

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 852**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2007 E 07794592 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2037946**

54 Título: **Actividades antimicrobianas derivadas de fagos**

30 Prioridad:

05.05.2006 US 797885 P
30.03.2007 US 909340 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2015

73 Titular/es:

GANGAGEN, INC. (100.0%)
6167 Jarvis Ave., No. 324
Newark, CA 94560, US

72 Inventor/es:

PADMANABHAN, SRIRAM;
PAUL, VIVEK DANIEL;
SARAVANAN, R. SANJEEV y
SRIRAM, BHARATHI

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 536 852 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

Actividades antimicrobianas derivadas de fagos

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona métodos y composiciones para reducir el crecimiento de colonias microbianas, incluyendo infecciones, e incluye composiciones terapéuticas, métodos para el tratamiento de infecciones y métodos para identificar otras composiciones de este tipo.

10

Antecedentes de la invención

Las bacterias son ubicuas y se encuentran en casi todos los ambientes habitables. Son frecuentes y diversas ecológicamente y encuentran nichos inusuales y frecuentes para su supervivencia. Están presentes en el ambiente y están presentes en el suelo, el polvo, el agua y en prácticamente todas las superficies. Muchas son cepas normales y beneficiosas, que proporcionan una relación sinérgica con los huéspedes. Otras no son tan beneficiosas o causan problemas además de beneficios.

15

Las bacterias patógenas pueden producir enfermedades infecciosas en seres humanos, en otros animales y también en plantas. Algunas bacterias solo pueden hacer enfermar a determinados huéspedes; otras causan problemas en una serie de huéspedes, depende de la especificidad por el huésped de la bacteria. Las enfermedades causadas por las bacterias son casi tan diversas como las propias bacterias e incluyen intoxicación alimentaria, caries dental, ántrax, enfermedades infecciosas generales e incluso determinadas formas de cáncer. Estas normalmente son el sujeto del campo de la microbiología clínica.

20

25

Las bacterias son destruidas en la naturaleza por virus específicos de bacterias, por ejemplo bacteriófagos, o fagos. Muchos fagos que se encuentran en la naturaleza pertenecen al grupo de los Caudovirales, o fagos "con cola". Estos virus tienen, invariablemente, un único genoma de ADN bicatenario empaquetado en una cápside proteínica. El fago consiste en tres estructuras fundamentales: La cabeza, que, en general, tiene una simetría icosaédrica, una estructura de cola que surge a partir de un vértice de la cabeza icosaédrica y 4-6 fibras de cola unidas a alguna parte de la cola. Cabe destacar que el orden Caudovirales contiene tres morfotipos generales. Podoviridae (podofago), Myoviridae (miofago) y Siphoviridae (sifofago). Hablando en sentido estricto, el podofago no tiene una "cola" separada morfogénicamente; es decir, la estructura de tipo cola realmente se monta como parte del ensamblaje de la cabeza o la cápside. En los miofagos y sifofagos, existen vías de morfogénesis separadas para las cabezas, las colas y las fibras de la cola; en última instancia, las tres se unen para formar viriones infecciosos completos. En los podofagos, existe una vía para la cabeza y una vía para las fibras de la cola. Desde una perspectiva funcional, la estructura de tipo cola de los podofagos hace la misma función que las colas genuinas de los otros dos morfotipos.

30

35

40

Los fagos destruyen a las células mediante infección, replicación y, después, lisis de la célula huésped, liberando muchos viriones como progenie en el proceso. Determinados elementos derivados de fagos también pueden destruir células. Por ejemplo, muchas cepas de *Pseudomonas* producen piocinas, componentes proteínicos que destruyen otras cepas de *Pseudomonas*. En general, el término "bacteriocina" se usa para describir compuestos producidos por bacterias que destruyen otras bacterias; se conocen bacteriocinas de una amplia variedad de estructura química, desde moléculas pequeñas a polipéptidos. No obstante, se ha descubierto que muchas de las piocinas son "colas sin cabeza", es decir colas de fago producidas sin cabezas o ADN. Estas bacteriocinas de tipo cola destruyen a las bacterias adsorbiéndolas y causando una lesión fatal en la cubierta celular, aunque al carecer de ADN, no existe replicación ni lisis del huésped. Desde el descubrimiento original de las piocinas en *Pseudomonas*, se han identificado bacteriocinas de tipo cola similares en una amplia variedad de otras bacterias, incluyendo especies tanto grampositivas como gramnegativas. Véase, por ejemplo, Nakayama, et al. (2000) Mol. Microbiol. 38:213 - 31; Traub, et al. (1996) Zentralbl. Bakteriologie. 284:124 - 35; Ito, et al. (1986) J. Virol. 59:103 - 111; Rocourt (1986) Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiol. Hyg. 261:12 - 28; Shinomiya (1984) J. Virol. 49:310 - 14; Ishii, et al. (1965) J. Mol. Biol. 13:428 - 431; Daw y Falkner (1996) Micron. 27:467 - 479; Strauch, et al. (2001) Appl. Environ. Microbiol. 67:5635 - 5642; y Abdelhamid, et al. (2002) Appl. Environ. Microbiol. 68:5704 - 5710. Además, se han descrito otros elementos bactericidas derivados de fagos. Por ejemplo, los Caudovirales codifican una endolisina como parte de las funciones de lisis de la célula huésped. Estas enzimas degradan la pared de la célula huésped, lo que conduce a la lisis y liberación de los viriones progenie. Se ha demostrado que las endolisinas del fago añadidas exógenamente a los cultivos y suspensiones de bacterias pueden lisar y destruir una serie de bacterias grampositivas. Véase, por ejemplo, Fischetti, et al. (2005), solicitud de patente de EE.UU. 20050208038, que describen el uso de endolisinas de fagos para destruir bacterias y Takac y Blasi (2005) Antimicrob. Agents and Chemother. 49:2934 - 2940.

45

50

55

60

Otras divulgaciones que se refieren a proteínas de fagos incluyen Sheehan et al. (1996) FEMS Microbiol. Lett. 140,23 - 28; Croux et al. (1993) Mol. Microbiol. 9, 1019 - 1025; Lopez et al. (2004) Drug Disc. Today 1.469 - 474; Borysowski et al. (Apr. 2006) Exp. Biol. Med. 231, 366 - 377; Donovan et al. (Apr. 2006) Appl. Environ. Microbiol. 72, 2988 - 2996; documento WO 2008/001342; Sanz et al. (1996) Eur. J. Biochem. 235, 601 - 605; Kwan et al. (2005) PNAS USA 102, 5174 - 5179; Uniprot database entry:Q8CNS6; Bateman et al. (2003) Trends Biochem. Sci. 28, 234

65

- 237. Documentos US 2005/208038, US 2002/006406, US 2005/214773, US 2002/086020, O'Flaherty (2004) J. Bact. 186, 2862 - 2871; y Saba et al. (1996) EMBO J. 15.4789 - 4797.

5 Determinadas bacterias son normalmente inocuas pero se convierten en patógenas tras la presentación de la oportunidad adecuada o se hacen problemáticas tras la introducción en un lugar o ubicación anormal. Personas que carecen de sistemas inmunitarios eficaces son más vulnerables y determinadas bacterias usan huéspedes débiles susceptibles para proporcionar un entorno temporal para proliferar y dispersarse por la población.

10 Estadísticamente, las enfermedades infecciosas son un problema médico importante. Véase, por ejemplo, Watstein y Jovanovic (2003) Statistical Handbook on infectious Diseases Greenwood, ISBN: 1573563757. En EE.UU., aproximadamente 40 – 70 mil muertes anuales son el resultado de infecciones en la circulación sanguínea nosocomiales (que se producen en el hospital).

15 Los antibióticos han revolucionado la medicina clínica en la última mitad de siglo. Desde el descubrimiento original del fenómeno antibiótico, el mecanismo de acción y el desarrollo de esta clase de importantes entidades terapéuticas han realizado enormes progresos. Véase, por ejemplo, Therrien y Levesque (2000) FEMS Microbiol Rev. 24:251 - 62; Durgess (1999) Chest 115(3 Suppl):19S-23S; Medeiros (1997) Clin. Infect. Dis. 24(Suppl 1):S19 - 45; Jones (1996) Am. J. Med. 100(6A):3S-12S; Ford y Hait (1993) Cytotechnology 12:171 - 212; y Liu (1992) Compr Ther. 18:35 - 42. En 2002, los antibióticos han tenido unas ventas de aproximadamente 32 billones de dólares americanos en todo el mundo.

25 La amplia aparición de bacterias resistentes a antibióticos ha subrayado la vulnerabilidad de los tratamientos antimicrobianos actuales a la adaptación bacteriana. Véase, por ejemplo, Walsh (1992) Antibiotics: Actions, Origins, Resistance Amer. Soc. Microbiol., ISBN: 1555812546; Cunha (1992) Antibiotic Essentials Physicians Press, ISBN: 1890114413; Amyes (2003) Magic Bullets, Lost Horizons: The Rise and Fall of Antibiotics Taylor & Francis, ISBN: 0415272033; Axelsen (2001) Essentials of Antimicrobial Pharmacology: A Guide to Fundamentals for Practice Humana Press, ISBN: 0896038424; y Mainous y Pomeroy (eds. 2001) Management of Antimicrobials in Infectious Diseases: Impact of Antibiotic Resistance Humana Press, ISBN: 0896038211. No obstante, muchos antibióticos clásicos requieren una rápida replicación o crecimiento de las bacterias diana para ser eficaces.

30 Por tanto, métodos mejorados para disminuir el crecimiento de las bacterias diana o la supervivencia o la patogenicidad bacteriana limitante encontrarán gran utilidad. Esta utilidad puede ser aplicable a la colonización ambiental, local, tópica o particularmente *in vivo*. La presente invención aborda estos y otros problemas importantes.

35 **Breve resumen de la invención**

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de las actividades de degradación de la pared celular codificadas por el fago, por ejemplo enzimas de degradación de la mureína (habitualmente denominadas "muralíticas"), que normalmente son el núcleo de las funciones de lisis del fago para salir de la célula huésped, también se encuentran como componentes estructurales del virión del fago y ayudan al fago a entrar en una célula huésped. Estas actividades, designadas en el presente documento TAME (enzimas de degradación de la mureína asociadas a la cola), tienen actividad bactericida intrínseca, con independencia de la vía de replicación del fago. Se piensa que cada partícula de fago de los tres morfotipos tiene una TAME asociada con la estructura de la cola o, en el caso del podofago, asociada como componente minoritario de la cabeza o la cápside. Se piensa que la degradación local de la pared celular facilita el proceso de inyección del ADN. En el presente documento se describe una TAME de fago concreta, ORF56, el producto de *orf56* del miovirus K estafilocócico. En particular, se ha descubierto que la ORF56 purificada, no reconocida hasta ahora como agente "lítico", tiene actividad bactericida. Además, se han identificado polipéptidos bactericidas derivados de ORF56 mediante truncamiento. La actividad bactericida se puede someter a detección selectiva en fuentes similares o relacionadas, por ejemplo, fuentes de estructuras y dominios similares de varias fuentes de diversa evolución, para encontrar actividades bactericidas adicionales que posean propiedades beneficiosas. Dichas fuentes también pueden ser puntos de partida para la mutagénesis y detección selectiva de propiedades beneficiosas adicionales, por ejemplo estabilidad, eficiencia bactericida, tamaño, especificidad de sustrato y similares. Lo más importante es que la actividad bactericida sólida, significativamente (por ejemplo, órdenes de magnitud o múltiples factores) más eficiente que la hallada para la TAME ORF56 purificada o sus derivados mediante truncamiento, se encuentra para una quimera que consiste en el dominio catalítico de degradación de la mureína de ORF56 y el dominio de unión a la pared celular (CBD) no catalítico de la bacteriocina estafilocócica, lisostafina. Estas quimeras TAME-CBD son mucho más eficientes en términos de actividad bactericida que las TAME purificadas. Además, se demuestra que la proteína química TAME-CBD persiste en un estado eficaz (por ejemplo, conserva la estabilidad enzimática) en términos de actividades bactericidas, en una serie de mezclas de formulación útiles. Se proporcionan las proteínas purificadas basadas en ellas y las secuencias de ácido nucleico que las codifican, junto con anticuerpos frente a ellas. Se proporcionan métodos para usar dichas composiciones, incluyendo métodos para reducir el crecimiento o la presencia de la bacteria diana.

65 La presente invención proporciona un polipéptido quimérico que comprende (i) un dominio muralítico (MD) que tiene una identidad de al menos un 90 % con los aminoácidos 669 - 808 de la SEC ID N° 1; y (ii) un dominio de unión

celular (CBD) heterólogo que se une a una bacteria diana, teniendo dicho polipéptido quimérico actividad bactericida.

5 La invención también proporciona un polipéptido quimérico que comprende (i) un dominio muralítico (DM) que tiene una identidad de al menos un 90 % con los aminoácidos 669 - 808 de la SEC ID N° 1; y (ii) un dominio de unión a la pared celular de *S. aureus*, teniendo dicho polipéptido quimérico actividad de degradación de mureína de *Staphylococcus*.

10 También se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican polipéptidos de la invención, ya que son vectores de expresión que comprenden dichos ácidos nucleicos.

La invención proporciona además un polipéptido de la invención como se define en las reivindicaciones para su uso en un método de tratamiento de una infección bacteriana en un sujeto que necesite dicho tratamiento.

15 La invención también proporciona un método *in vitro* de degradación de una pared celular de una bacteria, comprendiendo el método poner en contacto la pared celular con el polipéptido de la invención como se define en las reivindicaciones. La invención también proporciona un método de desinfectar una superficie, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto la superficie con el polipéptido de la invención como se define en las reivindicaciones.

20 La invención proporciona adicionalmente métodos, como se describe, en los que: La bacteria pertenece al género *Staphylococcus*; y específicamente es *S. aureus*, *S. epidermidis* y otros estafilococos de importancia clínica. Cuando la invención se refiere al uso de polipéptidos en un método de tratamiento, el tratamiento puede ser *in vivo* o al ambiente de una superficie mucosa o de otros órganos o en un dispositivo médico o implante; los polipéptidos pueden introducirse tópicamente, sistémicamente, parenteralmente o mediante inhalación; se puede usar otro tratamiento antimicrobiano, incluyendo un antibiótico o producto derivado de fago; o dicha actividad bactericida puede tener una amplia especificidad por la diana en múltiples cepas bacterianas y/o en múltiples especies bacterianas.

