmula II para usar como un medicamento, y el uso de la metalo-beta-lactamasa modificada de fórmula II para la fabricación de un medicamento para la supresión de efectos adversos inducidos por antibiótico de beta-lactama en el tracto intestinal.

10 Finalmente, se describe un método para tratar efectos adversos inducidos por antibiótico de beta-lactama en el tracto intestinal que comprende administrar una cantidad efectiva de la metalo-beta-lactamasa modificada de fórmula II, o la composición farmacéutica que la contiene, a una persona que la necesita. Realizaciones específicas de la invención se describen en las reivindicaciones dependientes.

Otros objetos, detalles y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de los siguientes dibujos, descripción detallada y ejemplos.

Breve descripción de los dibujos

15 La Figura 1 muestra la secuencia completa de nucleótidos y la secuencia deducida de aminoácidos del gen beta-lactamasa de *B. cereus* 98ME1552.

20 La Figura 2 muestra la secuencia completa de nucleótidos y la secuencia deducida de aminoácidos del gen beta-lactamasa de *B. cereus* 98ME1552 derivado de la construcción de expresión pRSH315. El sitio de escisión de la secuencia de señalización de 31 residuos de aminoácido de larga de *Bacillus amyloliquefaciens* se predice que se da entre la alanina en la posición -1 y la glutamina en la posición +1. La extensión NH_2 terminal de un NH_2 -QAS-tripéptido que se deriva del sitio de clonación *Hind* III se expresa en negrita.

25 La Figura 3 muestra la secuencia completa de nucleótidos y la secuencia deducida de aminoácidos del gen beta-lactamasa de *B. cereus* 98ME1552 derivado de la construcción de expresión pRSH318. La escisión de una secuencia de señalización de 31 residuos de aminoácido de larga de *Bacillus amyloliquefaciens* se predice que se da entre la alanina en la posición -1 y la glutamina en la posición +1. La extensión NH_2 terminal del NH_2 -QAS-tripéptido derivada del sitio de clonación *Hind* III y la inserción KT se muestran en negrita.

Descripción detallada de la invención

30 Un preparado de metalo-beta-lactamasa se produjo primero en un sistema de producción de *Bacillus subtilis* que contenía una construcción de expresión del gen metalo-beta-lactamasa completo que codifica la metalo-beta-enzima completa. El análisis detallado de espectrometría de masas reveló que el preparado de metalo-enzima incluía varios números de variantes de enzima con secuencias amino terminal heterogéneas. Las variaciones en las secuencias terminales amino se creyó que eran un resultado de modificación postraduccional de proteasas de la célula huésped. Las alteraciones observadas en la secuencia de aminoácidos de la metalo-enzima aumenta carga a carga las variaciones de enzima que se han producido en un sistema de producción de *Bacillus subtilis* y así en perspectiva reguladora reducen su uso como una proteína farmacéutica. Por lo tanto se estudiaron medios biológicos moleculares para reducir las variaciones observadas en la secuencia amino terminal de la enzima metalo-beta-lactamasa.

35 Se espera que la región amino terminal no tenga influencia esencial en las propiedades catalíticas de la enzima. Además se encontró que la región amino terminal estaba expuesta a modificaciones postraduccionales de proteasas en el sistema de producción de *Bacillus subtilis* en que la proteína recombinante se secreta fuera de la célula bacteriana. Para reducir esta microheterogeneidad en la región amino terminal, la secuencia de nucleótidos que codifica esta región predicha se eliminó por un método PCR. Sin embargo, la mera supresión por sí misma no llevó a una reducción significativa de la heterogeneidad amino terminal. Sorprendentemente, sin embargo, la supresión combinada con la inserción de un dipéptido, que se diseñó para asistir a la modificación postraduccional, llevó a una
45 única variante metalo-beta-lactamasa producida con un amino terminal modificado igualmente.

50 Esta invención se refiere en general a una beta-lactamasa modificada útil como una proteína farmacéutica, y además a un intermedio de beta-lactamasa recombinante que se produce por truncado e inserción de un dipéptido en su amino terminal dando por resultado números reducidos de variantes de beta-lactamasa. Estas modificaciones facilitan la producción recombinante de la enzima en forma homóloga para usar como una sustancia farmacológica en terapia de beta-lactamasa para la supresión de efectos secundarios inducidos por beta-lactamas (cefalosporinas, carbapenemas y penicilinas en presencia o ausencia de inhibidores conocidos de beta-lactamasa tales como ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam). En particular la invención se refiere a modificación postraduccional dirigida de metalo-beta-lactamasa activa por truncado e inserción de un dipéptido en la región amino terminal para reducir la heterogeneidad amino terminal en un sistema de producción de *Bacillus subtilis*.

"Metallo-beta-lactamasas" como se usa en este documento se refiere a betalactamasas de clase B, es decir, beta-lactamasas que necesitan al menos un ión metálico bivalente (Zn^{2+}) para la actividad; y constituyen el grupo 3 en la clasificación funcional de Bush-Jacoby-Madeiras (Bush, 1998). En base a las similitudes estructurales en la región que coordina la unión a zinc, las metalo-beta-lactamasas pueden dividirse en tres subgrupos, B1, B2 y B3 (Galleni et al., 2001). Preferiblemente la metalo-beta-lactamasa de la invención pertenece al subgrupo B1. Este subgrupo posee los residuos clave de coordinación al zinc de tres histidinas y una cisteína. Más detalles sobre los subgrupos se describen en la parte de antecedentes de esta memoria.

Las metalo-beta-lactamasas son miembros de una superfamilia, grande, diversa, de proteínas que comparten una estructura $\alpha\beta/\beta\alpha$ de cuatro capas similar. La cadena de polipéptido se divide en dos dominios, que comprenden cadenas y hélices en el siguiente orden: $\beta_1 \beta_2 \beta_3 \beta_4 \beta_5 \alpha_1 \beta_6 \alpha_2 \beta_7 \alpha_3$ y $\beta_8 \beta_9 \beta_{10} \beta_{11} \alpha_4 \beta_{12} \alpha_5$, respectivamente (Carfi et al., 1995 y 1998a, y Galleni et al., 2001). Las metalo-beta-lactamasas de la invención están truncadas en el extremo amino terminal antes de la segunda cadena beta. Preferiblemente están truncadas entre la primera y segunda cadena beta, y en particular inmediatamente en frente del aminoácido E entre la primera y segunda cadena beta según la estructura cristalográfica anterior.

Garau et al., 2004 han descrito un esquema de numeración estándar para beta-lactamasas de clase B (BBL) por analogía a la numeración de beta-lactamasa de Ambler (ABL) para serina beta-lactamasas (Ambler, 1980). El esquema de numeración BBL se deriva de una alineación estructural de estructuras por rayos X de metalo-beta-lactamasa conocidas para descubrir regiones conservadas entre varios grupos de metalo-beta-lactamasa que tienen bajo grado de identidad en el nivel primario de secuencia de aminoácidos. El estudio de Garau et al. reveló que el primer fragmento conservado forma la segunda estructura de lámina beta en la metalo-beta-lactamasa de *Bacillus cereus* BcII descrita por Carfi et al. 1995, y Carfi et al., 1998a. Por consiguiente, la lámina β_1 de la metalo-beta-lactamasa de *B. cereus* parece ser no esencial para la función enzimática, porque no va a estar presente en todos los grupos de metalo-beta-lactamasa. Sin embargo, la región amino terminal de todas las metalo-beta-lactamasas posee una estructura secundaria de cuatro fragmentos que forman láminas beta conservados antes del primer fragmento que forma una hélice alfa. Así, el sitio de truncado para la metalo-beta-lactamasa puede definirse como uno que deja cuatro cadenas beta antes de la primera hélice alfa de la estructura secundaria predicha pese a la presencia original de β_1 o no.