30 Otras proteínas de fagos descritas en el presente documento incluyen:

35 YP_238566 (ORF007 (fago Twort de *Staphylococcus*)), YP_406405 (gp29 (bacteriófago P100 de *Listeria*)), NP_765044 (proteína de tipo SsaA de antígeno secretor (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228)), YP_164769 (orf134 (bacteriófago LP65 de *Lactobacillus plantarum*)), YP_492702 (proteína del complejo de transferencia TraG (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* USA300)), AAA71958 (putativo (*Staphylococcus aureus*)), NP_765786 (N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228)), YP_189676 (proteína relacionada con SsaA precursora del antígeno secretor (*Staphylococcus epidermidis* RP62A)), YP_189814 (N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (*Staphylococcus epidermidis* RP62A)), y otras fuentes designadas que se describen adicionalmente más adelante. Otra fuente es el fago phi11 ORF49, una supuesta hidrolasa de la pared celular (NP_803302; GenelD:1258067).

45 En el presente documento se describen diversos métodos para la detección selectiva de una actividad bactericida derivada de fago sobre una bacteria diana, comprendiendo dicho método: fragmentar un fago fuente en fragmentos estructurales separables; determinar qué fragmentos conservan afinidad de unión para dicha bacteria diana; y analizar dichos fragmentos según la actividad bactericida; identificar de este modo estructuras que poseen dicha actividad bactericida. Esto también incluye realizaciones en las que los datos del método se comunican en una jurisdicción de EE.UU. En determinadas realizaciones, la bacteria diana es una bacteria grampositiva o la actividad bactericida es una actividad muralítica.

50 En el presente documento se describen más métodos, incluyendo uno para generar actividades bactericidas variantes, comprendiendo el método mutageneizar un gen que codifica un polipéptido caracterizado por que exhibe actividad de degradación de la pared celular y detectar variantes con actividad bactericida modificada. También abarcaría comunicar los datos de dicho método. Otros métodos incluyen el descrito pero evaluando la actividad bactericida modificada, por ejemplo un número diferente de recambio del sustrato, o un cambio en la sensibilidad de las propiedades enzimáticas a las condiciones de la reacción, incluyendo la temperatura, la sal, el pH, la hidratación o similares.

60 En el presente documento se describe un método de tratar una infección bacteriana en un animal, comprendiendo el método administrar a dicho animal uno o más polipéptidos bactericidas, en el que al menos dos de dichos polipéptidos derivan de diferentes genes de degradación de la pared celular; los polipéptidos bactericidas tienen una amplia actividad bactericida de la diana; las proteínas bactericidas son "líticas" cuando se aplican al exterior de la célula; o la actividad bactericida es de degradación de mureína, o muralítica, que incluye proteínas con actividades mureína glicosidasa (incluyendo glucosaminidasa y muraminidasa), transglicolasa, lisozima, amidasa o endopeptidasa.

65

- En el presente documento se describe un polipéptido ORF56 u ORF49 que tiene actividad bactericida contra una bacteria diana y que, como mínimo, incluye una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 80 %, 90 % o 95 % con los residuos de aminoácidos 620 - 808 de la SEC ID N° 1 o los residuos 481 - 618 de la SEC ID N° 3.
- 5 En una realización, la proteína ORF56 incluye la secuencia exacta de los residuos de aminoácidos 620 - 808 de la SEC ID N° 1 o la proteína ORF49 incluye la secuencia exacta de los residuos de aminoácidos 481 - 618 de la SEC ID N° 3. En una realización adicional, la invención proporciona una composición que consiste esencialmente en un polipéptido ORF56 que tiene actividad bactericida contra una bacteria diana y que, como mínimo, incluye una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 80 %, 90 % o 95 % con los residuos de aminoácidos 620 - 808 de la SEC ID N° 1 o los residuos 481 - 618 de la SEC ID N° 3.
- 10 En el presente documento se describe una composición, por ejemplo una composición farmacéutica, un reactivo de diagnóstico o una composición bactericida que incluye un polipéptido ORF56 u ORF49 que tiene actividad bactericida contra una bacteria diana y que incluye una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 80 %, 90 % o 95 % con, como mínimo, los residuos de aminoácidos 620 - 808 de la SEC ID N° 1 o los residuos 481 - 618 de la SEC ID N° 3. La composición puede incluir al menos otra proteína con actividad bactericida, por ejemplo una proteína p16 del fago p68 o una "enzima lítica" de tipo Pal. La composición también puede incluir otros ingredientes con actividad bacteriostática o bactericida, por ejemplo un antibiótico.
- 15 Los polipéptidos ORF56 u ORF49 divulgados se pueden usar para prevenir el crecimiento de una bacteria diana que es una especie de *Staphylococcus* y, en particular, una especie de *Staphylococcus* resistente a meticilina. En otra realización, la bacteria diana es una especie de bacteria de replicación lenta, por ejemplo una bacteria que tiene un tiempo de duplicación entre una y setenta y dos horas o más, por ejemplo de aproximadamente 2, 4, 8, 12, 20, 30, 40 o 50 horas.
- 20 Los polipéptidos ORF56 y ORF49 divulgados o una composición que incluye un polipéptido ORF56 u ORF49 se pueden usar para, por ejemplo, degradar enzimáticamente una pared de célula bacteriana.
- En el presente documento se describe un método para tratar una infección bacteriana en un sujeto administrando a al sujeto un polipéptido ORF56 o ORF49 o una composición que incluye un polipéptido ORF56 o ORF49. El sujeto puede ser, por ejemplo, un mamífero, un primate, un ser humano, un animal de granja, un animal de compañía, un ser humano, una especie de ave, una vaca, un caballo, una cabra, un gato, una oveja, un roedor, un perro, un cerdo, un pollo, un pato, una codorniz o un ganso. Los animales para espectáculos, por ejemplo elefantes, leones, tigres, cebras, ballenas, delfines, osos, también pueden tratarse usando las composiciones de la presente invención.
- 30 En varias realizaciones, el sujeto es una vaca y la infección bacteriana es mastitis bovina; el sujeto es un ser humano y la infección bacteriana está causada por una especie de *Staphylococcus* resistente a meticilina; o el sujeto es una especie de ave y la infección bacteriana está en la piel o las plumas.
- En el presente documento se describe un método de detectar una bacteria o identificar una enfermedad causada por una bacteria poniendo en contacto la bacteria con un polipéptido ORF56 u ORF49 y detectando la unión del polipéptido ORF56 u ORF49 a la bacteria. En una realización preferida, el polipéptido ORF56 u ORF49 está marcado de forma detectable.
- 40 En el presente documento se describe un método de desinfectar una superficie poniendo en contacto la superficie con un ORF56 u ORF49 o una composición que incluye un polipéptido ORF56 u ORF49. El método de desinfección se puede usar para reducir o eliminar todas las bacterias sobre la superficie o una pluralidad o una especie bacteriana o cepa concreta, por ejemplo una especie de *Staphylococcus*.
- 45 En el presente documento se describe un polipéptido sustancialmente puro o aislado caracterizado por al menos una de las propiedades siguientes: que comprende una identidad de al menos aproximadamente un 85 % sobre un segmento de al menos 17 aminoácidos con los residuos 1 - 808, 297 - 808, 363 - 808, 603 - 808, 620 - 808 o 691 - 805 de ORF56; que comprende una identidad de al menos aproximadamente un 90 % sobre un segmento de al menos 24 aminoácidos con los residuos 691 - 805 de ORF56; o que comprende una pluralidad de segmentos distintos de una identidad de al menos aproximadamente un 85 % con ORF56, en el que los segmentos no se solapan. Algunas propiedades adicionales incluyen, por ejemplo, distintos segmentos adicionales de una identidad de al menos aproximadamente un 75 % sobre al menos 17 aminoácidos con los residuos 691 - 805 de ORF56; distintos segmentos adicionales de al menos 17 aminoácidos que exhiben una identidad de al menos aproximadamente un 65 % sobre ORF56; al menos un 30 % de actividad de degradación de la pared celular de ORF56 de longitud completa o nativa ORF56; una actividad muralítica en una cepa bacteriana de *Staphylococcus* de al menos aproximadamente un 50 % de ORF56; otra secuencia polipeptídica o dominio funcional, por ejemplo una secuencia señal; o un marcador detectable; comprende al menos los residuos 690 a 769 de ORF56; es una ORF56 de longitud completa; corresponda a 1 - 808, 297 - 808, 363 - 808, Met-603 - 808, o 620 - 808 de ORF56; comprende un dominio CHAP; carece sustancialmente de otras proteínas de fago; carece sustancialmente de otros materiales proteináceos; se combina con otro agente antimicrobiano, incluido un antibiótico; se mezcla con un excipiente farmacéutico; está en una composición tamponada o estéril; exhibe una actividad degradante de la pared celular bacteriana seleccionada de actividad muralítica, glucosamidasas, amidasa o endopeptidasa; exhibe actividad
- 50
- 55
- 60
- 65

bactericida en muchas cepas de bacterias grampositivas; exhibe actividad bactericida en una cepa bacteriana de *Staphylococcus*; o exhibe actividad bactericida sobre una o más cepas descritas como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. lentis*, *S. simulans* y *S. carnosus*.

5 En el presente documento se describe un vector de expresión que expresa un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica un polipéptido ORF56 u ORF49 o un truncamiento de un polipéptido ORF56 divulgado en el presente documento. En el presente documento se describe una célula huésped que contiene el vector de expresión de ORF56. Una célula huésped puede ser, por ejemplo, una célula eucariota o procarionta que se usa para producir un polipéptido o ácido nucleico de ORF56.

10 En el presente documento se describe un polipéptido ORF56 puro o aislado que tiene un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo que se une de forma selectiva a un componente de la pared celular. Este polipéptido ORF56 puede estar, por ejemplo, unido a un marcador detectable o proporcionarse como parte de un kit con instrucciones que se usa para evaluar la presencia de bacterias diana.

15 En el presente documento se describe un método de degradar enzimáticamente la pared celular de una bacteria diana exponiendo dicha pared celular a un polipéptido ORF56 u ORF49. Esta etapa del método se puede, por ejemplo, incorporar en un diagnóstico para determinar la sensibilidad bacteriana, lo que tiene como resultado una disminución de al menos aproximadamente 5 veces de la población bacteriana sensible en una superficie de trabajo o de mobiliario; introducir el polipéptido ORF56 u ORF49 en un animal y tiene como resultado una disminución de al menos 5 veces la población bacteriana sensible en una localización seleccionada en o sobre dicho animal; administrar dicho polipéptido a una superficie o compartimento de animal; ser un medio para generar bacterias muertas o de replicación incompetente que se pueden inocular en un individuo; o usarse para tratar una infección en la piel, la mucosa, las vías urinarias, las vías respiratorias, la cavidad nasal, el tracto gastrointestinal u otra infección bacteriana. En otras realizaciones, la disminución de la población bacteriana sensible es de, por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 7 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 25 veces, 50 veces o 100 veces, o incluso más.

30 En el presente documento se describe una proteína ORF56 truncada recombinante de SEC ID N° 1, en la que de 1 a 620 aminoácidos se truncan de los extremos amino de la proteína ORF56 o en la que de 1 a 3 aminoácidos se truncan del extremo carboxi la proteína ORF56 y en la que la proteína ORF56 tiene actividad de degradación de la pared celular bacteriana. La proteína ORF56 restante puede tener una identidad de aproximadamente 80 %, 90 % o 95 % con la correspondiente secuencia de aminoácidos en la SEC ID N° 1.

35 En el presente documento se describe un polipéptido sustancialmente puro o recombinante que exhibe actividad biológica de degradación de la mureína de la cepa *Staphylococcus*, comprendiendo el polipéptido un segmento de enzima de degradación de mureína (TAME) asociado a la cola de un fago que infecta *S. aureus*; y un dominio de unión a la pared celular de *S. aureus* heterólogo.

40 En determinados aspectos, el polipéptido tiene un peso molecular de estructura proteica de menos de aproximadamente 400 kDa, aproximadamente 250 kDa; o aproximadamente 100 kDa; o el polipéptido exhibe una actividad peptidasa, amidasa o hidrolasa sobre una mureína de *S. aureus*; o el polipéptido es de la cola de un fago Caudovirales, por ejemplo un fago mioviridae, podoviridae o sifoviridae. En otras realizaciones, el segmento de enzima de degradación de la mureína procede del fago K ORF56, el fago phi11 ORF49 o un fago derivado de un MRSA. En otras varias realizaciones, el dominio de unión a la pared celular es de una proteína bacteriana de *Staphylococcus*, por ejemplo una lisostafina o una proteína de la cola del fago; o comprende: Un segmento SH3 bacteriano; secuencia de ORF56, lisostafina de *S. simulans* o amidasa del fago L54a; o cualquier construcción del dominio de unión a la pared celular que multiplica la actividad de degradación de mureína del polipéptido por al menos 30 en comparación con un polipéptido comparable que carece de la función del dominio de unión.

50 En un aspecto, el polipéptido comprende la SEC ID N° 4.

En el presente documento también se describen composiciones farmacéuticas, por ejemplo en las que el polipéptido está en crema o gel o está en un recipiente de una sola dosis, por ejemplo que contiene al menos 10 nanogramos de polipéptido. Dichas composiciones pueden estar en una formulación de liberación controlada; aplicarse a un implante, catéter o dispositivo médico, o estar en una formulación estéril o tamponada.

60 En otras realizaciones preferidas, la composición funciona sobre una cepa de *Staphylococcus* que se encuentra en un compartimento nasal o que produce mastitis o que infecta quemaduras o heridas producidas por punción o que es resistente a meticilina o que es resistente a vancomicina. En otra realización preferida, los vendajes, gasas o similares usados para cubrir heridas se impregnan con un polipéptido TAME o una proteína quimérica que comprende un polipéptido TAME para minimizar la probabilidad de infección bacteriana. En una realización adicional, la herida es una herida producida por punción o una quemadura. En todavía otra realización, el individuo con la herida tiene un sistema inmunológico comprometido, por ejemplo a causa de una infección por VIH, un trasplante de órgano y tratamientos relacionados, trasplante de células madre o de médula ósea, o quimioterapia.

65 Los polipéptidos TAME y las proteínas quiméricas que comprenden un polipéptido TAME también se pueden usar para tratar órganos o productos sanguíneos antes de su trasplante en un receptor.

En el presente documento se describen métodos de tratar cultivos bacterianos, comprendiendo el método poner en contacto dicho cultivo con un polipéptido quimérico descrito. Normalmente, el contacto disminuye la velocidad de crecimiento de dicho cultivo al menos aproximadamente 50 veces; o también se usa otra terapia antimicrobiana; o el método usa un cóctel de polipéptidos dirigidos a diferentes cepas de bacterias. Preferentemente, el tratamiento disminuye la velocidad de crecimiento de las bacterias diana sensibles en al menos aproximadamente un 30 %; el polipéptido se administra con una estequiometría de al menos aproximadamente diez polipéptidos por cada bacteria diana o de al menos aproximadamente 500 ng/ml; o el contacto de administración continúa durante menos de aproximadamente 7 días. Como alternativa, el cultivo comprende una cepa estafilocócica, una bacteria grampositiva o es una infección, o el cultivo puede comprender células o tejidos de mamífero.

En el presente documento se describe un ácido nucleico que codifica los polipéptidos, aunque los polipéptidos se pueden generar mediante métodos de proteínas sintéticas. Y se proporciona una célula que comprende el ácido nucleico.

En el presente documento se describen polipéptidos equivalentes o relacionados derivados de fusiones de la secuencia del polipéptido TAME o un segmento de la secuencia TAME que contiene un dominio muralítico con un segmento de otro polipéptido que constituye un dominio de unión a la pared celular (CBD). Estas construcciones quiméricas se designarán TAME-CBD. El, por ejemplo, polipéptido sustancialmente puro o recombinante que exhibe actividad biológica de degradación de mureína de cepas grampositivas, cuando el polipéptido comprende una secuencia modificada, por ejemplo mutageneizada, de un segmento de enzima de degradación de mureína asociada a la cola (TAME) de un fago infeccioso grampositivo; y/o un dominio de unión a la pared celular de grampositivos heterólogo modificado, por ejemplo, mutageneizado. En estos casos, "mutageneizado" es, principalmente, una forma de TAME en la que regiones de la proteína TAME completa se han delecionado, con el efecto de aumentar la actividad enzimática bactericida, la solubilidad proteica y/o la estabilidad de la proteína en comparación con la TAME de longitud completa.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 proporciona una tabla de dominios conservados de TAME identificados en los fagos que infectan bacterias de *Staphylococcus*. Se han identificado los dominios muralíticos (MD) y se denominan CD de TAME en la tabla.

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

En el presente estudio se ha identificado una entidad hasta ahora no identificada, el fago K ORF56, que actualmente se ha demostrado que exhibe actividad bactericida. Es un componente de un determinado fago mioviridae como componente estructural del virión con actividad muralítica. El sitio catalítico se localizó en la parte del extremo C de la proteína y exhibe un dominio de aminohidrolasa/peptidasa dependiente de cisteína-histidina (CHAP). Véase, por ejemplo, Rigden, et al. (2003) Trends Biochem. Sci. 28:230 - 234. Mientras que el dominio CHAP se encuentra en las regiones del N-terminal de varios genes, en algunos genes el dominio CHAP se encuentra en los segmentos proximales en C de las regiones de codificación. Parte de la invención es la comprensión de una relación entre la caracterización de la "actividad de degradación de la pared celular" asignada a las proteínas del fago y la capacidad para convertir la actividad de degradación desde una función "lítica", que se evalúa en condiciones artificiales, en una función bactericida en condiciones no artificiales de circunstancias de crecimiento bacteriano típicas. Estas "actividades de degradación" son, probablemente, nuevas fuentes de actividades bactericidas no reconocidas para su uso en condiciones terapéuticas y pueden incluir actividades muraminidasa, glucosaminidasa, amidasa o endopeptidasa. Esta actividad se puede identificar, aislar, y se ha demostrado, en varias construcciones de proteínas solubles purificadas de ejemplo, que tienen actividad bactericida sobre las bacterias diana, fuera del contexto de las estructuras de los fagos analizados en condiciones de ensayo altamente artificiales. Además, las construcciones recombinantes que comprenden dichas actividades tienen propiedades ventajosas significativas como composiciones y formulaciones antimicrobianas.

De un modo similar, el fago sifoviridae phi11 tiene una actividad de degradación de mureína (TAME) reconocida en parte por su patrón de estructura génica.

Este presente estudio muestra que la "ORF56 hipotetizada" del fago K de *Staphylococcus* tiene actividad muralítica y, además, que el producto proteico recombinante parece estar procesado a una proteína de 23 kDa desde un producto de traducción "putativo" codificado de 91 kDa. La exposición de varias cepas de bacterias de *Staphylococcus* al producto de 23 kDa indica actividad bactericida. Las construcciones de truncamiento indican que la actividad bactericida está codificada en la región proximal en C del producto de traducción proteico.

Los presentes estudios indican que un producto proteico de 23 kDa que se genera a partir de ORF56 posee un dominio CHAP. Adicionalmente, una forma truncada de 16 kDa del producto proteico de 23 kDa que abarca la región proximal en C y el dominio CHAP también es bactericida. Basándose en las búsquedas de homología de secuencia

se han identificado otras estructuras similares que son potenciales fuentes alternativas para actividades bactericidas. Aunque puede haber diferentes actividades muralíticas, el alcance de las sensibilidades bacterianas generalmente no está estudiado. Por tanto, varias de estas nuevas actividades pueden tener actividades antibacterianas diana relativamente amplias. Además, los pequeños tamaños de los polipéptidos que exhiben estas actividades los hacen
 5 eficientes para la producción y accesibilidad dentro de un cuerpo o para componentes diana de la pared celular relevantes, por ejemplo peptidoglicanos.

Recientemente, la terapia con fagos ha recibido renovada atención como alternativa a la prevención y/o tratamiento de infecciones bacterianas. Véase Merri1, et al. (2003) Nat. Rev. Drug Discov. 2:489 - 497; y Sulakvelidze, et al.
 10 (2001) Antimicrob. Agents Chemother. 45:649 - 659. Como alternativa, las endolisinas codificadas por fagos se han propuesto como agentes eficaces para el control de las enfermedades infecciosas causadas por bacterias grampositivas (Fischetti (2003) Ann. N. Y. Acad. Sci. 987:207 - 214). Un artículo reciente sobre endolisinas de fagos mostró ausencia de especificidad de las endolisinas de fagos de *Enterococcus* que actúan sobre *Streptococcus* y *Staphylococcus* distintos a *Enterococcus* (Yoong et al (2004) J. Bact. 186:4808 - 4812).

Estos marcadores muralíticos o de degradación de la pared celular asignados a componentes de fagos se encuentran en muchos tipos de fagos, incluyendo las clases mioviridae, podoviridae y sifoviridae.

Los solicitantes han trabajado con estas actividades de degradación de la pared celular TAME analizando la actividad bactericida en condiciones artificiales aplicadas al término entidades de "lisis" y descubrieron que sus actividades específicas eran relativamente bajas. Se hizo evidente que esta limitación era intrínseca a la actividad de TAME, que tiene un papel biológico en la generación de una degradación extremadamente limitada de la pared celular, suficiente para permitir la inyección del ADN del fago pero no para producir un efecto perjudicial sobre la integridad celular. En particular, la tasa de degradación de la pared celular que conduce a un efecto sobre el
 20 crecimiento bacteriano no fue sorprendente y en la mayoría de las situaciones se descubrió que era insuficiente para su uso terapéutico comercial.

Las proteínas de fagos han evolucionado, probablemente, a resistir el duro ambiente en el exterior de las células, y a menudo fuera del cuerpo de un animal, y han evolucionado a una destrucción ineficiente de la célula huésped diana. De hecho, el ciclo de vida del fago requiere que la célula NO sea destruida en el proceso de infección, o el ciclo de vida del fago se abortaría antes de la replicación. Por tanto, las proteínas TAME son inherentemente ineficientes como elementos bactericidas.
 30

Como tales, los solicitantes han reconocido adicionalmente que mientras las enzimas de la cola del fago tienen la finalidad evolutiva de ayudar al proceso de infección, han evolucionado a NO ser eficientes en la destrucción del huésped diana. Por tanto, si las proteínas TAME fueran a ser útiles como agentes bactericidas eficientes, las proteínas TAME requerirían una modificación para ello. La presente invención proporciona mutagénesis y métodos de detección selectiva que se pueden aplicar para identificar los motivos de degradación de la pared celular que pueden dirigir los dominios catalíticos TAME a una bacteria concreta o a un sitio concreto en una bacteria. Usando ORF56 como modelo, los solicitantes fueron los primeros en reconocer que las proteínas TAME del fago se pueden convertir desde un agente bactericida marginal en un agente bactericida altamente eficiente y sólido mediante, por ejemplo, la eliminación de secuencias que parecen prevenir que el polipéptido TAME de longitud completa exhiba función bactericida alta y/o fusionar el dominio catalítico restante con un dominio de unión a la pared celular heterólogo. Como se ha indicado anteriormente, estas fusiones, o quimeras, se designan en el presente documento TAME-CBD.
 45

Las formas naturales de estas proteínas TAME de fagos tienen actividades bactericidas limitadas, como se ha descrito. Los solicitantes han descubierto que apuntar a un motivo unido al dominio de degradación de la pared afectaba con un espectacular incremento de la concentración local del sitio catalítico en el sustrato de la pared celular. Las proteínas quiméricas de bacterias específicas se pueden diseñar, por ejemplo, combinando un segmento catalítico de una proteína TAME que actúa sobre la estructura de la pared celular adecuada como se encuentran de forma natural sobre la superficie bacteriana en su contexto natural y el segmento de unión que tiene la afinidad adecuada y está dirigido a la estructura de la pared celular adecuada. La unión de un motivo dirigido a un segmento de degradación de la pared celular derivado de fagos puede proporcionar una serie de construcciones de fusión o bifuncionales para detectar actividades bacteriostáticas, bactericidas o "líticas" de la pared celular deseadas.
 50
 55

Se han seleccionado segmentos enzimáticos de degradación de la pared celular adicionales y se han realizado construcciones para demostrar el alcance de la presente invención. Por ejemplo, se han usado segmentos derivados de fagos, normalmente las estructuras de la cola, que codifican actividades enzimáticas, por ejemplo enzimas de degradación de paredes celulares. Se han aislado actividades enzimáticas de varias fuentes de fagos o bacterianas y se ha demostrado que tienen actividades similares. Existen actividades similares de estructuras basadas en fagos, por ejemplo basados en la homología de la secuencia con actividades conocidas usadas por los fagos para obtener acceso al huésped, normalmente en un proceso relacionado con la infección. Otros se pueden identificar mediante la organización génica de enzimas de infección, por ejemplo en casetes que contienen estructuras de unión/penetración en la pared de la cola del fago en genomas de fagos (véase, la ORF49 de la hidrolasa de la pared celular del fago phi11 de *S. aureus* (NP_803302), que es un "homólogo" estructural de la ORF56 en el fago K. Otros
 60
 65

ejemplos incluyen ORF004 del fago 69 de *S. aureus* (gi:66395297, YP_239591,1), la hidrolasa de la pared celular del fago PhiNM4 (gi:104641981, ABF73289,1), la hidrolasa de la pared celular de phi ETA2 (gi:122891778, YP_001004324,1), ORF004 del fago 85 de *S. aureus* (gi:66394874, YP_239746,1), y ORF004 del fago ROSA (gi:66395969, YP_240329,1). Estos dominios o motivos también pueden derivar de genomas de profagos o "fagos remanentes" que quedan en un genoma bacteriano de un genoma de fago inactivado o incompleto. Los profagos y métodos para identificarlos se divulgan en, por ejemplo, Canchaya et al., *Microbiol. Mole. Biol. Rev.* 67:238 - 276 (2003), que se incorpora en el presente documento por referencia para todos los fines. Otras actividades pueden derivar de piocinas (bacteriocinas) o estructuras relacionadas con fagos que pueden ser incapaces de proliferar como fagos normales, pero se producen o sostienen como subproductos de genomas incompletos. Por tanto, las proteínas o secuencias de codificación se pueden aislar de estructuras que representan fagos viables o derivados de los mismos. Además, cada una de estas estructuras puede servir como punto de partida para mutagénesis con el fin de optimizar actividades en las condiciones deseadas de uso, por ejemplo como se ha descrito.

II. II. Enzimas de degradación de mureína asociadas con la cola (TAMES)

Las enzimas de degradación de mureína asociadas con la cola (TAMES) se definen como enzimas muralíticas halladas en las partículas de bacteriófagos e incluyen las que digieren la pared celular bacteriana, preferentemente, de una bacteria grampositiva, pero también se pueden aplicar a las que pueden digerir material de una bacteria gramnegativa o de otro tipo. La actividad normalmente será una enzima de degradación de peptidoglicano y puede tener una o más actividades de muraminidasa, glucosaminidasa, transglicosilasa, lisozima, amidasa o endopeptidasa. La enzima puede ser capaz de degradar la pared celular y puede incluso caracterizarse como "lítica" para la célula, pero dicha caracterización lítica e en condiciones altamente artificiales, en comparación con el ambiente normal del proceso de infección del fago. Preferentemente, las enzimas derivan de estructuras de fagos, colas o equivalentes a colas en podofagos o proteínas de la cabeza interiores de podofagos, que proporcionan medios para que el material genómico del fago entre en un huésped bacteriano desde el ambiente externo; dado que estas proteínas se encuentran con mayor frecuencia en las estructuras de la cola, para los fines de esta solicitud toda la clase se denomina proteínas TAME. Un ejemplo de una proteína TAME asociada con un equivalente de la cola en podofagos es la proteína gp16 del fago T7. La proteína gp16 es una transglicosilasa que ataca al peptidoglicano. La proteína gp16 ayuda en la inyección de ADN pero está contenida dentro de la cápside y, cuando sale durante la infección, parece formar parte de la cola. Véase, por ejemplo, Molineux (1999) *The T7 family of bacteriophages*. En *Encyclopedia of Molecular Biology*. Creighton TE, ed. NY, John Wiley & Col, pp. 2495 - 2507.

Las bacterias diana normalmente serán aquellas que afectan o infectan animales, en particular primates. No obstante, ventajosamente se buscarían varias aplicaciones bacteriostáticas o bactericidas, como determinados problemas de salud. Las bacterias a menudo entrarán dentro de la clase de las grampositivas, aunque hay otras bacterias patológicas que no se clasifican claramente en una u otra clase, incluyendo micobacterias, esporas u otros procariontes. Las dianas bacterianas patogénicas o patológicas son las de mayor interés, tanto cepas grampositivas, por ejemplo especies de *Staphylococcus*, incluyendo *Staphylococcus aureus*, y especies de *Streptococcus*, así como gramnegativas. Especies diana gramnegativas particularmente importantes incluyen los géneros *Escherichia*, particularmente *coli*; *Pseudomonas*, particularmente *aeruginosa*; *Campylobacter*; *Salmonella*; *Neisseria*; *Helicobacter*; y *Vibrio*. Véase, por ejemplo, el *Merck Manual* y el *Merck Veterinary Manual*.

Los polipéptidos ORF56 divulgados en el presente documento se pueden usar en combinación con al menos otra enzima muralítica para, por ejemplo, tratar la infección por una o más cepas bacterianas. Enzimas muralíticas adicionales de ejemplo incluyen, por ejemplo, una proteína 16 del fago p68 y una enzima "lítica" de tipo Pal. Una proteína 16 de fago p68 se divulga en, por ejemplo, (Vybiral D et al (2003), *FEMs Microbiol Lett.*, 219, 275 - 283). Las enzimas "líticas" de tipo Pal se divulgan en, por ejemplo, Fischetti, et al. (2005) solicitud de patente de EE.UU. 20050208038.