En el actual contexto se usan los códigos de aminoácido de una letra convencionales. Así, A denota alanina, R denota arginina, N denota asparagina, D denota ácido aspártico, C denota cisteína, E denota ácido glutámico, Q denota glutamina, G denota glicina, H denota histidina, I denota isoleucina, L denota leucina, K denota lisina, M denota metionina, F denota fenilalanina, P denota prolina, S denota serina, T denota treonina, W denota triptófano, Y denota tirosina y V denota valina. Las secuencias de aminoácidos se muestran con el amino terminal a la izquierda y el carboxilo terminal a la derecha. NH_2 - y $-COOH$ pueden o no indicarse.

Según una realización de la invención una célula huésped se transforma con un vector de expresión capaz de expresar una beta-lactamasa que tiene la fórmula general I:



en donde K es lisina, T es treonina, E es ácido glutámico y ΔBL es una proteína metalo-beta-lactamasa que se ha truncado en el extremo amino terminal antes de la segunda cadena beta de dicha proteína, por lo cual una proteína que tiene la fórmula general II:



se forma como resultado de modificación postraduccional de la proteína de fórmula I. La proteína de la fórmula general I se produce convenientemente ligando una secuencia de ADN que codifica KT a una secuencia de ADN que codifica E - ΔBL , en donde E- ΔBL es una metalo-beta-lactamasa de *Bacillus* y en particular de *B. cereus*, que se ha truncado en el extremo amino terminal antes de la segunda cadena beta inmediatamente en frente de un residuo de ácido glutámico E. En particular la construcción de nucleótidos comprende los nucleótidos secuenciales 94 - 756 de SEQ ID NO: 2.

La longitud de la región amino terminal sin estructura rígida varía entre grupos metalo-beta-lactamasa y en cada subclase. Las metalo-beta-lactamasas de *Bacillus* spp poseen además variaciones en la secuencia amino terminal antes de la segunda cadena beta, aunque la mayoría de las enzimas tienen un ácido glutámico (E) conservado en la posición +12 (véase Tabla 1). Por consiguiente, la supresión acoplada con la inserción KT adyacente a E puede aplicarse a metalo-beta-lactamasas de *Bacillus* conocidas, en cuyo caso los primeros once aminoácidos del amino terminal se eliminan del extremo N-terminal de la proteína beta-lactamasa madura que se da de forma natural. Según una realización específica de la invención la beta-lactamasa se trunca entre el aminoácido KN y E, y especialmente entre VIKN y E, o VMKN y E.

Tabla 1. Comparación de las secuencias amino terminal entre metalo-beta-lactamasas de *Bacillus* sp y P2A.

Proteína	Cepa de <i>Bacillus</i>	Región amino terminal *
P2A	<i>B. cereus</i> 98ME1552	<u>E</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>K</u>
Q2AJV1	<i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4	<u>E</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>K</u>
P10425	<i>Bacillus</i> sp. (cepa 170)	S <u>Q</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>K</u>
Q734F3	<i>B. cereus</i> ATCC 10987	<u>E</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>K</u>
P04190	<i>B. cereus</i> 569/H	S <u>Q</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>K</u>
Q81AW2	<i>B. cereus</i> ATCC 14579 / DSM 31	S <u>Q</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>K</u>
Q93T40	<i>B. anthracis</i> Sterne	E <u>R</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>K</u>
Q6SPY5	<i>B. anthracis</i> resistente a penicilina	E <u>R</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>K</u>
Q4MXZ5	<i>B. cereus</i> G9241	S <u>Q</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>K</u>
P14488	<i>B. cereus</i> 5/B/6	E <u>R</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>K</u>
Q6HFY5	<i>B. thuringiensis</i> 97-27	E <u>R</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>K</u>

* Las sustituciones de aminoácido están en negrita y el ácido glutámico (E) conservado está sombreado. La primera cadena beta para metalo-beta-lactamasas está subrayada una vez, y la segunda cadena beta está subrayada dos veces.

5 Según una realización específica de la invención E - ΔBL tiene al menos 80, 90, 95, 98 o 99% de identidad a la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácido secuenciales 6-221 de SEQ ID NO: 3. La identidad de secuencia puede determinarse usando BLAST (Herramientas de búsqueda de alineamiento local básico) como se describe en Altschul *et al.*, 1997. En particular E - ΔBL es una forma truncada de una metalo-beta-lactamasa que tiene la secuencia que se describe como SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento activo de beta-lactamasa de la misma. Puede ser por ejemplo, una forma truncada de metalo-beta-lactamasa BcII de *B. cereus*. Preferiblemente E - ΔBL tiene un extremo amino terminal que corresponde a los residuos de aminoácido 12-15, 12-19 o 12-23 de SEQ ID NO: 1, con el añadido de que el aminoácido en la posición + 13 puede ser o bien T (treonina) o A (alanina).

15 Por una secuencia de aminoácidos que es una "variante" de una secuencia de aminoácidos específica se entiende una secuencia de aminoácidos que no es idéntica a la secuencia de aminoácidos específica, sino que contiene al menos algunos cambios de aminoácidos, es decir, supresiones, sustituciones, inversiones, inserciones, etc., que no afectan de forma esencial a la actividad biológica de la proteína en comparación con la de la secuencia de aminoácidos específica. La actividad biológica en este contexto se refiere a la actividad de la betalactamasa. Una variante puede ser un polipéptido que se da de forma natural, por ejemplo, como una variante alélica en la misma cepa, especie o género, o puede haberse generado por mutagénesis.

20 Un "fragmento" se entiende que es parte de una secuencia de aminoácidos específica que es suficientemente larga para tener la actividad biológica deseada, es decir, actividad de betalactamasa. En otras palabras, el fragmento puede ser, por ejemplo, una subsecuencia de las beta-lactamasas descritas específicamente.

25 La construcción de nucleótidos que codifica NH₂ - K - T - E - ΔBL-COOH puede insertarse en un vector de expresión y transformarse en una célula huésped. La célula huésped se cultiva entonces bajo condiciones que permiten la expresión y modificación postraducciona de la proteína en NH₂- E - ΔBL-COOH, que puede así obtenerse en forma esencialmente pura, lo que significa que al menos el 90%, y preferiblemente al menos el 95%, en particular al menos el 99% de la metalo-betalactamasa está presente en una única forma como NH₂- E - ΔBL-COOH. La modificación postraducciona de la proteína expresada, es decir, la escisión del dipéptido KT se cataliza por proteasas del huésped. El huésped puede ser eucariótico o procariótico, tal como una célula bacteriana, de levadura u hongo. El huésped bacteriano puede ser, por ejemplo, *Escherichia coli*. Preferiblemente el huésped pertenece a *Bacillus* spp, y en particular es *B. licheniformis* o *B. subtilis*. Según una realización preferida el NH₂ - K - T - E - ABL-COOH se expresa como una proteína que comprende un péptido de señalización, por lo cual la proteína se secreta en el medio de cultivo, y el péptido de señalización se escinde primero, y después el dipéptido. Otros cambios menores tales como desamidación, oxidación, ruptura o formación de enlace disulfuro, isomerización, succinimidación, reticulado que no es de disulfuro, reacción de Maillard, desglicosilación, pueden darse en la proteína durante el procedimiento de producción o almacenaje, y son aceptables mientras la actividad de la beta-lactamasa no se afecte de forma significativa.