Como se divulga en el presente documento, los expertos en la técnica pueden identificar las proteínas TAME mediante una combinación de análisis de secuencias y determinación de la posición del ácido nucleico codificante en un genoma del fago.

III. Definiciones

Una "actividad de degradación de la pared celular" es una actividad enzimática que degrada, descompone, desintegra o disminuye o reduce la integridad de una célula bacteriana. El término "lítico" normalmente se usa para querer decir "de degradación de la pared celular", parcialmente porque la mayoría (con determinadas excepciones) de las actividades catalíticas de degradación de la pared celular son hidrolíticas. Por tanto, gran parte de la terminología usada hace referencia a "lítico", incluso si el mecanismo lítico no implica hidrólisis. Como alternativa, la degradación de determinados sustratos definidos o artificiales puede ser un ensayo útil para la actividad "lítica" o estática (basándose en una población para la diana). "Actividad lítica de la pared celular" en un contexto de fagos normalmente es una caracterización asignada a una estructura basada en el análisis en condiciones artificiales, pero dicha caracterización puede ser específica de especies bacterianas, familias, géneros o subclases (que se pueden definir por la sensibilidad). Por tanto, una "bacteria susceptible a una actividad de degradación de la pared celular" describe una bacteria cuya pared celular se degrada, descompone, desintegra o que tiene su integridad celular

disminuida o reducida por una actividad o actividades de degradación de la pared celular concretas. Muchas otras “actividades líticas” se originan de las células bacterianas huésped y son importantes en la división celular o la liberación de fagos. Otras actividades de degradación de la pared celular derivadas de fagos se encuentran en el fago y han evolucionado para servir en varias etapas de penetración de la infección por fagos serían fisiológicamente abortivas para la replicación de los fagos si destruyen a la célula huésped antes de inyectar el ADN del fago en la célula. Las estructuras útiles en las etapas de penetración son particularmente relevantes para la presente invención en que estas actividades operan con huéspedes normales desde el exterior. En realizaciones preferidas, la actividad de degradación de la pared celular la proporciona una enzima que es una enzima no hollina y/o que es una enzima no lisina. En otras realizaciones, la actividad de unión a la célula la proporciona una enzima no hollina y/o que es una enzima no lisina.

Un “dominio de unión celular” o “CBD” normalmente es un motivo dirigido que reconoce la superficie externa de la bacteria. En las bacterias grampositivas, la superficie externa de la bacteria normalmente es la capa de mureína. Por tanto, el segmento de unión preferido para estas dianas será las entidades de la superficie celular, ya sean proteínas, lípidos, azúcares o una combinación. Los segmentos de unión de las lisozimas conocidas, las endolisinas y similares son conocidas y sus propiedades se encuentran fácilmente mediante búsquedas en PubMed o Entrez. Otras proteínas que se unen a las bacterias incluyen las PGRP que se describen más adelante, los TLR, flagelos y entidades de unión a los pelos y las proteínas de la cola del fago implicadas en el reconocimiento de la diana. En una realización preferida, el CBD se condensa con una proteína TAME o con una proteína de degradación de la pared celular, ambas como se divulga en el presente documento. En una realización preferida adicional, el CBD es un dominio heterólogo en comparación con la proteína TAM o con la proteína de degradación de la pared celular. Es decir, la proteína CBD deriva de una proteína no TAME o de una proteína que no es de degradación de la pared celular o deriva de una proteína de unión a la pared celular de un fago diferente, una bacteria u otro organismo. Por tanto, el dominio CBD heterólogo se puede usar para dirigir la proteína TAME a bacterias diana específicas o se puede usar para aumentar el intervalo diana de la proteína TAME.

Un “entorno” de una bacteria puede incluir un entorno *in vitro* o *in vivo*. Los entornos *in vitro* normalmente se encuentran en un vaso de reacción, En lagunas realizaciones usando bacterias aisladas o purificadas, pero pueden incluir esterilización de superficies, tratamiento general de equipos o alojamientos de animales o instalaciones de salud pública tales como instalaciones de aguas, sépticos o de alcantarillado. Otras condiciones *in vitro* pueden incluir poblaciones de especies mixtas, por ejemplo, que incluyan una serie de especies simbióticas o que interactúan en proximidad estrecha. Gran parte del estudio con fagos y bacterias se realiza en cultivos en los que las proporciones entre el huésped diana y el fago son artificiales y no fisiológicas. Un entorno *in vivo* es, preferentemente, un organismo huésped infectado por la bacteria. Los entornos *in vivo* incluyen órganos, tales como la vejiga urinaria, los riñones, los pulmones, el corazón y los vasos sanguíneos, el estómago, el intestino, el hígado, el cerebro o la médula espinal, órganos sensoriales tales como los ojos, los oídos, la nariz, la lengua, el páncreas, el bazo, el tiroides etc. Los entornos *in vivo* incluyen tejidos, tales como las encías, el tejido nervioso, el tejido linfático, el tejido glandular, la sangre, el esputo etc., y pueden reflejar interacciones colaboradoras entre diferentes especies cuya supervivencia puede depender de sus interacciones juntas. Los catéteres, implantes y dispositivos de monitorización o tratamiento que se introducen en el cuerpo pueden ser fuentes de infección durante el uso normal. Los entornos *in vivo* también incluyen la superficie de alimentos, por ejemplo peces, carne o materiales vegetales. Las carnes incluyen, por ejemplo, carne de vacuno, cerdo, pollo, pavo, codorniz u otras aves. Los materiales vegetales incluyen hortalizas, frutas o zumos hechos de frutas y/o de hortalizas. En algunas realizaciones, las superficies que entran en contacto con un producto alimentario infectado por bacterias se tratan con una proteína TAME o una proteína quimérica que comprende una proteína TAME, por ejemplo ORF56 u ORF49.

La “introducción” de una composición en un entorno incluye administrar un compuesto o composición y poner en contacto la bacteria con tal. La introducción de dicho compuesto o composición a menudo puede hacerlo las bacterias vivas que pueden producirlo o liberarlo.

Una “proteína de degradación de la pared celular” es una proteína que tiene una actividad de degradación detectable, por ejemplo sustancial, sobre una pared celular o componentes de la misma. La actividad “lítica” puede ser una forma o un resultado extremo de la actividad de degradación. Los polipéptidos bactericidas de ejemplo incluyen, por ejemplo, productos de ORF56 u ORF49, entidades relacionadas estructuralmente, mutantes y variantes de los mismos y otras construcciones relacionadas derivadas de las mismas o del fago twort, K, G1, o phi11. Secuencias preferidas concretas derivan de, por ejemplo, ORF005 del fago G1 de *Staph* (véase gi:66394954, YP_240921,1), de ORF007 del fago Twort de *Staph* (véase gi:66391262, YP_238566,1), o del fago P100 de *Listeria* (véase gi:82547634, YP_406405,1). Actividades de degradación similares se identificarán por su localización en las colas del fago o los puntos de contacto con el huésped diana del fago natural, restos del fago mutante (por ejemplo, piscinas o bacteriocinas) o codificados por secuencias del profago. Los segmentos preferidos derivan de, por ejemplo, ORF56 u ORF49, lisostafina (lss) de *S. simulans*, LytM peptidasa de *S. aureus*, ALE1 de *S. capitis* y otros polipéptidos murálicos de la cola del fago.

Un “polipéptido ORF56” o variante gramatical del mismo hace referencia a un bactericida o a una actividad bactericida codificada por la ORF56 del fago K de *Staphylococcus* (las características estructurales asociadas están relacionadas con gi|48696445). Los polipéptidos ORF56 variantes de ejemplo incluyen variantes polimórficas de los

polipéptidos, alelos, mutantes y homólogos entre especies que (1) tienen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de aminoácidos superior a aproximadamente el 60 %, una identidad de la secuencia de aminoácidos de aproximadamente 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, preferentemente de aproximadamente un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o superior, preferentemente sobre una o más regiones, por ejemplo de al menos aproximadamente 8, 12, 17, 25, 33, 50, 65, 80, 100, 200, o más aminoácidos, con una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico ORF56 del fago K de *Staphylococcus*, véase, por ejemplo, el número de acceso YP_024486, con una secuencia de aminoácidos de un polipéptido muralítico del fago Twort, K, o G1 de *Staph*; (2) se unen anticuerpos, por ejemplo anticuerpos policlonales, producidos contra un inmunógeno sustancialmente purificado que comprende una secuencia de aminoácidos de un fragmento activo de ORF56, y variantes de los mismos con modificaciones conservadoras; (3) hibridan específicamente en condiciones de hibridación rigurosas con una hebra antisentido correspondiente a una secuencia de ácido nucleico natural que codifica el polipéptido ORF56 y variantes del mismo con modificaciones conservadoras; (4) tienen una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de nucleótidos superior a aproximadamente 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %, preferentemente superior a aproximadamente 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o superior, preferentemente sobre una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, etc., o más nucleótidos, con el ácido nucleico que codifica ORF56 o un ácido nucleico que codifica un fragmento del mismo. Segmentos particularmente preferidos derivan del dominio CHAP. Los ácidos nucleicos y proteínas de la invención incluyen moléculas naturales o recombinantes. El polipéptido ORF56 de longitud completa y los fragmentos truncados del mismo en el extremo N, tan pequeños como de aproximadamente 16 kDa, normalmente tienen una actividad de degradación sobre los componentes de la pared celular. Los ensayos para la actividad de degradación sobre los componentes de la pared celular se pueden realizar conforme a métodos conocidos por los expertos en la técnica y como se describe en el presente documento. En realizaciones preferidas, el polipéptido ORF56 tiene actividad bactericida contra varias cepas de *Staphylococcus* de bacterias, incluyendo las especies *aureus*, *epidermidis*, *lentis*, y *carneus*. Las medidas análogas de comparación pueden ser aplicables a otras secuencias, por ejemplo ORF49, descritas en el presente documento.

Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de degradación de la pared celular pueden, en algunas realizaciones, amplificarse usando cebadores de PCR basándose en la secuencia de los polipéptidos de degradación de la pared celular descritos. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican variantes del polipéptido ORF56 y fragmentos del mismo, así como, probables candidatos de actividad de degradación de la pared, se pueden amplificar usando cebadores. Véase, por ejemplo, Vybiral, et al. (2003) FEMS Microbiol. Lett. 219:275 - 283. Por tanto, los polipéptidos de degradación de la pared celular y fragmentos de los mismos incluyen polipéptidos que están codificados por ácidos nucleicos que se amplifican mediante PCR basada en la secuencia de los polipéptidos de degradación de la pared celular identificados. En una realización preferida, un polipéptido bactericida o bacteriostático o fragmento del mismo está codificado por un ácido nucleico que se amplifica con cebadores relevantes para las secuencias ORF56 u ORF49 descritas.

Un "componente de partícula de fago" hace referencia a, por ejemplo, un componente de la cabeza o la cola de un fago, por ejemplo los fagos K, Twort, G1 o phi11. No obstante, la invención proporciona que muchos tipos de fago diferentes pueden ser fuentes de la actividad "lítica" atribuidos libremente a los componentes de los fagos. Véase, por ejemplo, Piuri y Hatfull (2006) "A peptidoglycan hydrolase motif within the mycobacteriophage TM4 tape measure protein promotes efficient infection of stationary phase cells" Molecular Microbiology 62:1569 - 1585. Un ácido nucleico de fago hace referencia a un componente de ácido nucleico de un fago e incluye ácidos nucleicos mono y bicatenarios, por ejemplo ADN, ARN o moléculas híbridas. Secuencias relacionadas se pueden encontrar en profagos o genomas incompletos de fagos, normalmente hallados integrados en el cromosoma del huésped bacteriano. Los componentes de la cola normalmente participan en el reconocimiento y unión del fago al huésped diana y pueden poseer actividades de degradación de la pared celular que ayudan a la penetración de los componentes del fago en el huésped.

"Condiciones de BPF" hacen referencia a las buenas prácticas de fabricación, por ejemplo como define la Administración de Medicamentos y Alimentos del Gobierno de EE.UU. En Europa, Japón y en la mayoría de los países desarrollados existen prácticas y normativas análogas.

El término "sustancialmente" en las definiciones anteriores de "sustancialmente puro" generalmente significa al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, o, más preferentemente, al menos aproximadamente 90 %, y todavía más preferentemente al menos aproximadamente 95 % de pureza, ya sean proteínas, ácidos nucleicos u otras moléculas estructurales o de otro tipo.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de un modo similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican después, por ejemplo hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Análogo de aminoácido se refiere a un compuesto que tiene la misma estructura química básica que un aminoácido natural, por ejemplo un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metilmetionina sulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (p. ej., norleucina) o estructuras peptídicas modificadas, pero conservan una estructura química básica que un aminoácido de origen natural.

Mimético de aminoácido hace referencia a un compuesto químico que tiene una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido pero que funciona de un modo similar a un aminoácido de origen natural.

5 “Proteína”, “polipéptido” o “péptido” hace referencia a un polímero en el que la mayoría o todos los monómeros son aminoácidos y están unidos a través de enlaces amida, denominados de forma alternativa polipéptido. Cuando los aminoácidos son α -aminoácidos, se pueden usar el isómero óptico L o el isómero óptico D. Adicionalmente también se incluyen aminoácidos no naturales, por ejemplo β -alanina, fenilglicina y homoarginina. En la presente invención también se pueden usar aminoácidos que no están codificados en un gen. Adicionalmente, los aminoácidos que se han modificado para que incluyan una estructura adecuada o grupos reactivos también se pueden usar en la invención. Los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser el isómero D o L o mezclas de los mismos. Generalmente se prefieren los isómeros L. Además, otros peptidomiméticos también son útiles en la presente invención. Para una revisión general véase, Spatola, en Weinstein, et al. (eds. 1983) CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, Marcel Dekker, New York, pág. 267.

15 El término “recombinante”, cuando se usa como referencia a una célula, indica que la célula replica un ácido nucleico heterólogo o expresa un péptido o proteína codificado por un ácido nucleico heterólogo. Las células recombinantes pueden contener genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula. Las células recombinantes también pueden contener genes que se encuentran en la forma nativa de la célula, en las que los genes se han modificado y reintroducido en la célula por medios artificiales. El término también abarca células que contienen un ácido nucleico endógeno para la célula que se ha modificado sin eliminar el ácido nucleico de la célula; dichas modificaciones incluyen las obtenidas mediante sustitución génica, mutación específica de sitio y técnicas relacionadas. En particular, se pueden generar fusiones de secuencia, por ejemplo, incorporando un casete de secreción aguas arriba de la secuencia deseada para generar el producto proteico secretado.