- La beta-lactamasa modificada NH₂ - E - ΔBL-COOH puede originarse a partir de cualquier bacteria capaz de producir una metalo-beta-lactamasa. Dichas bacterias son, por ejemplo, bacterias de género *Enterobacteriae* (*Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Shigella flexneri*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenobacterium maltophilia*, género *Acinetobacter*, *Bacteroides fragilis*, *Bacillus cereus*, *Flavobacterium odoratum* y *Bacteroides fragilis*. Otras posibles fuentes son las especies *Aeromonas*, *Legionella* y *Stenotrophomonas*. La enzima se trunca en el extremo amino terminal de la proteína enzimática madura antes de la segunda cadena beta en una posición que da por resultado E como el aminoácido N-terminal. Si no hay un residuo E apropiado en la betalactamasa bacteriana, solo la parte ABL puede obtenerse a partir de la bacteria, mientras un tripéptido KTE se acopla en frente de ΔBL para formar la proteína NH₂ - K - T - E - ΔBL-COOH.
- Preferiblemente la beta-lactamasa modificada se deriva de *Bacillus*, y especialmente de *B. cereus*. En particular es una beta-lactamasa de *B. cereus* de la que se han eliminado los primeros once aminoácidos N-terminales de la proteína betalactamasa madura no modificada.
- La beta-lactamasa modificada de la invención puede mezclarse con cualquier excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable para formar una composición farmacéutica. Una cantidad de la beta-lactamasa modificada efectiva en la supresión del efecto adverso de antibióticos de beta-lactama en el intestino se administra entonces de forma oral a una persona a tratar con uno o más antibióticos de beta-lactama. El preparado de beta-lactamasa puede administrarse antes, simultáneamente con o después del tratamiento antibiótico. Es insensible a los inhibidores de serina betalactamasa, y puede por lo tanto usarse para eliminar el antibiótico tanto en presencia como en ausencia de dichos inhibidores.
- La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes. Debería entenderse, sin embargo, que las realizaciones dadas en la descripción anterior y en los ejemplos son solo con propósitos ilustrativos, y que son posibles varios cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1. Materiales y métodos

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

- Las cepas bacterianas y sus genotipos y fenotipos relevantes se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas bacterianas y sus genotipos y fenotipos relevantes

Cepa	Genotipo relevante	Fenotipo relevante
<i>Bacillus subtilis</i> RS303	<i>irpC2</i> , <i>sigG::cat</i> (Δ <i>sigG</i>)	Auxótrofo de triptófano, asporogénico
<i>Bacillus subtilis</i> IH 6140	<i>sacA321</i>	Nivel reducido de exoproteasa
<i>Bacillus subtilis</i> RS314	<i>trpC2</i> , <i>sigG::cat</i> , (Δ <i>sigG</i>) construcción de expresión pRSH314 que codifica la metalo-beta-lactamasa troncada	Auxótrofo de triptófano, asporogénico, secreta metalo-beta-lactamasa
<i>Bacillus subtilis</i> RS315	<i>trpC2</i> , <i>sigG::cat</i> , (Δ <i>sigG</i>) construcción de expresión pRSH315 que codifica el gen completo de metalo-beta-lactamasa	Auxótrofo de triptófano, asporogénico, secreta metalo-beta-lactamasa
<i>Bacillus subtilis</i> RS317	<i>trpC2</i> , <i>sigG::cat</i> , (A <i>sigG</i>) construcción de expresión pRSH317 que codifica la metalo-beta-lactamasa troncada	Auxótrofo de triptófano, asporogénico, secreta metalo-beta-lactamasa
<i>Bacillus subtilis</i> RS318	<i>trpC2</i> , <i>sigG::cat</i> , (Δ <i>sigG</i>) construcción de expresión pRSH318 que codifica la metalo-beta-lactamasa troncada	Auxótrofo de triptófano, asporogénico, secreta metalo-beta-lactamasa
<i>Bacillus cereus</i> 98ME1552		Multirresistente a varias beta-lactamas

- Las bacterias se cultivaron generalmente en medio Luria complejo (5 gramos de extracto de levadura, 10 gramos de triptona y 10 gramos de cloruro sódico por litro) suplementado con antibióticos apropiados como agentes de selección en modo matraz con agitación a +37°C. Un medio de cultivo sintético suplementado con antibiótico apropiado se usó en las fermentaciones. Un medio sintético modificado se usó para generar células competentes de *Bacillus subtilis*. La composición detallada de estos medios se describe en el documento WO03/040352.

Técnicas de ADN

- Las técnicas convencionales de ADN que incluyen, por ejemplo, restricciones, electroforesis en gel de agarosa y ligaduras, se realizaron según Sambrook y Russell (2001). El ADN cromosómico se aisló mediante el método

Marmur (Marmur, 1961). El ADN plasmídico se aisló mediante el equipo Qiagen plasmid Midi según las instrucciones del fabricante (Qiagen Plasmid Purification Handbook, 1999) aunque el tratamiento de lisozima (1 mg/ml) se añadió al protocolo para degradar la capa de peptidoglicanos. La lisozima se suplementó con tampón P1 y las células se incubaron a 37°C durante 30 minutos.

- 5 El PCR se realizó generalmente según los protocolos descritos en el documento WO03/040352.

Caracterización de región amino terminal de varias formas de metalo-beta-lactamasa

Para determinaciones de la secuencia de aminoácidos N-terminal y espectrometría de masas, se sometieron muestras de metalo-beta-lactamasa purificadas a cromatografía en fase inversa y las enzimas de fraccionaron en un gradiente lineal de 0,1% de TFA y 0,075% de TFA-acetonitrilo de 0% a 100% durante 60 minutos.

- 10 Las secuencias NH₂-terminales de formas de metalo-beta-lactamasa se determinaron por degradación de Edman automatizada con un secuenciador de proteínas de Applied Biosystems modelo 494A.

Los análisis de masas de formas de metalo-beta-lactamasa se realizaron mediante un instrumento híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF). Se ha asumido que las variantes de metalo-beta-lactamasa proporcionan potenciales de ionización comparables que se han utilizado en las valoraciones de sus proporciones relativas en las muestras.

- 15 Las secuencias de nucleótidos de los genes de beta-lactamasa se determinaron por el método de terminación de cadena dideoxi con un secuenciador automático de ADN.

Ejemplo 2. La secuencia completa de nucleótidos del gen de metalo-beta-lactamasa de *Bacillus cereus* 98ME1552

- 20 La determinación del gen completo que codifica la metalo-beta-lactamasa se realizó secuencialmente usando técnicas PCR y Vectorette. Parte del gen estructural se amplificó por PCR, con ADN cromosómico aislado de un aislado clínico de *B. cereus* 98ME1552 como un iniciador y con cebadores diseñados para hibridar la región de codificación SQKVEKTVI (cebador directo) y la región de codificación HTLDLL (cebador inverso) del gen de metalo-beta-lactamasa de *Bacillus cereus* 569/H. Ambos cebadores también portan sitios de restricción *Hind* III. El fragmento de ADN amplificado (aproximadamente 700 pb) se digirió con *Hind* III y se ligó al sitio *Hind* III de un vector de secreción pKTH141. Las células competentes de *Bacillus subtilis* IH6140 se transformaron con la mezcla de ligado. Un clon que alberga un plásmido que expresa metalo-beta-lactamasa se verificó por secuenciación de ADN. El plásmido se llamó pRSH314.

Las células competentes de *B. subtilis* RS303 preparadas como se describe en el documento WO03/04052 se transformaron con pRSH314 dando por resultado la cepa *B. subtilis* RS314.

- 30 La secuencia completa de ADN del gen de metalo-beta-lactamasa se determinó a partir de fragmentos de PCR obtenidos empleando la técnica Vectorette como sigue: El ADN cromosómico del *Bacillus cereus* 98ME1552 se digirió con la enzima de restricción *Hind* III y se ligó a *Hind* III tratado con Vector-ettell. La librería Vectorette obtenida se cribó en una reacción PCR empleando los cebadores de iniciación MEBLSQ-F (5'-AGGAAATGTTGCGGATGC) o MEBLSQ-R (5'-CCTTCGTTAATTTGTTATCCC) diseñados a partir de la secuencia de ADN obtenida a partir de las 35 700 pb de pRSH314.