25 Una “proteína de fusión” hace referencia a una proteína que comprende secuencias de aminoácidos que son además de, en lugar de, o menor que y/o diferentes de las secuencias de aminoácidos que codifican la proteína de longitud completa original o nativa o subsecuencias de los mismos. Más de un dominio adicional se puede añadir a una proteína lítica de la pared celular como se describe en el presente documento, por ejemplo un marcador de epítipo o marcador de purificación, o múltiples marcadores de epítipos o marcadores de purificación. Se pueden unir dominios adicionales, por ejemplo que puedan añadir actividades líticas adicionales (sobre la diana u organismos asociados de una colonia mixta o película biológica), actividades de degradación de la cápsula bacteriana, funciones de orientación o que afectan a los procesos fisiológicos, por ejemplo permeabilidad vascular. Como alternativa, los dominios se pueden asociar para dar lugar a afinidad física entre diferentes polipéptidos para generar complejos poliméricos de múltiples cadenas.

30 La expresión “ácido nucleico” hace referencia a un desoxirribonucleótido, ribonucleótido o polímero mixto en forma de una o dos hebras y, a menos que se limite de otro modo, abarca análogos conocidos de nucleótidos naturales que hibridan con ácidos nucleicos de un modo similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique lo contrario o lo indique el contexto, una secuencia de ácido nucleico concreta incluye la secuencia complementaria del mismo.

45 Un “casete de expresión recombinante” o, simplemente, un “casete de expresión” es una construcción de ácido nucleico generada de forma recombinante o sintética con elementos de ácido nucleico que son capaces de afectar a la expresión de un gen estructural en huéspedes compatibles con dichas secuencias. Los casetes de expresión incluyen normalmente al menos promotores y/o señales de terminación de la transcripción. Normalmente, el casete de expresión recombinante incluye un ácido nucleico que se va a transcribir (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido deseado) y un promotor. Factores adicionales necesarios o útiles para efectuar la expresión también se pueden usar, por ejemplo, como se describe en el presente documento. En determinadas realizaciones, un casete de expresión también puede incluir secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia señal que dirige la secreción de una proteína expresada desde la célula huésped. Las señales de terminación de la transcripción, potenciadores y otras secuencias de ácido nucleico que influyen en la expresión génica también se pueden incluir en un casete de expresión. En determinadas realizaciones, un casete de expresión recombinante que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende una actividad lítica sobre una pared celular se expresa en una célula huésped bacteriana.

55 Una “secuencia heteróloga” o un “ácido nucleico heterólogo”, como se usa en el presente documento, es una que se origina de una fuente extraña a la célula huésped concreta o, si procede de la misma fuente, está modificada con respecto a su forma original. La modificación de la secuencia heteróloga se puede producir, por ejemplo, tratando el ADN con una enzima de restricción para generar un fragmento de ADN que sea capaz de unirse operablemente al promotor. Las técnicas tales como mutagénesis dirigida a sitio también son útiles para modificar una secuencia heteróloga.

65 El término “aislado” se refiere a un material que carece sustancialmente o esencialmente de componentes que interfieren con la actividad de una enzima. Para un sacárido, proteína o ácido nucleico de la invención, el término “aislado” hace referencia material que carece sustancialmente o esencialmente de los componentes que

normalmente acompañan al material tal como se encuentra en su estado nativo. Normalmente, un sacárido, proteína o ácido nucleico aislado de la invención tiene una pureza de al menos aproximadamente un 80 %, normalmente de al menos aproximadamente un 90 %, y preferentemente de al menos aproximadamente un 95 %, como se mide mediante la intensidad de la banda en un gel teñido con plata u otro método para determinar la pureza. La pureza u

5 homogeneidad pueden indicarse mediante una serie de medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una proteína o un ácido nucleico en una muestra se pueden resolver mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y, después, la proteína o un ácido nucleico se pueden visualizar mediante tinción. Para determinados propósitos puede ser necesaria la alta resolución de la proteína o ácido nucleico, por ejemplo se puede usar HPLC o un medio similar para la purificación.

10 La expresión "unido operablemente" hace referencia a la unión funcional entre la secuencia de control de la expresión de ácido nucleico (tal como un promotor, la secuencia señal o la disposición de sitios de unión del factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en la que la secuencia de control de la expresión afecta a la transcripción y/o la traducción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

15 Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de proteínas hacen referencia a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, como se mide usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias o mediante

20 inspección visual.

La frase "sustancialmente idéntico" en el contexto de los dos ácidos nucleicos o proteínas hace referencia a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen, sobre el segmento adecuado, una identidad de secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos al menos mayor que aproximadamente 6' %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, preferentemente una identidad de secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, como se mide usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Preferentemente, la identidad sustancial existe sobre una región de las secuencias que corresponde a al menos aproximadamente 13, 15, 17, 23, 27, 31, 35, 40, 50 o más residuos de aminoácidos de longitud, más preferentemente sobre una región de al menos

30 aproximadamente 100 residuos y, lo más preferentemente, las secuencias son sustancialmente idénticas sobre al menos aproximadamente 15 residuos. Se pretenden correspondientes longitudes de ácido nucleico más largas, aunque se puede considerar la redundancia de los codones. En una realización lo más preferida, las secuencias son sustancialmente idénticas sobre toda la longitud de las regiones de codificación.

35 Para comparar secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias problema. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias problema y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de la subsecuencia, en caso necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) problema con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.

40

La alineación óptima de secuencias para comparación se puede efectuar mediante, por ejemplo, el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482, el algoritmo de alineación por homología de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, mediante el procedimiento de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos y relacionados (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (véase, generalmente, *Current Protocols in Molecular Biology* Ausubel, et al., eds., *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc. (1995 y suplementos) (Ausubel)).

45

50 Ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2,0, que se describen en Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403 - 410; y Altschuel et al. (1977) *Nucleic Acids Res.* 25:3389, respectivamente). El software para realizar análisis BLAST está disponible para el público a través del National Center for Biotechnology Information (ncbi.nlm.nih.gov/) o fuentes similares. Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencia de alta puntuación (HSP) identificando "palabras" cortas de longitud W en la secuencia problema que coinciden o satisfacen alguna puntuación T umbral de valor positive cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T es el umbral de la puntuación de la palabra vecina (Altschul et al., anteriormente). Estas coincidencias de la palabra vecina inicial actúan como semillas para iniciar las búsquedas para encontrar los HSP que las contienen. Después, las coincidencias con la palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia todo lo que la puntuación de la alineación acumulada se pueda incrementar. Las puntuaciones acumuladas se calculan usando, para secuencias nucleotídicas, los parámetros M (puntuación de recompensa par aun par de residuos equivalentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos no equivalentes; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión para las coincidencias de la palabra en cada dirección se detienen cuando: La puntuación de la alineación acumulada se salga de la cantidad X a partir de su valor máximo alcanzado; la puntuación

55

60

65

acumulada llega a cero o menor, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos que puntúan negativo; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para las secuencias de nucleótidos) usad como defecto una longitud de texto (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=4 y una comparación de
 5 ambas hebras. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como parámetros por defecto una longitud de texto (W) de 3, y una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:10915).

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la
 10 similitud entre dos secuencias (véase, p. ej., Karlin y Altschul (1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:58735787). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor probabilidad de la suma (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad de que se produzca al azar una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la menor probabilidad de la suma en una comparación del ácido nucleico problema con el ácido nucleico de
 15 referencia es inferior a aproximadamente 0,1, más preferentemente inferior a aproximadamente 0,01 y, lo más preferentemente, inferior a aproximadamente 0,001.

Una indicación adicional de que las dos secuencias de ácido nucleico o proteínas son sustancialmente idénticas es que la proteína codificada por el primer ácido nucleico es inmunológicamente transreactiva con la proteína
 20 codificada por el segundo ácido nucleico, como se describe más adelante. Por tanto, normalmente, una proteína es sustancialmente idéntica a una segunda proteína cuando, por ejemplo, los dos péptidos difieren únicamente en las sustituciones conservadoras. Otra indicación de que las dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe más adelante.

La frase "hibrida específicamente con" se refiere a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula sólo
 25 con una secuencia nucleotídica concreta en condiciones rigurosas cuando dicha secuencia está presente en una mezcla compleja de ADN o ARN (por ejemplo, (celular total).

La expresión "condiciones rigurosas" hace referencia a las condiciones en las cuales una sonda hibrida con su
 30 subsecuencia diana pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas altas. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan de modo que sean aproximadamente 15 °C menos que el punto de fusión térmica (T_f) para la secuencia específica a un pH y fuerza iónica definidos. La T_m es la temperatura (en una fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos) a la que el 50 % de las sondas
 35 complementarias de la secuencia diana hibridan con la secuencia diana en el equilibrio. (Dado que las secuencias diana generalmente están presentes en exceso, a la T_m el 50 % de las sondas están ocupadas en el equilibrio). Normalmente, las condiciones rigurosas serán aquéllas en las que la concentración de sales es inferior a aproximadamente 1,0 M del ion Na, normalmente a una concentración de ion sodio de aproximadamente 0,01 a 1,0 M (u otras sales) a un pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para las sondas
 40 cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, superior a 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para hibridación selectiva o específica, una señal positiva normalmente es al menos dos veces la inicial, preferentemente 10 veces la hibridación inicial. Ejemplos de condiciones rigurosas de hibridación pueden ser los siguientes: 50 % de formamida, 5x de SSC, y 1 % de SDS, incubación a 42 °C, o 5x SSC,
 45 1 % de SDS, incubación a 65 °C, con lavado en 0,2x SSC, y 0,1 % de SDS a 65 °C. Para la PCR, una temperatura de aproximadamente 36 °C es habitual para la amplificación poco estricta, aunque las temperaturas de hibridación pueden variar entre aproximadamente 32 – 48 °C en función de la longitud del cebador. Para la amplificación muy estricta, es habitual una temperatura de aproximadamente 62 °C, aunque las temperaturas de hibridación en condiciones muy estrictas pueden variar de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 65 °C en función de la
 50 longitud del cebador y la especificidad. Entre las condiciones de ciclo típicas para amplificaciones de alta y baja rigurosidad incluyen una fase de desnaturalización de 90 – 95 °C durante 30 - 120 segundos, una fase de hibridación de 30 - 120 segundos de duración y una fase de extensión de aproximadamente 72 °C durante 1 - 2 min. Existen protocolos y guías para las reacciones de amplificación de alta y baja rigurosidad, por ejemplo en Innis, et al. (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press, N.Y.

Las frases "se une específicamente a una proteína" o "es inmunorreactiva específicamente con", cuando hace
 55 referencia a un anticuerpo, se refiere a una reacción de unión que es determinativa de la presencia de la proteína en presencia de una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Por tanto, en las condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen preferentemente a una proteína concreta y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a una proteína en dichas condiciones requiere un anticuerpo que se selecciona según su especificidad para una proteína concreta. Se pueden usar diversos formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos
 60 inmunorreactivos específicamente con una proteína concreta. Por ejemplo, los inmunoensayos de ELISA de fase sólida se usan rutinariamente para seleccionar anticuerpos monoclonales inmunorreactivos específicamente con una proteína. Véase Harlow y Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York, para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que se pueden usar para determinar
 65

inmunorreactividad específica.

“Variaciones modificadas de forma conservadora” de una secuencia de polinucleótidos concreta hace referencia a los polinucleótidos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas o cuando el polinucleótido no codifica una secuencia de aminoácidos, a las secuencias esencialmente idénticas. Dada la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones CGU, CGC, CGA, CGG, AGA y AGG codifican todos ellos el aminoácido arginina. Por tanto, en cada posición en la que una arginina está especificada por un codón, se puede alterar el codón y convertir en otro de los correspondientes codones descritos sin que se altere la proteína codificada. Dichas variaciones en el ácido nucleico son “variaciones silentes”, que son una especie de “variaciones modificadas de forma conservadora”. Cada secuencia de polinucleótidos descrita en el presente documento que codifica una proteína también describe posibles variaciones silentes a excepción de lo indicado de otro modo. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (a excepción de UGG, que normalmente es el único codón para metionina, y TGG, que habitualmente es el único codón para triptófano) se puede modificar para dar una molécula funcionalmente idéntica mediante técnicas estándar. De acuerdo con esto, cada “variación silente” de un ácido nucleico que codifica una proteína está implícita en cada secuencia descrita.

Los expertos reconocen que muchos aminoácidos se pueden sustituir por otro en una proteína sin que ello afecte a la función de la proteína, por ejemplo una sustitución conservadora puede ser la base de una variante modificada de forma conservadora de una proteína tal como las proteínas líticas de la pared celular divulgadas. A continuación se expone una lista incompleta de sustituciones conservadoras de aminoácidos. Cada uno de los siguientes ocho grupos contiene aminoácidos que normalmente son sustituciones conservadoras uno de otro: 1) alanina (A), glicina (G); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V), alanina (A); 6) fenilalanina (F), Tirosina (Y), triptófano (W); 7) serina (S), treonina (T), cisteína (C); y 8) cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton (1984) *Proteins*).

Adicionalmente, un experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones que alteran, añaden o eliminan un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos (normalmente menos del 5 %, más normalmente menos del 1 %) en una secuencia codificada son “variaciones modificadas de forma conservadora” eficazmente cuando las alteraciones dan lugar a la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica.

Un experto apreciará que muchas variaciones conservadoras de proteínas, por ejemplo proteínas líticas de la pared celular y ácidos nucleicos que codifican proteínas dan productos esencialmente idénticos. Por ejemplo, debido a la degeneración del código genético, las “sustituciones silentes” (por ejemplo sustituciones de una secuencia de ácido nucleico que no dan lugar a una alteración en una proteína codificada) son una característica implicada de cada secuencia de ácido nucleico que codifica un aminoácido. Como se describe en el presente documento, las secuencias se optimizan, preferentemente, para su expresión en una célula huésped concreta usada para producir las proteínas líticas de la pared celular (por ejemplo, levadura, ser humano y similares). De un modo similar, “sustituciones conservadoras de aminoácidos,” en uno o unos pocos aminoácidos en una secuencia de aminoácidos se sustituyen por aminoácidos diferentes con proteínas muy similares, también se identifican fácilmente como muy similares a una secuencia de aminoácidos concreta o a una secuencia de ácido nucleico concreta que codifica un aminoácido. Dichas variaciones sustituidas de forma conservadora de cualquier secuencia concreta son una característica de la presente invención. Véase también, Creighton (1984) *Proteins*, W. H. Freeman and Company. Además, las sustituciones, deleciones o adiciones individuales que alteran, añaden o eliminan un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en una secuencia codificada generalmente también son “variaciones modificadas de forma conservadora”.