- El cribado por PCR de la librería Vectorette con el cebador MEBLSQ-F generó un fragmento de aproximadamente 1000 pb (fragmento MEBL1) y con el cebador MEBLSQ-R un fragmento de aproximadamente 1100 pb (fragmento MEBL2). Tanto el fragmento MEBL1 como el MEBL2 se purificaron a partir del gel de agarosa después de la electroforesis. Las secuencias de nucleótidos de ambos fragmentos se determinaron por secuenciación de ADN dando por resultado el nucleótido completo del gen de metalo-beta-lactamasa de *B. cereus* 98ME1552. El nucleótido completo y la secuencia de aminoácidos deducida del gen de metalo-beta-lactamasa de *B. cereus* 98ME1552 se presenta en la Figura 1. La secuencia de aminoácidos se describe también como SEQ ID NO: 1. El marco de lectura abierta codifica un polipéptido de 257 aminoácidos, cuya secuencia amino terminal (30 residuos de aminoácidos) muestra características típicas de las de un péptido de señalización bacteriano que dirige la secreción de proteína a través de la membrana citoplasmática por medio de una ruta secretora general. El sitio de ruptura predicho de la peptidasa señal es después de la alanina en la posición de -30 (véase la Figura 1). La masa molecular calculada y el valor pI de la proteína madura de 227 residuos de aminoácidos es 24.877,3 Da y 6,0, respectivamente. La secuencia de metalo-beta-lactamasa de 98ME1552 se usó como un iniciador de búsqueda en una búsqueda en BLAST para identificar la proteína. La búsqueda en BLAST se realizó usando el Servicio en Red SIB BLAST del Instituto Suizo de Bioinformática (<http://www.expasy.org/tools/blast/>). La búsqueda se hizo en contraste con una base de datos basada en el Conocimiento UniProtKB usando el programa NCBI BLASTP 2.2.13 (Altschul *et al.*, 1997) con algoritmo BLOSUM62 y 11 penalizaciones por hueco por existencia y 1 por extensión. La búsqueda en BLAST realizada con la metalo-beta-lactamasa de 98ME1552 dio la mayor similitud conseguida con otras beta-lactamasas de clase B del subgrupo B1. Como se esperaba, la beta-lactamasa de 98ME1552 mostró un alto grado de identidad (por encima de 90%) con las otras beta-lactamasas de *B. cereus*. Según el alineamiento estructural de varias metalo-beta-lactamasas de *B. cereus*, las sustituciones de aminoácidos en la lactamasa de *B. cereus* 98ME1552 se predice que están situadas en regiones no esenciales para la función de la enzima.

Ejemplo 3. Clonación y expresión del gen de metalo-beta-lactamasa de *B. cereus* 98ME1552 en *Bacillus subtilis*

Basado en las secuencias de ADN obtenidas de la librería Vectorette, nuevos cebadores, BLC1-F

(5'-CGCGAAGCTTCCGAACAAAAGCTAGAGCAAATAGTAATC),

y BLC1-R

5 (5'-GCCGAAGCTTTTATTTAATAAATCCAATGTATGTAAAAGTAATCCC)

se diseñaron para generar una inserción de ADN que codifica la metalo-beta-lactamasa completa en PCR. Los cebadores también portaban sitios *Hind* III en sus extremos y se usó ADN cromosómico purificado de *B. cereus* 98ME1552 como un iniciador. El fragmento PCR amplificado de aproximadamente 0,7 kb se digirió con *Hind* III y se ligó al sitio *Hind* III de un vector de secreción pKTH141. Las células competentes de *Bacillus subtilis* RS303 se transformaron por la mezcla de ligado. Un clon positivo se designó RS315 y la construcción de expresión que lo guarda se llamó pRSH315.

La construcción de expresión pRSH315 se aisló y la región de inserción se secuenció. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducidos del gen de metalo-beta-lactamasa clonado fueron idénticas a las determinadas por la librería Vectorette. La secuencia de ADN determinada reveló en el marco la fusión entre la secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de señalización de 31 aminoácidos de larga de alfa amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens*, el sitio de clonación *Hind* III y el gen completo de metalo-beta-lactamasa de *B. cereus* 98ME1552 (véase la Figura 2). La peptidasa señal se predice que corta la unión peptídica entre alanina (A) en la posición de -1 y glutamina (Q) en la posición de +1. La metalo-beta-lactamasa madura posee una extensión NH₂-terminal de un NH₂-QAS-tripéptido que se deriva del sitio de clonación *Hind* III en la construcción de expresión. Por tanto, en base a la secuencia de aminoácidos deducida la metalo-beta-lactamas modificada madura está compuesta de 230 residuos de aminoácido.

Ejemplo 4. Determinación de la secuencia de aminoácidos amino terminal de variantes de metalo-beta-lactamasa obtenidos de un sistema de producción de *Bacillus subtilis*

Para caracterización adicional, la metalo-beta-lactamasa recombinante se produjo en cultivos realizados o bien en matraz con agitación o en fermentación usando un medio sintético de crecimiento. La metalo-beta-lactamasa se secretó de forma efectiva en el sobrenadante del cultivo. La enzima se purificó a partir del sobrenadante del cultivo concentrado mediante cromatografía de intercambio iónico. Se observó actividad enzimática en dos fracciones separadas. Las fracciones enzimáticas purificadas se sometieron a secuenciación de NH₂-terminal y análisis de espectrometría de masas. Los análisis revelaron que ambas fracciones comprendían formas enzimáticas con amino terminal heterogéneo. Las diversas formas enzimáticas y sus proporciones relativas se presentan en la Tabla 3. Respecto a la secuencia de aminoácidos deducida, todas las formas enzimáticas tienen supresiones de varias longitudes en sus regiones NH₂-terminales. En general, el octapéptido NH₂-QASEQKLE parece eliminarse en todas las formas enzimáticas. Además la forma enzimática más pequeña en la fracción 2 carece de un IVIKN-pentapéptido adicional. La microheterogeneidad observada en la región NH₂-terminal puede explicarse como modificaciones postraduccionales provocadas por la acción de varias proteasas de la célula huésped.

Tabla 3. Secuencias amino terminal deducidas y determinadas y masa molecular determinada de formas de metalo-beta-lactamasa truncadas

Fracción enzimática núm.	Secuencia de aminoácidos NH ₂ -terminal deducida	Secuencia NH ₂ -terminal determinada	Proporción relativa de formas enzimáticas en fracciones (%)	Masa determinada (kDa)
	NH ₂ -QASEQKLEQIVIKNETGTI			
1		NH ₂ -IVIKNETGTI	100	24,122
2		NH ₂ -NETGTI	60	23,668
2		NH ₂ -ETGTI	40	23,554

Ejemplo 5. Construcción de forma metalo-beta-lactamasa eliminada de *Bacillus cereus* 98ME1552 y sus variantes amino terminal en un sistema de producción de *Bacillus subtilis*

Para intentar reducir la heterogeneidad de NH₂-terminal la secuencia de ADN que codifica la región variable NH₂-EQKLEQIVIKN del gen de metalo-beta-lactamasa se eliminó por PCR. El gen completo de metalo-beta-lactamasa de *B. cereus* 98ME1552 se usó como un iniciador en PCR con un cebador directo que hibrida una secuencia de codificación de ETGTISISQ y un cebador inverso que hibrida una secuencia de codificación GLLLHTL DLLK seguido de un codón de parada de traducción TAA. Ambos cebadores llevaban sitios *Hind* III.

El fragmento PCR obtenido de aproximadamente 0,7 kb se clonó en el sitio *Hind* III del vector de secreción pKTH141 y la cepa competente de *B.subtilis* RS303 se transformó por la mezcla de ligado. La supresión de NH₂-terminal se verificó por secuenciación de ADN del gen metalo-beta-lactamasa insertado de la construcción de expresión aislada de un clon positivo. La cepa transformante se llamó *Bacillus subtilis* RS317 y la construcción de expresión se llamó pRSH317.

La metalo-beta-lactamasa truncada se produjo en una célula de producción de *Bacillus subtilis* y la enzima se purificó a partir del sobrenadante de cultivo empleando cromatografía de intercambio iónico de la que la enzima activa se eluyó como una fracción única. La fracción enzimática se sometió a secuenciación de aminoácidos NH₂-terminal y análisis de masa molecular. Los resultados observados (en la Tabla 4) mostraron que la metalo-beta-lactamasa truncada apareció además como una proteína con un amino terminal heterogéneo. La variante enzimática principal posee una secuencia amino terminal idéntica a la de la secuencia de aminoácidos deducida que incluye el sitio *Hind* III que codifica el QAS-tripéptido de iniciación. SE encontró que una variante minoritaria tenía una supresión de un QA-dipéptido. Debido al bloqueo amino terminal, no se recibió secuencias de aminoácidos de una variante. El bloqueo amino terminal es posible que sea el resultado de ciclación del residuo glutamina para formar un residuo piroglutamilo durante el procedimiento de producción. Para concluir, la supresión amino terminal no redujo fundamentalmente la microheterogeneidad amino terminal.

Tabla 4. Secuencias amino terminal determinadas y masas moleculares de formas de metalo-beta-lactamasa truncada

Fracción enzimática núm.	Secuencia de aminoácidos NH ₂ -terminal deducida	Secuencia NH ₂ -terminal determinada	Proporción relativa de formas enzimáticas en fracciones (%)	Análisis de masa (kDa)
	NH ₂ -QASETGTISI			
1.		a. forma cíclica de glutamina → sin secuencia de aminoácidos b. NH ₂ -QASETGTISI c. NH ₂ -SETGTISI	b. 90 c. 10	a. 23,823 b. 23,840 c. 23,641

Ejemplo 6. Construcción de metalo-beta-lactamasa truncada de *Bacillus cereus* 98ME1552 que posee una inserción de secuencia de codificación KT

Para evitar la modificación postraduccional se diseñó un truncado molecular de metalo-beta-lactamasa que comprende la supresión de la secuencia de ADN que codifica la región NH₂-EQKLEQIVIKN junto con la inserción de una secuencia que codifica el dipéptido KT situado directamente corriente abajo del sitio de clonación de 3'- *Hind* III.

Un gen de metalo-beta-lactamasa modificado se creó como en el Ejemplo 5, excepto por el cebador directo, que contenía una secuencia de ADN que codifica KT. El fragmento PCR se cortó con *Hind* III y se ligó al sitio *Hind* III del vector de secreción pKTH141 y células competentes de *B.subtilis* RS303 se transformaron por la mezcla de ligado. La secuencia de nucleótidos correcta del gen de metalo-beta-lactamasa modificada en la construcción de expresión se confirmó por secuenciación de ADN. Un clon positivo se llamó *Bacillus subtilis* RS318 y la construcción de expresión se llamó pRSH318. El nucleótido y la secuencia de aminoácidos deducida de la beta-lactamasa de *B. cereus* 98ME1552 derivada de pRSH318 se presenta en la Figura 3, y se describe como SEQ ID NO:2 y 3, respectivamente.

La metalo-beta-lactamasa truncada se produjo, purificó y analizó como se describe anteriormente. La metalo-enzima truncada activa se eluyó de la columna como un único pico. La fracción única contenía metalo-beta-lactamasa que poseía un residuo de ácido glutámico amino terminal homólogo (NH₂-E; véase Tabla 5). Por consiguiente, la inserción de dipéptido KT conduce a la modificación postraduccional que da por resultado una secuencia de aminoácidos amino terminal uniforme. La metalo-beta-lactamasa truncada se llamó la proteína P2A.

Tabla 5. Secuencias amino terminal deducida y determinada y la masa molecular determinada de la forma metalo-beta-lactamasa truncada

Fracción enzimática núm.	Secuencia de aminoácidos NH ₂ -terminal deducida	Secuencia NH ₂ -terminal determinada	Proporción relativa de formas enzimáticas en fracciones (%)	Análisis de masa (kDa)
	NH ₂ -QASKTETGTISI			
1.		a. NH ₂ -ETGTISI	a. 100	a. 23554

Ejemplo 7. Parámetros cinéticos enzimáticos de la metalo-beta-lactamasa P2A

La diversidad de las propiedades catalíticas de la enzima P2A se estudió con varios tipos de beta-lactamas que incluyen la familia de la penicilina con y sin inhibidores de serina beta-lactamasa, segunda y tercera generación de cefalosporinas y carbapenemas (meropenem). Los parámetros cinéticos enzimáticos k_{cat} y K_m se determinaron a partir de tasas iniciales por el diagrama de Hanes. Las reacciones se realizaron en tampón fosfato 10 mM, pH 7,0 a 30°C. La cubeta de reacción (un mL) contenía aproximadamente 5 pmoles de enzima en todas las reacciones excepto 1,7 pmoles de enzima en el ensayo de meropenem. La hidrólisis de varios sustratos de beta-lactama se grabaron espectrofotométricamente a una longitud de onda específica para cada sustrato.

Los valores para diferentes parámetros cinéticos (k_{cat} , K_m y k_{cat}/K_m) que representan valores medios obtenidos de tres medidas independientes se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores de parámetros cinéticos para la metalo-beta-lactamasa P2A

Antibiótico	La proteína P2A		
	K_m (microM)	k_{cat} (1/s)	k_{cat}/K_m ($M^{-1} \times s^{-1}$)
Ampicilina	942	1114	$1,18 \times 10^{-6}$
Ampicilina-sulbactam (Unasyn)	1104	1251	$1,15 \times 10^{-6}$
Amoxicilina	716	980	$1,37 \times 10^{-6}$
Amoxicilina-ácido clavulánico (Augmentin)	717	990	$1,38 \times 10^{-6}$
Piperacilina	372	1049	$2,82 \times 10^{-6}$
Piperacilina-tazobactam (Tazocin)	412	1098	$2,67 \times 10^{-6}$
Cefuroxima	27	221	$7,99 \times 10^{-6}$
Cefotaxima	66	479	$7,28 \times 10^{-6}$
Ceftriaxona	68	95	$1,40 \times 10^{-6}$
Meropenem	410	480	$1,17 \times 10^{-6}$

Ejemplo 8. Estabilidad de la proteína P2A en quimo ileal humano

La resistencia a proteasas intestinales es uno de los factores más importantes que afectan a la aplicabilidad de la proteína P2A como una sustancia farmacológica en la terapia de beta-lactamasa dirigida en el intestino delgado. La susceptibilidad de metalo-beta-lactamasa a la acción de proteasas del intestino delgado se ensayó añadiendo diversas cantidades de enzima activa en tubos que consistían en quimo ileal humano. La hidrólisis de metalo-beta-lactamasa se monitorizó midiendo la actividad de beta-lactamasa de las muestras ileales a varios puntos temporales. Se empleó meropenem como sustrato en los ensayos de actividad.

Los resultados obtenidos de cuatro experimentos independientes y los valores medios se expresan en la Tabla 7. La enzima P2A parece ser una proteína estable, que se aclaró en el quimo ileal humano con una vida media de 55 minutos (valor medio). Se observaron altas variaciones de vidas medias entre varios experimentos. Sin embargo, la vida media de P2A en el quimo del intestino delgado humano se ha evaluado que es adecuada para la aplicación con éxito de terapia con enzima P2A para la supresión de reacción adversa inducida por beta-lactama residual en los tractos intestinales.

Tabla 7. Vida media (*in vitro*) de la metalo-beta-lactamasa P2A en quimo ileal humano.