La práctica de la presente invención puede implicar la construcción de ácidos nucleicos recombinantes y la expresión de los genes en las células huésped, preferentemente células huésped bacterianas. El uso optimizado de codones para un huésped específico a menudo será aplicable. Las técnicas de clonación molecular para conseguir estos extremos se conocen en la técnica. Los expertos en la técnica conocen en una amplia variedad de métodos de clonación y amplificación *in vitro* adecuados para la construcción de ácidos nucleicos recombinantes, tales como vectores de expresión. Ejemplos de estas técnicas e instrucciones suficientes para dirigir a los expertos a través de muchos ejercicios de clonación se encuentra en Berger y Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology* volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); y *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1999 Suplemento) (Ausubel). Los expertos en la técnica conocen las células huésped adecuadas para la expresión de los polipéptidos recombinantes e incluyen, por ejemplo, células procariotas tales como *E. coli*, y células eucariotas, incluidas células de insectos, mamíferos y fúngicas (por ejemplo, *Aspergillus niger*).

Ejemplos de protocolos suficientes para dirigir a los expertos a través de los métodos de amplificación *in vitro*, incluidos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación con Q β -replicasa y otras técnicas mediadas por la ARN polimerasa se encuentran en Berger, Sambrook, y Ausubel, así como Mullis, et al. (1987) patente de EE.UU. N $^{\circ}$ 4.683.202; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications

- (Innis, et al. eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim y Levinson (October 1, 1990) C&EN 36 - 47; The Journal OfNIHResearch (1991) 3:81 - 94; (Kwoh, et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:1173; Guatelli, et al. (1990) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:1874; Lomell, et al. (1989) J. Clin. Chem. 35:1826; Landegren, et al. (1988) Science 241:1077 - 1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8:291 - 294; Wu y Wallace (1989) Gene 4:560; y Barringer, et al. (1990) Gene 89:117. Métodos mejorados de clonación de ácidos nucleicos amplificados in vitro se describen en Wallace, et al., patente de EE.UU. N° 5.426.039.

IV. Aplicaciones comerciales

- 10 Varias aplicaciones de las actividades enzimáticas descritas se pueden reconocer de inmediato. Una aplicación importante es un tratamiento antibacteriano de artículos que se pueden contaminar con el uso normal. Ubicaciones, equipos, ambientes o similares en los que las bacterias diana pueden suponer riesgos para la salud pública se pueden tratar usando dichas entidades. Las localizaciones de interés incluyen instalaciones de salud pública en las que existe la finalidad u oportunidad para tratar con los materiales que contienen bacterias diana. Estos materiales pueden incluir productos residuales, por ejemplo líquidos, sólidos o aire. Las plantas de tratamiento de aguas residuales pueden incorporarlos para eliminar la diana del efluente, ya sea mediante tratamiento con las entidades enzimáticas directamente o mediante liberación de las células que las producen. Los sitios de residuos sólidos pueden introducirlos para minimizar la posibilidad de brotes de huéspedes diana. Por el contrario, las zonas o equipos para preparación de alimentos tienen que limpiarse con regularidad y la invención proporciona composiciones y medios para eliminar con eficacia bacterias diana. Ambientes médicos y otros públicos sujetos a contaminación pueden requerir medios similares para minimizar el crecimiento y la propagación de los microorganismos diana. Los métodos se pueden usar en los contextos en los que se desea la eliminación por esterilización de las bacterias diana, incluyendo sistemas de filtración del aire para una unidad de cuidados intensivos.
- 15
- 20 Aplicaciones alternativas incluyen el uso en un contexto veterinario o médico. Los medios para determinar la presencia de bacterias concretas o de identificar dianas específicas pueden usar el efecto de agentes selectivos sobre la población o el cultivo. Puede desearse la inclusión de actividades bacteriostáticas o bactericidas en los agentes de limpieza, incluyendo el lavado de animales y mascotas.
- 25
- 30 La ORF56 y polipéptidos relacionados se pueden usar para tratar infecciones bacterianas de, por ejemplo, seres humanos o animales. Estos polipéptidos se pueden administrar profilácticamente o se pueden administrar a un sujeto que ha contraído una infección bacteriana. En una realización preferida, los polipéptidos ORF56 se usan para tratar infecciones causadas por bacterias que se replican lentamente, ya que el mecanismo de muerte no depende de la replicación de la célula huésped. Muchos agentes antibacterianos, por ejemplo antibióticos, son los más útiles contra las bacterias en replicación. Las bacterias que se replican lentamente tienen tiempos de duplicación de, por ejemplo, aproximadamente 1 - 72 horas, 1 - 48 horas, 1 - 24 horas, 1 - 12 horas, 1 - 6 horas, 1 - 3 horas o 1 - 2 horas.
- 35
- 40 En una realización preferida, estas proteínas se usan para tratar seres humanos u otros animales que están infectados por especies de *Staphylococcus*. En otra realización preferida, las proteínas ORF56 u ORF49 se usan para tratar seres humanos u otros animales que están infectados por especies de *Staphylococcus* resistente a metilicina.

45 V. Administración

- La vía de administración y la dosis variarán con la o las cepas de bacterias infecciosas, el sitio y la extensión de la infección (por ejemplo, local o sistémica) y el sujeto que se esté tratando. Las vías de administración adecuadas incluyen, entre otras: oral, aerosol u otro dispositivo para administración en los pulmones, pulverizador nasal, intravenosa (i.v.), intramuscular, intraperitoneal, intratecal, intraocular, vaginal, rectal, tópica, punción lumbar, intratecal y aplicación directa en el cerebro y/o las meninges. Los excipientes que se pueden usar como vehículo para la liberación de la terapéutica serán evidentes para los expertos en la técnica. Por ejemplo, la enzima podría estar en forma liofilizada y disolverse justo antes de la administración mediante inyección i.v. Se contempla que la dosis de administración está en el intervalo de aproximadamente 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1.000, 3.000, 10.000 o más moléculas de enzima por bacteria en la infección del huésped. Dependiendo del tamaño de la proteína, que por sí misma puede estar asociada en tándem o en forma de múltiples subunidades (dímero, trímero, tetrámero, pentámero y similares) o en combinación con una o más entidades, por ejemplo enzimas o fragmentos de especificidad diferente, la dosis puede ser de aproximadamente 1 millón a aproximadamente 10 trillones/por kg/al día y, preferentemente, de aproximadamente 1 trillón/por kg/al día, y puede ser de aproximadamente 10E6 de unidades de destrucción/kg/día a aproximadamente 10E13 de unidades de destrucción/kg/día.
- 50
- 55
- 60

- Los métodos para evaluar la capacidad de destrucción pueden ser similares a los métodos usados por los expertos para evaluar la replicación de fagos intactos, por ejemplo unidades formadoras de placas o ufp, aunque las unidades de destrucción se pueden evaluar mejor determinando el número de bacterias que sobreviven tras la titulación de las unidades de destrucción. La cuantificación de la destrucción es más distinta, no obstante, ya que el fago no replicante no formará placas sobre las mantas bacterianas. Por tanto, los métodos de dilución en serie para evaluar
- 65

la cantidad de unidades de "destrucción" se usan de forma conveniente en lugar de ufp estándar. Las diluciones en serie de cultivos bacterianos expuestos a las composiciones de destrucción pueden cuantificar las unidades de destrucción. Como alternativa, comparando los recuentos bacterianos totales con las unidades de colonias viables se puede establecer qué fracción de bacterias es realmente viable y, por implicación, que fracción ha sido susceptible a las construcciones de destrucción. Otras medidas de la actividad sobre sustratos artificiales o preparados especialmente a menudo se pueden usar como medidas sustitutas de las unidades de destrucción.

La o las terapéuticas normalmente se administran hasta conseguir una eliminación con éxito de las bacterias patogénicas, aunque se pueden usar formulaciones de amplio espectro al determinar el diagnóstico específico de la cepa de infección. Por tanto, la invención contempla formas de dosificación unitaria así como formas de dosificación múltiple de las composiciones de la invención, así como métodos para conseguir medios de liberación sostenida para la liberación de dichas formas de dosificación única y múltiple.

Con respecto a la administración en aerosol en los pulmones u otras superficies mucosas, la composición terapéutica se incorpora en una formulación en aerosol diseñada específicamente para administración. Muchos de estos aerosoles se conocen en la técnica y la presente invención no se limita a ninguna formulación concreta. Un ejemplo de dicho aerosol es el inhalador Proventil fabricado por Schering-Plough cuyo propelente contiene tricloromonofluorometano, diclorodifluorometano y ácido oleico. Otras realizaciones incluyen inhaladores que están diseñados para administración en vías y senos nasales de un sujeto o paciente. Las concentraciones de los ingredientes propelentes y emulsionantes se ajustan, en caso necesario, basándose en la composición específica que se esté usando en el tratamiento. El número de unidades de destrucción enzimática a administrar por tratamiento con aerosol normalmente estará en el intervalo de aproximadamente $10E6$ a $10E13$ unidades de destrucción y, preferentemente, de aproximadamente $10E12$ unidades de destrucción.

Los métodos para evaluar la capacidad de destrucción a menudo son similares a muchos métodos usados al trabajar con fagos en replicación intactos. En particular, la cuantificación de la destrucción es más diferente, ya que el fago no replicante no formará placas sobre las bacterias. Por tanto, los métodos de dilución en serie para evaluar la cantidad de unidades "de destrucción" se realizarán de un modo similar a las ufp (unidades formadoras de placas) estándar, pero no pueden usar la destrucción y amplificación que se produce sobre una mancha bacteriana. Las diluciones en serie de cultivos bacterianos expuestos a las composiciones de destrucción pueden cuantificar las unidades de destrucción. Como alternativa, comparando los recuentos bacterianos totales con las unidades de colonias viables se puede establecer qué fracción de bacterias es realmente viable y, por implicación, que fracción ha sido susceptible a las construcciones de destrucción. Otros medios para evaluar la actividad de estasis pueden incluir la liberación de los contenidos intracelulares, naturales o cargados, o la actividad enzimática sobre sustratos definidos o preparados que corresponden a las estructuras de las paredes celulares naturales.

Normalmente, la destrucción disminuirá la capacidad de replicación bacteriana por al menos aproximadamente 3 y puede afectarla en al menos aproximadamente 10, 20, 100, 300 etc., a muchos órdenes de magnitud. No obstante, incluso la ralentización de la tasa de replicación bacteriana sin destrucción puede tener un valor comercial o terapéutico significativo. Las eficiencias de la inactivación genética preferidas pueden ser de 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,8, 1, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4, 5, 6, 7, 8, o más unidades logarítmicas.

VI. Formulaciones

En el presente documento se describen composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una enzima de degradación de la pared, por ejemplo muramidasa, de la invención proporcionada en un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones y composiciones farmacéuticas contemplan formulaciones que comprenden un segmento enzimático aislado específico para una bacteria; una mezcla de dos, tres, cinco, diez o veinte o más enzimas que afectan al mismo o al típico huésped bacteriano; y una mezcla de dos, tres, cinco, diez o veinte o más enzimas que afectan a diferentes bacterias o a diferentes cepas de la misma bacteria, por ejemplo una mezcla cóctel de enzimas que en conjunto inhiben el crecimiento de múltiples cepas de *Staphylococcus aureus*. De este modo, las composiciones se pueden adaptar a las necesidades del paciente. Los compuestos o composiciones normalmente serán estériles o casi estériles.

Por "dosis terapéuticamente eficaz" en el presente documento se quiere decir una dosis que produce efectos, bacteriostáticos o preferentemente bactericidas, al que se administre. La dosis exacta dependerá de la finalidad del tratamiento y un experto en la técnica la podrá determinar usando técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, Ansel, et al. *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery*; Lieberman (1992) *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1 - 3), Dekker, ISBN 0824770846, 0824769 1 8X, 0824712692, 0824716981; Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*; y Pickar (1999) *Dosage Calculations*. Como se sabe en la técnica, pueden ser necesarios ajustes por degradación proteica, administración sistémica frente a localizada y la tasa de síntesis de nuevas proteasas, así como la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, la hora de administración, la interacción farmacológica, el espectro de componentes bacterianos en la colonia y la gravedad del estado y los expertos en la técnica podrán determinarlos con alguna experimentación.

En la técnica se conocen varios excipientes farmacéuticamente aceptables. Como se usa en el presente documento, "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye un material que, cuando se combina con un ingrediente activo de una composición, permite que el ingrediente conserve actividad biológica y sin producir reacciones que alteran el sistema inmunológico del sujeto. Estos pueden incluir estabilizantes, conservantes, sal o complejos de azúcar o cristales y similares.

Vehículos farmacéuticos de ejemplo incluyen soluciones acuosas estériles de soluciones no acuosas, suspensiones y emulsiones. Ejemplos incluyen entre otros, excipientes farmacéuticos convencionales tal como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, todas incluyendo medios salinos y tamponados. Vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, cloruro sódico y dextrosa, Ringer lactato o aceites fijos. Vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y de nutrientes y reponedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. En otras realizaciones, las composiciones se incorporarán en matrices sólidas, incluyendo partículas de liberación lenta, esferas de vidrio, vendajes, inserciones en el ojo o formas tópicas.

Una composición que comprende una enzima descrita en el presente documento también se puede liofilizar usando medios bien conocidos en la técnica, por ejemplo para la posterior reconstitución y uso.

Asimismo, son de interés las formulaciones para liberación liposómica y las formulaciones que comprenden enzimas microencapsuladas, incluyendo cristales de azúcar. Las composiciones que comprenden dichos excipientes se formulan mediante métodos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Capítulo 43, 14^a Ed., Mack Publishing Col, Easton PA 18042, USA).

En general, las composiciones farmacéuticas se pueden preparar de varias formas, tales como gránulos, comprimidos, píldoras, supositorios, cápsulas (por ejemplo, adaptadas para liberación oral), microperlas, microesferas, liposomas, suspensiones, pomadas, lociones y similares. Los vehículos y/o diluyentes orgánicos o inorgánicos de calidad farmacéutica adecuados para uso oral y tópico se pueden usar para formar composiciones que comprenden los compuestos terapéuticamente activos. Los diluyentes conocidos en la técnica incluyen medios acuosos, aceites vegetales y animales, y grasas. Las formulaciones pueden incorporar agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales para modificar la presión osmótica o tampones para asegurar un valor de pH adecuado.

La composición farmacéutica puede comprender otros componentes además de la enzima "lítica". Además, las composiciones farmacéuticas pueden comprender más de un ingrediente activo, por ejemplo dos o más, tres o más, cinco o más o diez o más enzimas diferentes, en las que las enzimas diferentes pueden ser específicas de las mismas bacterias, diferentes o acompañantes. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede comprender múltiples (por ejemplo, al menos dos o más) enzimas de degradación de la pared, en las que al menos dos de las enzimas en la composición tienen diferente especificidad bacteriana. De este modo, la composición terapéutica se puede adaptar para tratar una infección mixta de diferentes bacterias i puede ser una composición seleccionada para ser eficaz contra varios tipos de infecciones halladas habitualmente en un ambiente institucional concreto. Puede resultar una combinación seleccionada, por ejemplo seleccionando diferentes grupos de entidades de degradación de la pared o "líticas" derivadas de varios bacteriófagos de diferente especificidad para contener al menos un componente eficaz contra bacterias diferentes o críticas (por ejemplo, cepa, especie etc.) que se sospecha que está presente en la infección (por ejemplo, en el sitio infectado). Como se ha indicado anteriormente, la enzima de degradación de la pared se puede administrar junto con otros agentes, tal como un agente antimicrobiano convencional. En algunas realizaciones, puede ser deseable administrar la enzima y el antibiótico dentro de la misma formulación.