Experimento núm.	Vida media (minutos)	Valor medio (\pm DE)
1	60	55 ± 25
2	80	55 ± 25
3	20	55 ± 25
4	60	55 ± 25

Referencias

- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402
- Ambler, R.P. 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. London B* 289:321-331.
- 5 Bush, K. 1998. Metallo- β -lactamases: a class apart. *Clin. Infect. Dis.* 32: 271-276.
- Carfi A, Duee E, Galleni M, Frere JM y Dideberg O. 1998a. 1.85 Å resolution structure of the zinc (II) beta-lactamase from *Bacillus cereus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 54:313-323.
- Carfi A, Duee E, Paul-Soto R, Galleni M, Frere JM y Dideberg O. 1998b. X-ray structure of the ZnII beta-lactamase from *Bacteroides fragilis* in an orthorhombic crystal form. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 54:45-57.
- 10 Carfi, A., Pares, S., Duee, E., Galleni, M., Duez, C., Frere, J.M. y Dideberg O. 1995. The 3-D structure of a zinc metallo-beta-lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. *EMBO J.* 14:4914-4921.
- Concha, N.O., Janson, C.A., Rowling, P., Pearson, S., Cheever, C.A, Clarke, B.P., Lewis, C., Galleni, M., Free, J.M., Payne, D.J., Bateson, J.H. y Abdel-Meguld, S.S. 2000. Crystal structure of the IMP-1 metallo beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its complex with a mercaptocarboxylate inhibitor: binding determinants of a potent, broad-spectrum inhibitor. *Biochemistry.* 39:4288-4298.
- 15 Crawford P. A., et al., 2004. Over-expression, purification, and characterization of metallo- β -lactamase ImiS from *Aeromonas veronii* by sobria. *Protein Expression and Purification* 36:272-279.
- Galleni, M., Lamotte-Brasseur, J., Rossolini, G.M., Spencer, J., Dideberg, O. y Frere, J.M. 2001. Metallo-beta-lactamases Standard numbering scheme for class B beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:660-663
- 20 Garau, G., Garcia-Sáez, I., Bebrone, C., Anne, C., Mercuri, P., Galleni, M., Frere, J.M. y Dideberg, O. 2004. Update of the standard numbering scheme for class B beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2347-2349.
- Garau, G., Bebrone, C., Anne, C., Galleni, M., Frere, J.M., Dideberg, O. 2005. A metallo-beta-lactamase enzyme in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *J Mol Biol.* 345:785-795.
- 25 Harmoinen, J., Mentula, S., Heikkilä, M., van der Rest M., Rajala-Schultz, P.J., Donskey, C.J., Frías, R., Koski, P., Wickstrand, N., Jousimies-Somer, H., Westermarck, E., Lindevall, K. 2004. Oral Targeted Recombinant Beta-Lactamase Prevents Ampicillin-Induced Selective Pressure on the Gut Microbiota: A Novel Approach to Reduce Antimicrobial Resistance *Antimicrob. Agents and Chemotherapy.* 48: 75-79.
- Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.* 3: 208-218.
- 30 Mentula, S., Harmoinen, J., Koski, P., Westermarck, E., Huovinen, P. y Könönen, E. 2004. Inhibition of ampicillin-Induced emergence of resistance in intestinal coliforms by targeted recombinant beta-lactamase. *Int.J.Antimicrob.Agents.* 24:555-561.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning. a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press Cold Spring Harbour, Nueva York.
- 35 Simm A. M., 2002. Characterization of Monomeric L1 Metallo- β -lactamase and the Role of the N-terminal Extension in Negative Cooperativity and Antibiotic Hydrolysis. *The Journal of Biological Chemistry* 277(27):24744-24752.
- Stiefel, U., Pultz, N.J., Harmoinen, J., Koski, P., Lindevall, K., Helfand, M.S., Donskey, C.J. 2003. Oral β -lactamase administration preserves colonization resistance of piperacillin-treated mice. *J Infect Dis.* 10: 1605-1609.
- 40 Stiefel, U., Harmoinen, J., Koski, P., Kaariainen, S., Wickstrand, N., Lindevall, K., Pultz, N.J., Bonomo, R.A., Helfand, M.S. y Donskey, C.J. 2005. Orally administered recombinant metallo-beta-lactamase preserves colonization resistance of piperacillin-tazobactam-treated mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 5190-5191.
- Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L y Nordmann, P. 2005. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 18:306-325
- 45 Walther-Rasmussen J. et al., 1999. Terminal truncations in Amp C β -lactamase from a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Biochem* 263:478-485.

Listado de secuencias

<110> Terapias IPSAT

5 <120> Beta-lactamasa modificada y método para su preparación

<130> 2061011

<160> 3

10 <170> Patente en versión 3.2

<210> 1

<211> 257

15 <212> PRT

<213> Bacillus cereus

<220>

<221> mat_péptido

20 <222> (31)..(257)

<400> 1

Met Lys Lys Asn Thr Leu Leu Lys Leu Gly Val Cys Val Ser Leu Leu
 -30 -25 -20 -15

Gly Ile Thr Gln Phe Val Ser Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Gln
 -10 -5 -1 1

Lys Leu Glu Gln Ile Val Ile Lys Asn Glu Thr Gly Thr Ile Ser Ile
 5 10 15

Ser Gln Leu Asn Lys Asn Val Trp Val His Thr Glu Leu Gly Tyr Phe
 20 25 30

Asn Gly Glu Ala Val Pro Ser Asn Gly Leu Val Leu Asn Thr Ser Lys
 35 40 45 50

Gly Leu Val Leu Val Asp Ser Ser Trp Asp Asn Lys Leu Thr Lys Glu
 55 60 65

Leu Ile Glu Met Val Glu Lys Lys Phe Gln Lys Arg Val Thr Asp Val
 70 75 80

Ile Ile Thr His Ala His Ala Asp Arg Ile Gly Gly Ile Thr Ala Leu
 85 90 95

Lys Glu Arg Gly Ile Lys Ala His Ser Thr Ala Leu Thr Ala Glu Leu
 100 105 110

Ala Lys Asn Ser Gly Tyr Glu Glu Pro Leu Gly Asp Leu Gln Thr Ile
 115 120 125 130

Thr Ser Leu Lys Phe Gly Asn Thr Lys Val Glu Thr Phe Tyr Pro Gly
 135 140 145

Lys Gly His Thr Glu Asp Asn Ile Val Val Trp Leu Pro Gln Tyr Gln

25

ES 2 452 321 T3

150 155 160

Ile Leu Ala Gly Gly Cys Leu Val Lys Ser Ala Glu Ala Lys Asp Leu
 165 170 175

Gly Asn Val Ala Asp Ala Tyr Val Asn Glu Trp Ser Thr Ser Ile Glu
 180 185 190

Asn Val Leu Lys Arg Tyr Gly Asn Ile Asn Ser Val Val Pro Gly His
 195 200 205 210

Gly Glu Val Gly Asp Lys Gly Leu Leu Leu His Thr Leu Asp Leu Leu
 215 220 225

Lys

- <210> 2
- <211> 759
- 5 <212> ADN
- <213> Bacillus cereus

- <220>
- <221> sig_péptido
- 10 <222> (1) .. (93)

- <220>
- <221> CDS
- <222> (1) .. (756)
- 15

- <220>
- <221> mat_péptido
- <222> (94)..(756)
- 20

- <400> 2

atg att caa aaa cga aag cgg aca gtt tcg ttc aga ctt gtg ctt atg	48
Met Ile Gln Lys Arg Lys Arg Thr Val Ser Phe Arg Leu Val Leu Met	
-30 -25 -20	
tgc acg ctg tta ttt gtc agt ttg ccg att aca aaa aca tca gcg caa	96
Cys Thr Leu Leu Phe Val Ser Leu Pro Ile Thr Lys Thr Ser Ala Gln	
-15 -10 -5 -1 1	
gct tcc aaa aca gag acg gga acc att tca ata tct cag tta aac aag	144
Ala Ser Lys Thr Glu Thr Gly Thr Ile Ser Ile Ser Gln Leu Asn Lys	
5 10 15	
aat gta tgg gtt cat acg gag tta ggt tat ttt aat gga gaa gca gtt	192
Asn Val Trp Val His Thr Glu Leu Gly Tyr Phe Asn Gly Glu Ala Val	
20 25 30	
cct tcg aac ggt cta gtt ctt aat act tct aaa ggg cta gta ctt gtt	240
Pro Ser Asn Gly Leu Val Leu Asn Thr Ser Lys Gly Leu Val Leu Val	
35 40 45	
gat tct tct tgg gat aac aaa tta acg aag gaa cta ata gaa atg gta	288
Asp Ser Ser Trp Asp Asn Lys Leu Thr Lys Glu Leu Ile Glu Met Val	
50 55 60 65	
gaa aag aaa ttt cag aag cgc gta acg gat gtc att att aca cat gcg	336
Glu Lys Lys Phe Gln Lys Arg Val Thr Asp Val Ile Ile Thr His Ala	
70 75 80	

ES 2 452 321 T3

cac gct gat cga att ggc gga ata aca gcg ttg aaa gaa aga ggc att 384
 His Ala Asp Arg Ile Gly Gly Ile Thr Ala Leu Lys Glu Arg Gly Ile
 85 90 95

aaa gcg cat agt aca gca tta acc gca gaa cta gca aag aac agt gga 432
 Lys Ala His Ser Thr Ala Leu Thr Ala Glu Leu Ala Lys Asn Ser Gly
 100 105 110

tat gaa gag ccg ctt gga gat tta caa aca att acg agt tta aag ttt 480
 Tyr Glu Glu Pro Leu Gly Asp Leu Gln Thr Ile Thr Ser Leu Lys Phe
 115 120 125

ggc aat aca aaa gta gaa acg ttc tat cca ggg aaa gga cat aca gaa 528
 Gly Asn Thr Lys Val Glu Thr Phe Tyr Pro Gly Lys Gly His Thr Glu
 130 135 140 145

gat aat att gtt gtt tgg ttg cca caa tat caa att tta gct gga ggc 576
 Asp Asn Ile Val Val Trp Leu Pro Gln Tyr Gln Ile Leu Ala Gly Gly
 150 155 160

tgt tta gta aaa tct gcg gaa gct aaa gat tta gga aat gtt gcg gat 624
 Cys Leu Val Lys Ser Ala Glu Ala Lys Asp Leu Gly Asn Val Ala Asp
 165 170 175

gcg tat gta aat gaa tgg tct aca tcg att gag aat gtg ctg aag cga 672
 Ala Tyr Val Asn Glu Trp Ser Thr Ser Ile Glu Asn Val Leu Lys Arg
 180 185 190

tat gga aat ata aat tcg gta gta cct ggt cat gga gaa gta gga gac 720
 Tyr Gly Asn Ile Asn Ser Val Val Pro Gly His Gly Glu Val Gly Asp
 195 200 205

aag gga tta ctt tta cat aca ttg gat tta tta aaa taa 759
 Lys Gly Leu Leu Leu His Thr Leu Asp Leu Leu Lys
 210 215 220

<210> 3
 <211> 252
 5 <212> PRT
 <213> Bacillus cereus

<400> 3

Met Ile Gln Lys Arg Lys Arg Thr Val Ser Phe Arg Leu Val Leu Met
 -30 -25 -20

Cys Thr Leu Leu Phe Val Ser Leu Pro Ile Thr Lys Thr Ser Ala Gln
 -15 -10 -5 -1 1

Ala Ser Lys Thr Glu Thr Gly Thr Ile Ser Ile Ser Gln Leu Asn Lys
 5 10 15

Asn Val Trp Val His Thr Glu Leu Gly Tyr Phe Asn Gly Glu Ala Val
 20 25 30

Pro Ser Asn Gly Leu Val Leu Asn Thr Ser Lys Gly Leu Val Leu Val
 35 40 45

10 Asp Ser Ser Trp Asp Asn Lys Leu Thr Lys Glu Leu Ile Glu Met Val
 50 55 60 65

ES 2 452 321 T3

Glu Lys Lys Phe Gln Lys Arg Val Thr Asp Val Ile Ile Thr His Ala
 70 75 80

His Ala Asp Arg Ile Gly Gly Ile Thr Ala Leu Lys Glu Arg Gly Ile
 85 90 95

Lys Ala His Ser Thr Ala Leu Thr Ala Glu Leu Ala Lys Asn Ser Gly
 100 105 110

Tyr Glu Glu Pro Leu Gly Asp Leu Gln Thr Ile Thr Ser Leu Lys Phe
 115 120 125

Gly Asn Thr Lys Val Glu Thr Phe Tyr Pro Gly Lys Gly His Thr Glu
 130 135 140 145

Asp Asn Ile Val Val Trp Leu Pro Gln Tyr Gln Ile Leu Ala Gly Gly
 150 155 160

Cys Leu Val Lys Ser Ala Glu Ala Lys Asp Leu Gly Asn Val Ala Asp
 165 170 175

Ala Tyr Val Asn Glu Trp Ser Thr Ser Ile Glu Asn Val Leu Lys Arg
 180 185 190

Tyr Gly Asn Ile Asn Ser Val Val Pro Gly His Gly Glu Val Gly Asp
 195 200 205

Lys Gly Leu Leu Leu His Thr Leu Asp Leu Leu Lys
 210 215 220

REIVINDICACIONES

1. Una proteína metalo-beta-lactamasa modificada que tiene la fórmula general:



en donde

5 K es lisina

T es treonina

E es ácido glutámico, y

10 Δ BL es una proteína metalo-beta-lactamasa que se ha truncado en el extremo amino terminal de manera que deja cuatro cadenas beta antes de la primera hélice alfa de la estructura secundaria predicha de dicha proteína, y la secuencia E - Δ BL tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácido secuenciales 6-221 de SEQ ID NO:3.

2. Una molécula de nucleótidos aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína metalo-beta-lactamasa según la reivindicación 1.

15 3. La molécula de nucleótidos según la reivindicación 2, que comprende los nucleótidos secuenciales 94-756 de SEQ ID NO:2.

4. Un vector de expresión que contiene la molécula de nucleótidos según la reivindicación 2.

5. Una célula huésped capaz de expresar la proteína metalo-beta-lactamasa codificada por la molécula de nucleótidos según la reivindicación 2.

6. La célula huésped según la reivindicación 5, que secreta dicha proteína metalo-beta-lactamasa.

20 7. La célula huésped según la reivindicación 5 o 6, que es *Bacillus* spp, especialmente *B. licheniformis* o *B. subtilis*.

8. Una proteína metalo-beta-lactamasa modificada que tiene la fórmula general



en donde

E es ácido glutámico, y

25 Δ BL es una proteína metalo-beta-lactamasa que se ha truncado en el extremo amino terminal de manera que deja cuatro cadenas beta antes de la primera hélice alfa de la estructura secundaria predicha de dicha proteína, y la secuencia E - Δ BL tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácido secuenciales 6-221 de SEQ ID NO:3.

30 9. La proteína metalo-beta-lactamasa según la reivindicación 8, que pertenece al subgrupo B1 de metalo-beta-lactamasas.

10. La proteína metalo-beta-lactamasa según la reivindicación 9, en donde la beta-lactamasa truncada se origina a partir de *Bacillus* spp., y especialmente a partir de *B. cereus*.

11. La metalo-beta-lactamasa según la reivindicación 10, en donde E - Δ BL está derivada por la eliminación de los primeros once aminoácidos de amino terminal de una metalo-beta-lactamasa madura.

35 12. La proteína metalo-beta-lactamasa según la reivindicación 9, en donde la secuencia E - Δ BL tiene al menos 80% de identidad a la secuencia de aminoácidos de residuos de aminoácido secuenciales 6-221 de SEQ ID NO:3.

13. La proteína metalo-beta-lactamasa según la reivindicación 9, en donde la secuencia E - Δ BL es una forma truncada de una metalo-beta-lactamasa que tiene la secuencia descrita como SEQ ID NO:1, o un fragmento activo de beta-lactamasa de la misma.

40 14. La metalo-beta-lactamasa según la reivindicación 9, en donde E - Δ BL se deriva por truncado de una metalo-beta-lactamasa entre los aminoácidos KN y E.