VII. Metodología

Algunos aspectos de la práctica de la presente invención implican métodos bien conocidos en la microbiología clínica general, métodos generales para manipular bacteriófagos y fundamentos generales de biotecnología, principios y métodos.

A. Microbiología clínica general

La microbiología general es el estudio de los microorganismos. Véase, por ejemplo, Sonenshein, et al. (eds. 2002) *Bacillus Subtilis and Its Closest Relatives: From Genes to Cells* Amer. Soc. Microbiol., ISBN: 1555812058; Alexander y Strete (2001) *Microbiology: A Photographic Atlas for the Laboratory* Benjamin/Cummings, ISBN: 0805327320; Cann (2001) *Principles of Molecular Virology* (Book with CD-ROM; 3^a ed.), ISBN: 0121585336; Garrity (ed. 2005) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2^a vol. 2^a ed.) Plenum, ISBN: 0387950400; Salyers y Whitt (2001) *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach* (2^a ed.) Amer. Soc. Microbiol., ISBN: 155581171X; Tierno (2001) *The Secret Life of Germs: Observations and Lessons from a Microbe Hunter* Pocket Star, ISBN: 0743421876; Block (ed.

2000) Disinfection, Sterilization, and Preservation (5^a ed.) Lippincott Williams & Wilkins Publ., ISBN: 0683307401; Cullimore (2000) Practical Atlas for Bacterial Identification Lewis Pub., ISBN: 1566703921; Madigan, et al. (2000) Brock Biology of Microorganisms (9^a ed.) Prentice Hall, ASIN: 0130819220; Maier, et al. (eds. 2000) Environmental Microbiology Academic Pr., ISBN: 0124975704; Tortora, et al. (2000) Microbiology: An Introduction including Microbiology Place(TM) Website, Student Tutorial CD-ROM, and Bacteria ID CD-ROM (7^a ed.), Benjamin/Cummings, ISBN 0805375546; Demain, et al. (eds. 1999) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology (2^a ed.) Amer. Soc. Microbiol., ISBN: 1555811280; Flint, et al. (eds. 1999) Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control Amer. Soc. Microbiol., ISBN: 1555811272; Murray, et al. (ed. 1999) Manual of Clinical Microbiology (7th ed.) Amer. Soc. Microbiol., ISBN: 1555811264; Burlage, et al. (eds. 1998) Techniques in Microbial Ecology Oxford Univ. Pr., ISBN: 0195092236; Forbes, et al. (1998) Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology (10^a ed.) Mosby, ASIN: 0815125356; Schaechter, et al. (ed. 1998) Mechanism of Microbial Disease (3d ed.) Lippincott, Williams & Wilkins, ISBN: 0683076051; Tomes (1998) The Gospel of Germs: Men, Women, and the Microbe in American Life Harvard Univ. Pr., ISBN: 0674357078; Snyder y Champness (1997) Molecular Genetics of Bacteria Amer. Soc. Microbiol., ISBN: 1555811027; Karlen (1996) MAN AND MICROBES: Disease and Plagues in History and Modern Times Touchstone Books, ISBN: 0684822709; y Bergey (ed. 1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9^a ed.) Lippincott, Williams & Wilkins, ISBN: 0683006037.

B. Métodos generales para la manipulación de bacteriófagos

Los métodos generales para la manipulación de bacteriófagos son bien conocidos, véase, por ejemplo, Snustad y Dean (2002) Genetics Experiments with Bacterial Viruses Freeman; O'Brien y Aitken (eds. 2002) Antibody Phage Display: Methods and Protocols Humana; Ring y Blair (eds. 2000) Genetically Engineered Viruses BIOS Sci. Pub.; Adolf (ed. 1995) Methods in Molecular Genetics: Viral Gene Techniques vol. 6, Elsevier; Adolf (ed. 1995) Methods in Molecular Genetics: Viral Gene Techniques vol. 7, Elsevier; y Hoban y Rott (eds. 1988) Molec. Biol. of Bacterial Virus Systems (Current Topics in Microbiology and Immunology No. 136) Springer-Verlag.

C. Fundamentos generales de biotecnología, principios y métodos

Los fundamentos generales de biotecnología, principios y métodos se describen en, por ejemplo, Alberts, et al. (2002) Molecular Biology of the Cell (4^a ed.) Garland ISBN: 0815332181; Lodish, et al. (1999) Molecular Cell Biology (4th ed.) Freeman, ISBN: 071673706X; Janeway, et al. (eds. 2001) Immunobiology (5^a ed.) Garland, ISBN: 081533642X; Flint, et al. (eds. 1999) Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control Amer. Soc. Microbiol., ISBN: 1555811272; Nelson, et al. (2000) Lehninger Principles of Biochemistry (3^a ed.) Worth, ISBN: 1572599316; Freshney (2000) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (4^a ed.) Wiley-Liss; ISBN: 0471348899; Arias y Stewart (2002) Molecular Principles of Animal Development, Oxford University Press, ISBN: 0198792840; Griffiths, et al. (2000) An Introduction to Genetic Analysis (7^a ed.) Freeman, ISBN: 071673771X; Kierszenbaum (2001) Histology and Cell Biology, Mosby, ISBN: 0323016391; Weaver (2001) Molecular Biology (2d ed.) McGraw-Hill, ISBN: 0072345179; Barker (1998) At the Bench: A Laboratory Navigator CSH Laboratory, ISBN: 0879695234; Branden y Tooze (1999) Introduction to Protein Structure (2^a ed.), Garland Publishing; ISBN: 0,815323050; Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3^{er} vol., 3^a ed.), CSH Lab. Press, ISBN: 0879695773; y Scopes (1994) Protein Purification: Principles and Practice (3^a ed.) Springer Verlag, ISBN: 0387940723.

D. Mutagénesis; específica de sitio, aleatoria, barajado

Basándose en las descripciones estructurales y funcionales proporcionadas en el presente documento se pueden aislar o generar homólogos y variantes que pueden optimizar características preferidas. Por tanto, se pueden encontrar segmentos catalíticos adicionales de funciones de penetración de fagos mediante homología estructural o mediante evaluación de las entidades halladas en los motivos característicos de la organización génica. Los genes de la cola de los fagos normalmente se encuentran en organizaciones génicas concretas y otras entidades halladas en las correspondientes organizaciones se pueden analizar para determinar una función de degradación de la pared celular. Estas también pueden servir como puntos de partida para detectar variantes de las estructuras, por ejemplo mutageneizando dichas estructuras y seleccionando aquellas que tienen las características deseadas, por ejemplo una especificidad por sustrato más amplia. Se pueden usar métodos de mutagénesis convencionales, véase, por ejemplo, Johnson-Boaz, et al. (1994) Mol. Microbiol. 13:495 - 504; patentes de EE.UU. 6.506.602, 6.518.065, 6.521.453, 6.579.678, y referencias citadas por ellas o en ellas.

Los segmentos de unión se pueden identificar de forma similar y se pueden detectar motivos diana prevalentes o específicos para los dominios de unión que interaccionan específicamente con ellos. Muchas de dichas dianas pueden ser estructuras que contienen proteínas, hidratos de carbono o lípidos de expresión alta halladas en las diversas cepas diana potenciales. Aunque se conocen muchas proteínas que se unen a las paredes celulares, dos familias incluyen las proteínas de reconocimiento de peptidoglicano (PGRP, véase, por ejemplo, Dziarski y Gupta (2006) "The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs)" Genome Biol. 7:232, PMID: 16930467; Dziarski y Gupta (2006) "Mammalian PGRPs: novel antibacterial proteins" Cell Microbiol. 8:1059 - 69, PMID: 16819960; Lu, et al. (2006) "Peptidoglycan recognition proteins are a new class of human bactericidal proteins" J. Biol. Chem. 281:5895 - 5907; Dziarski (2004) "Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs)" Mol. Immunol. 40:877 - 886, PMID: 14698226;

Guan, et al. (2004) "Crystal structure of the C-terminal peptidoglycan-binding domain of human peptidoglycan recognition protein Ia" J. Biol. Chem. 279:31873 - 882; Liu, et al. (2001) "Peptidoglycan Recognition Proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules" J. Biol. Chem. 276:34686 - 694; y Werner, et al. (2000) "A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*" Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:13772 - 777) hallados en especies de insectos a mamíferos. Existe un segmento conservado de aproximadamente 160 aminoácidos que se ha encontrado en el extremo C de estas proteínas y otros se pueden encontrar mediante búsquedas en PubMed o de secuencia. Otro grupo de proteínas que se unen a bacterias es el de los receptores de tipo toll (TLR), en particular TLR4 que detecta directamente el LPS bacteriano; TLR2 que se une a las lipoproteínas bacterianas, al peptidoglicano y al zimosano de levaduras; TLR3 que se une al ARN bicatenario; y TLR5 que reconoce la flagelina, la proteína sobre los flagelos bacterianos. Las estructuras de los pelos que se encuentran fuera de la célula bacteriana pueden ser otra estructura que las proteínas tienen como objetivo de unión. La mutagénesis puede ampliar la selectividad de la unión o incrementar la estabilidad de los segmentos o toda la construcción, estrategias de detección pueden eliminar segmentos extraños.

Los componentes de la pared celular de las bacterias grampositivas pueden compartirse con los componentes de la pared celular de las bacterias gramnegativas o, posiblemente, con otras micobacterias o esporas. No obstante, puede haber capas adicionales de la pared en las gramnegativas que también pueden servir como barreras adicionales al acceso de los fagos. Otras actividades derivadas de los fagos o de otros se pueden combinar para penetrar en las estructuras de la pared celular más completa de las bacterias gramnegativas. En particular, múltiples segmentos catalíticos pueden proporcionar múltiples actividades que pueden funcionar de forma sinérgica, dentro de una única construcción, o que pueden proporcionar un efecto sinérgico cuando se combina con otra terapéutica, por ejemplo antibiótico o antimicrobiano.

Un resto dirigido puede incrementar una concentración local de un fragmento catalítico, pero un enlazador de la longitud adecuada también puede aumentar el número de acontecimientos de degradación de la pared localmente. Por tanto, los enlazadores compatibles con los motivos diana y catalíticos o de la longitud adecuada pueden ser útiles y aumentar la actividad de penetración catalítica que conduce a estasis o destrucción de las bacterias diana.

Parte del avance conceptual de la invención es el reconocimiento de que los fagos se han seleccionado para que sobrevivan fuera de las células, a menudo en condiciones biológicamente inhóspitas. Por tanto, es probable que las estructuras sean particularmente duras y sólidas y resistentes a las condiciones ambientales que, de otro modo, podrían inactivar un fago. Es probable que las bacterias que viven en ambientes inhóspitos, por ejemplo ambientes extremos de temperatura, sal, extremos de oxidación o reactivos, presión alta y otros, tengan fagos que estén particularmente adaptados para sobrevivir fuera de las células. Por consiguiente, estas serán fuertes, resistentes a esos extremos y probablemente puedan sobrevivir con más facilidad que las proteínas que no han sido sometidas a una selección similar. Y los polipéptidos derivados de dichas fuentes es probable que sean más estables en varios procesos de purificación, almacenamiento y condiciones farmacológicas de uso. Otro aspecto más de la invención procede de una suposición de que la finalidad de las estructuras TAME es reconocer y unirse a la bacteria diana, pero no destruir la célula rápidamente. Por tanto, la TAME ha evolucionado a no ser muy eficiente en cuanto a la destrucción en condiciones de uso comercialmente viables. Las construcciones de ORF56 se analizaron para ver si la actividad bactericida comercialmente viable podría aumentar. De hecho, una combinación de delección de polipéptidos y la fijación de una función de unión aumentó la actividad a un nivel más atractivo de viabilidad comercial. La unión a un resto dirigido a la pared celular puede aumentar la concentración del sustrato local en el sitio activo de degradación de la pared celular y la delección de la secuencia de la TAME natural puede eliminar algunas de las características que pueden haberse adoptado para limitar la tasa bactericida para evitar la destrucción del huésped antes de que el fago pueda replicarse dentro de la célula. Y estas características se encuentran de forma ubicua, como los fagos, como puntos de partida para recolectar y detectar de forma selectiva las propiedades deseadas para estos usos.

50 *E. Detección selectiva*

Se pueden idear métodos de detección selectiva para evaluar mutantes o nuevos segmentos funcionales candidatos. Una preparación purificada de las partículas del fago podría someterse a detección selectiva para detectar la presencia de dichos productos génicos sobre la estructura del fago. La unión puede usar cultivos bacterianos, componentes aislados de la pared celular bacteriana, preparaciones de peptidoglicano, sustratos sintéticos o reactivos purificados para determinar la afinidad y el número de uniones a la diana sobre las células diana. Se pueden idear ensayos de penetración o de degradación de la pared para evaluar la integridad de las paredes celulares de las cepas diana, ensayos de inhibición de mantas, pruebas de viabilidad de cultivos, actividad sobre las preparaciones de la pared celular u otros sustratos (por ejemplo, como se ha descrito para los motivos de unión) o liberación de componentes (por ejemplo, azúcares, aminoácidos, polímeros) o la pared celular tras la acción catalítica. La actividad de la amidasa se puede medir mediante liberación de las N-acetilhexosaaminas solubles (por ejemplo, reacción de Morgan-Elson modificada) o la actividad endopeptidasa mediante ensayo de los grupos amino libres (L-alanina para ala-gly endopeptidasas, L-glicina para gly-gly endopeptidasas) usando un ensayo DNFB), estos tres ensayos basados en Petit, et al. (1966) "Peptide cross-links in bacterial cell wall peptidoglycans studied with specific endopeptidases from *Streptomyces albus G*" Biochemistry 5:2764 - 76; MID: 5968582. La actividad Gly-gly endopeptidasa también se puede medir como la liberación de los grupos amino libres de hexaglicina N-acetilada

(acetil-Gly6), véase Kline, et al. (1994) "A colorimetric microtiter plate assay for lysostaphin using a hexaglycine substrate" Anal. Biochem. 217:329 - 331; PMID: 8203764.

5 Las características del enlazador se pueden analizar para comparar los efectos sobre la unión o catálisis de enlazadores concretos o para comparar las diversas orientaciones de fragmentos. Los paneles de dianas se pueden someter a detección selectiva de fragmentos catalíticos que actúan sobre un espectro más amplio o más estrecho de las bacterias diana y pueden incluir otros microbios que pueden compartir los componentes de la pared celular, por ejemplo micobacterias o esporas. Esto puede hacer uso de paneles más amplios de cepas de *Staphylococcus* relacionadas, por ejemplo, incluyendo los aislados de *carneus*, *epidermidis*, *simulans* y *lentis*. Se pueden idear estrategias que permitan la detección selectiva de números mayores de candidatos o variantes.