15. Un método para preparar una proteína metalo-beta-lactamasa modificada, comprendiendo dicho método cultivar una célula huésped según la reivindicación 5 bajo condiciones que permiten la expresión de una metalo-beta-lactamasa que tiene la fórmula general:



5 en donde

K es lisina

T es treonina

E es ácido glutámico, y

10 Δ BL es una proteína metalo-beta-lactamasa que se ha truncado en el extremo amino terminal de manera que deja cuatro cadenas beta antes de la primera hélice alfa de la estructura secundaria predicha de dicha proteína, y la secuencia E - Δ BL tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácido secuenciales 6-221 de SEQ ID NO:3

y realizar la modificación postraduccional que da por resultado una metalo-beta-lactamasa modificada que tiene la fórmula general:



15

en donde B y Δ BL son como se definen anteriormente, y

opcionalmente aislar y purificar la proteína modificada de forma postraduccional obtenida.

16. El método según la reivindicación 15, en donde la proteína metalo-beta-lactamasa se expresa en una forma que comprende una secuencia de señalización, por lo que la proteína se secreta de la célula huésped.

20 17. El método según la reivindicación 15 o 16, en donde la proteína se produce en *Bacillus* spp. especialmente en *B. licheniformis* o *B. subtilis*.

18. Una composición farmacéutica que comprende la proteína metalo-beta-lactamasa modificada según la reivindicación 8.

19. La metalo-beta-lactamasa modificada según la reivindicación 8 para usar como un medicamento.

25 20. El uso de la metalo-beta-lactamasa modificada según la reivindicación 8, para la fabricación de un medicamento por eliminación de los efectos adversos inducidos por antibiótico beta-lactama en el tracto intestinal.

21. El uso según la reivindicación 20, en donde el antibiótico beta-lactama se selecciona del grupo que consiste en cefalosporinas, carbapenemas y penicilinas, cuyo antibiótico se va a eliminar en presencia o ausencia de un inhibidor contra las serina beta-lactamasas.

30

Figura 1

1 atgaaaaagaatacattattaaaattaggggtatgtgtagttaa
 M K K N T L L K L G V C V S L
 -30
 46 ctaggaataactcaatttgtagtacaatttcttctgtgaaagca
 L G I T Q F V S T I S S V K A
 -1
 91 gaacaaaagctagagcaaatagtaatcaaaaatgagacgggaacc
 E Q K L E Q I V I K N E T G T
 +1
 136 atttcaatatctcagttaaacaagaatgtatgggttcatacggag
 I S I S Q L N K N V W V H T E
 181 ttaggttattttaatggagaagcagttccttcgaacgggtctagtt
 L G Y F N G E A V P S N G L V
 226 cttaatacttctaaagggttagtacttgggttattcttctgggat
 L N T S K G L V L V D S S W D
 271 aacaaattaacgaaggaactaatagaaatggtagaaaagaattt
 N K L T K E L I E M V E K K F
 316 cagaagcgcgtaacggatgtcattattacacatgcgacagctgat
 Q K R V T D V I I T H A H A D
 361 cgaattggcgaataacagcgttgaagaaagaggcattaagcgc
 R I G G I T A L K E R G I K A
 406 catagtacagcattaaccgcagaactagcaaagaacagtggatat
 H S T A L T A E L A K N S G Y
 451 gaagagccgcttggagatttacaacaattacgagtttaaagttt
 E E P L G D L Q T I T S L K F
 496 ggcaatacaaaaagtagaaacgttctatccagggaaggacataca
 G N T K V E T F Y P G K G H T
 541 gaagataatattgttgtttggttgccacaatatcaaatttttagct
 E D N I V V W L P Q Y Q I L A
 586 ggaggctgttttagtaaaatctgcggaagctaaagatttaggaaat
 G G C L V K S A E A K D L G N
 631 gttgcggatgcgtatgtaaataatggtctacatcgattgagaat
 V A D A Y V N E W S T S I E N
 676 gtgctgaagcgatatggaaatataaattcggtagtacctgggtcat
 V L K R Y G N I N S V V P G H
 721 ggagaagtaggagacaagggtacttttacatacattggattta
 G E V G D K G L L L H T L D L
 766 ttaaaataa 774
 L K *

Figura 2

1 atgattcaaaaacgaaagcggacagtttcggtcagacttggtgctt
 M I Q K R K R T V S F R L V L
 -31
 46 atgtgcacgctggttatttgcagtttgccgattcaaaaacatca
 M C T L L F V S L P I T K T S

 91 gcgcaagcttccgaacaaaagctagagcaaataagtaatacaaaaat
 A Q A S E Q K L E Q I V I K N
 -1 +1
 136 gagacgggaaccatttcaatatctcagttaaacaagaatgtatgg
 E T G T I S I S Q L N K N V W

 181 gttcatacggagtttaggttattttaatggagaagcagttccttgc
 V H T E L G Y F N G E A V P S

 226 aacggtctagttccttaataacttctaagggttagtacttggtgat
 N G L V L N T S K G L V L V D

 271 tcttcttgggataacaaaattaacgaaggaactaatagaaatggta
 S S W D N K L T K E L I E M V

 316 gaaaagaaatttcagaagcgcgtaacggatgtcattattacacat
 E K K F Q K R V T D V I I T H

 361 gcgcaagctgatcgaattggcggataacagcgttgaaagaaaga
 A H A D R I G G I T A L K E R

 406 ggcattaagcgcgatagtagcattaaccgcagaactagcaaag
 G I K A H S T A L T A E L A K

 451 aacagtgatgatgaagagccgcttgagatttacaacaattacg
 N S G Y E E P L G D L Q T I T

 496 agtttaagtttggcaatacaaaaagtagaaacgttctatccaggg
 S L K F G N T K V E T F Y P G

 541 aaaggacatacagaagataatattggtggttggccacaatat
 K G H T E D N I V V W L P Q Y

 586 caaatcttagctggaggctggttagtaaaatctgcggaagctaaa
 Q I L A G G C L V K S A E A K

 631 gatttaggaaatggtgcggatgcgtatgtaaatgaatggtctaca
 D L G N V A D A Y V N E W S T

 676 tcgattgagaatgtgctgaagcgaatggaaatataaattcggtta
 S I E N V L K R Y G N I N S V

 721 gtacctggtcatggagaagtaggagacaagggtacttttacat
 V P G H G E V G D K G L L L H

 766 acattggatttattaaaataa 786
 T L D L L K *

Figura 3

```

atgattcaaaaacgaaagcggacagtttcgttcagacttgtgcttatg
M I Q K R K R T V S F R L V L M

tgcaogctgttatttgtcagtttgccgattacaaaaacatcagcg
C T L L F V S L P I T K T S A
-1
caagcttcctaaaacagagacgggaaccatttcaatatctcagttaaacaagaatgtatgg
Q A S K T E T G T I S I S Q L N K N V W
+1
gttcatacggagtttaggttattttaatggagaagcagttccttcgaacgggtctagttctt
V H T E L G Y F N G E A V P S N G L V L

aatacttctaagggttagtacttgttgattcttcttgggatacaaatcaacgaaggaa
N T S K G L V L V D S S W D N K L T K E

ctaatagaaatggtagaaaagaaatttcagaagcgcgtaacggatgtcattattacacat
L I E M V E K K F Q K R V T D V I I T H

ggcacgctgatcgaattggcgggaataacagcgttgaaagaaagaggcattaaagcgcacat
A H A D R I G G I T A L K E R G I K A H

agtacagcattaaccgcagaactagcaaaagaacagtggtatgaagagccgcttggagat
S T A L T A E L A K N S G Y E E P L G D

ttacaaacaattacgagtttaaagtttgcaatacaaaagtagaaacgttctatccaggg
L Q T I T S L K F G N T K V E T F Y P G

aaaggacatacagaagataatattgttgtttggttgccacaatatcaaatttttagctgga
K G H T E D N I V V W L P Q Y Q I L A G

ggctgttttagtaaaatctgcggaagctaaagatttaggaaatgttgcggatgcgatgta
G C L V K S A E A K D L G N V A D A Y V

aatgaatggtctacatcgattgagaatgtgctgaagcgatggaatataaattcggtta
N E W S T S I E N V L K R Y G N I N S V

gtacctggtcatggagaagtaggagacaagggattacttttacatacattggatttatta
V P G H G E V G D K G L L L H T L D L L

aaataa
K *

```