15 Un método para analizar la actividad de degradación de la pared celular es tratar al fago con detergentes suaves o desnaturizantes para liberar las proteínas asociadas estructuralmente. Estas proteínas se analizan adicionalmente para determinar la actividad de degradación de la pared o "lítica" en células bacterianas. Otro método es comprobar la actividad de degradación de la pared celular o la lisis desde sin (LO) en un huésped bacteriano resistente a los fagos. Un tercer método para evaluar la actividad de degradación de la pared o "lítica" asociada con el componente estructural del fago es realizar zimografías, por ejemplo cuando una preparación pura de fagos se somete a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida incorporando células bacterianas huésped esterilizadas en autoclave, Las proteínas en los geles se dejan renaturalizar in situ y después actuar sobre los componentes de la pared celular dando lugar a zonas claras "líticas" cuando el resto del gel se tiñe de azul con el colorante azul de metileno. Véase, por ejemplo, Lepeuple, et al, (1998) "Analysis of the bacteriolytic enzymes of the autolytic lactococcus lactis subsp. cremoris strain AM2 by renaturing polyacrylamide gel electrophoresis: identification of a prophage-encoded enzyme" Appl. Environ. Microbiol. 64:4142 - 428, PMID: 9797258. Las zonas claras se visualizan y la banda proteica de las zonas eluidas y la identidad se determinan mediante, por ejemplo, secuenciación en N-terminal o mediante espectrometría de masas. Después se pueden aislar los ORF que codifican las proteínas.

VIII. Aislamiento de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de degradación de la pared celular o de unión

30 Se han identificado ácidos nucleicos que codifican las proteínas "líticas" de la pared celular o de unión descritas anteriormente, por ejemplo los fagos K, Twort, G1 o phi11 de *Staph* y variantes modificadas de forma conservadora de dichas secuencias. Las proteínas "líticas" de la pared celular codificadas tienen actividad de degradación de la pared celular y las que codifican los dominios CHAP identificados son candidatos principales, especialmente aquellos en los que los dominios CHAP están en C proximal. Fuentes alternativas incluyen estructuras de tipo cola del fago (por ejemplo, piocinas o partículas de tipo fago defectuosas) o secuencias genómicas que poseen rasgos característicos de los elementos que contienen actividad "lítica", por ejemplo, que exhiben la organización génica característica de tales estructuras (véase, por ejemplo, Rybchin (1984) "Genetics of bacteriophage phi 80--a review" Gene 27:3 - 11; PMID: 6232171).

40 Los ejemplos de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos "líticos" de la pared celular también son relevantes para las realizaciones de ácido nucleico de la invención. Los expertos en la técnica reconocerán los métodos para la obtención de dichos ácidos nucleicos. Se pueden clonar ácidos nucleicos adecuados (por ejemplo, ADNc, genómicos o subsecuencias (sondas)) o amplificar mediante métodos in vitro tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS) o el sistema de replicación de secuencia autosostenida (SSR). Además de las metodologías sintéticas, los expertos en la técnica conocen bien una amplia variedad de metodologías de clonación y de amplificación in vitro. Ejemplos de estas técnicas e instrucciones suficientes para dirigir a los expertos a través de muchos ejercicios de clonación se encuentran en Berger Y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook, et al. (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2ª ed.) Vol. 1 - 3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, (Sambrook, et al.); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1994 Suplemento) (Ausubel); Cashion, et al., patente de EE.UU. Nº 5.017.478; y Carr, patente europea nº 0.246.864.

55 Un ADN que codifica un polipéptido de degradación de la pared celular se puede preparar mediante un método adecuado descrito anteriormente, incluyendo, por ejemplo, la clonación y la restricción de secuencias adecuadas con enzimas de restricción. En una realización preferida, los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que degradan la pared celular se aíslan mediante métodos de clonación de rutina. Una secuencia de nucleótidos de un polipéptido que degrada la pared celular según se proporciona, por ejemplo en el número de acceso YP_024486, se puede usar para proporcionar sondas que hibridan específicamente con un gen que codifica el polipéptido; o con un ARNm, que codifica una proteína de degradación de la pared celular, en una muestra de ARN total (por ejemplo, en una transferencia de tipo Southern o Northern). Una vez que se identifica el ácido nucleico diana que codifica una proteína "lítica" de la pared celular, se puede aislar de acuerdo con métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica (Véase, por ejemplo, Sambrook, et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., Vols. 1 - 3) Cold Spring Harbor Laboratory; Berger y Kimmel (1987) Methods in Enzymology, Vol. 152: Guide to Molecular Cloning Techniques, San Diego: Academic Press, Inc.; o Ausubel, et al. (1987) Current Protocols in Molecular

Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Además, los ácidos nucleicos aislados se pueden escindir con enzimas de restricción para crear ácidos nucleicos que codifican el polipéptido que degrada la pared celular de longitud completa, o subsecuencias de los mismos, por ejemplo, que contiene subsecuencias que codifican al menos una subsecuencia de un dominio catalítico de un polipéptido que degrada la pared celular. Estos fragmentos de enzimas de restricción, que codifican un polipéptido que degrada la pared celular o subsecuencias de los mismos, pueden ligarse después, por ejemplo, para producir un ácido nucleico que codifica un polipéptido que degrada la pared celular.

Se pueden usar métodos similares para generar fragmentos de unión a la pared celular adecuados o enlazadores entre los fragmentos. Los segmentos de unión con afinidad por las características de superficie prevalentes sobre las bacterias diana se pueden identificar e incluyen las de, por ejemplo, la ORF56 del fago K, lisostafina de *S. simulans*. L54a amidasa, amidasa del fago phi11, análogo de lisostafina de *S. aureus* ALE-1 (véase GI:3287732); segmentos del dominio SH3 bacteriano hallados en *Staph. aureus* NCTC 8325 autolisina (véase YP_500516), JH9 N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa de la familia 2 de *Staph. aureus* (véase ZP_01242312), Mu50 amidasa de *Staph. aureus* (véase NP_371437), amidasa relacionada con el fago RF122 de *Staph. aureus* (véase YP_417165), peptidoglicano hidrolasa de *Staph. aureus* (véase AAA26662), JCSC1435 N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa de *Staph. haemolyticus* (véase YP_254248), el producto proteico CAA29494 de *Staph. simulans*, proteínas de reconocimiento del peptidoglicano bacteriano (PGRP o PGLYRP, una familia grande de proteínas altamente conservadas halladas desde insectos a mamíferos que se unen al peptidoglicano bacteriano (PGN) de bacterias grampositivas y gramnegativas), y otras secuencias relacionadas, por ejemplo homólogos mediante secuencia o localización en los casetes génicos. Las paredes celulares bacterianas de diversas especies se han caracterizado y las proteínas que se unen a las mismas se notifican a menudo en, por ejemplo, PubMed. A menudo, las proteínas de unión poseerán homólogos procariotas de los dominios de homología 3 de Sarc (SH3). Los segmentos enlazadores de longitudes y propiedades adecuadas se pueden utilizar para conectar dominios de unión y dominios catalíticos. Véase, por ejemplo, Bae, et al. (2005) "Prediction of protein interdomain linker regions by a hidden Markov model" *Bioinformatics* 21:2264 - 2270; y George y Heringa (2003) "An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding" *Protein Engineering* 15:871 - 879.

Un ácido nucleico que codifica un polipéptido adecuado, o una subsecuencia del mismo, se puede caracterizar mediante el ensayo para el producto expresado. Se pueden usar ensayos basados en la detección de las propiedades físicas, químicas o inmunológicas del polipéptido expresado. Por ejemplo, se puede identificar un polipéptido que degrada la pared celular mediante la capacidad de un polipéptido codificado por el ácido nucleico para degradar o digerir las células bacterianas, por ejemplo, como se describe en el presente documento.

Asimismo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido deseado, o una subsecuencia del mismo, pueden sintetizarse químicamente. Los métodos adecuados incluyen el método del fosfotriéster de Narang, et al. (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 90 - 99; el método del fosfodiéster de Brown, et al. (1979) *Meth. Enzymol.* 68:109 - 151; el método de dietilfosforamida de Beaucage, et al. (1981) *Tetra. Lett.* 22:1859 - 1862; y el método de soporte sólido de la patente de EE.UU. Nº 4.458.066. La síntesis química produce un oligonucleótido monocatenario. Este se puede convertir en ADN bicatenario MEDIANTE hibridación con una secuencia complementaria, o mediante polimerización con una ADN polimerasa utilizando la cadena sencilla como molde. Un experto reconoce que mientras que la síntesis química de ADN a menudo está limitada a secuencias de aproximadamente 100 bases, se pueden obtener secuencias más largas mediante la ligación de secuencias más cortas.

Los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido deseado, o subsecuencias de los mismos, se pueden clonar usando métodos de amplificación de ADN tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Así, por ejemplo, la secuencia o subsecuencia de ácido nucleico se amplifica mediante PCR, utilizando un cebador sentido que contiene un sitio de enzima de restricción (por ejemplo, *NdeI*) y un cebador antisentido que contiene otro sitio de enzima de restricción (por ejemplo, *HindIII*). Esto producirá un ácido nucleico que codifica el polipéptido o subsecuencia deseados y que tiene sitios de enzimas de restricción terminal. Este ácido nucleico puede ligarse fácilmente después en un vector que contiene un ácido nucleico que codifica la segunda molécula y que tiene los correspondientes sitios de enzimas de restricción apropiados. Un experto en la técnica puede determinar los cebadores de PCR adecuados utilizando la información de secuencia proporcionada en GenBank u otras fuentes. También se pueden añadir sitios de enzimas de restricción adecuadas al ácido nucleico que codifica el polipéptido que degrada la pared celular o una subsecuencia de polipéptido del mismo mediante mutagénesis dirigida a sitio. El plásmido que contiene secuencia o subsecuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que degrada la pared celular se escinde con la endonucleasa de restricción apropiada y luego se liga en un vector apropiado para la amplificación y / o expresión de acuerdo con métodos convencionales. Ejemplos de técnicas suficientes para dirigir a los expertos a través de métodos de amplificación in vitro se encuentran en Berger, Sambrook, y Ausubel, así como Mullis, et al. (1987) patente de EE.UU. Nº 4.683.202; *PCR Protocols A Guide to Methods and Applications* (Innis, et al. eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim y Levinson (October 1, 1990) *C&EN* 36 - 47; *The Journal Of NIH Research* (1991) 3:81 - 94; (Kwoh, et al. (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:1173; Guatelli, et al. (1990) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 87:1874; Lomell, et al. (1989) *J. Clin. Chem.* 35:1826; Landegren, et al., (1988) *Science* 241:1077 - 1080; Van Brunt (1990) *Biotechnology* 8: 291 - 294; Wu y Wallace (1989) *Gene* 4: 560; y Barringer, et al. (1990) *Gene* 89:117.

Algunos ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que degradan la pared celular pueden amplificarse usando cebadores de PCR basados en la secuencia de los polipéptidos identificados.

5 Otras propiedades físicas, por ejemplo, de un polipéptido que degrada la pared celular recombinante expresado a partir de un ácido nucleico particular, se puede comparar con las propiedades de los polipéptidos deseados conocidos para proporcionar otro método de identificación de secuencias o dominios adecuados, por ejemplo, las proteínas que degradan la pared celular que son determinantes de la especificidad bacteriana, la especificidad de unión, y / o la actividad catalítica. Como alternativa, un posible polipéptido que degrada la pared celular que codifica ácido nucleico o un gen del polipéptido "lítico" de la pared celular recombinante y su papel como polipéptido que
10 degrada la pared celular o el papel de secuencias o dominios concretos establecidos detectando una variación en la "lisis" bacteriana potenciada normalmente por el polipéptido que degrada la pared celular sin mutar, de origen natural o control. Los expertos reconocerán que la mutación o modificación de los polipéptidos que degradan la pared celular de la invención se puede facilitar mediante técnicas de biología molecular para manipular los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos, por ejemplo, PCR. Otras técnicas de mutagénesis o barajado génico se
15 pueden aplicar a los fragmentos funcionales descritos en el presente documento, incluidas las actividades de degradación de la pared, propiedades de unión a la pared, o de enlazador compatibles con las construcciones quiméricas.

20 Los dominios funcionales de los polipéptidos de degradación de la pared celular recién identificados se pueden identificar mediante el uso de métodos convencionales para mutar o modificar los polipéptidos y analizarlos para determinar las actividades tales como la actividad del sustrato aceptor y / o la actividad catalítica, como se describe en el presente documento. Las secuencias de los dominios funcionales de las diversas proteínas de degradación de la pared celular se pueden usar para construir ácidos nucleicos que codifican o combinan dominios funcionales de uno o más polipéptidos que degradan la pared celular. Estas fusiones de polipéptidos de actividad múltiple pueden
25 analizarse después para determinar una actividad bactericida o bacteriostática deseada. Secuencias relacionadas basadas en la homología con actividades "líticas" identificadas pueden ser identificarse y seleccionarse según la actividad sobre sustratos apropiados. Los rasgos de organización génica de los fagos característicos de los polipéptidos hallados sobre las estructuras de fagos usados para unirse y penetrar en las estructuras de la pared celular, por ejemplo estructuras de casetes, pueden identificar nuevas secuencias que pueden poseer actividades de
30 unión y/o bactericidas o bacteriostáticos útiles en el ataque de la pared desde el exterior. Ejemplos concretos pueden incluir secuencias de profagos, incluyendo restos incompletos de los genomas de fagos funcionales, o estructuras de tipo piocina, incluyendo partículas derivadas de segmentos genéticos de tipo fago, por ejemplo, delección o restos genéticos mutados de fagos restantes en el ADN de una bacteria.

35 En un abordaje de ejemplo a la clonación de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de degradación de la pared celular, las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos conocidas de polipéptidos clonados se alinean y se comparan para determinar la cantidad de identidad de secuencia entre ellos. Esta información puede usarse para identificar y seleccionar dominios de polipéptidos que confieren o modulan las actividades de los polipéptidos que degradan la pared celular, por ejemplo, dirigidos a la especificidad bacteriana o de unión y/o la actividad de
40 degradación o "lítica" basada en la cantidad de identidad de secuencia entre los polipéptidos de interés. Por ejemplo, los dominios que tienen una identidad de secuencia entre los polipéptidos de interés que degradan la pared celular y que están asociados con una actividad conocida, se pueden usar para construir polipéptidos que contienen ese dominio y otros dominios, y que tienen la actividad asociada con ese dominio (por ejemplo, especificidad bacteriana o de unión y / o actividad de degradación de la pared). Se pueden aplicar estrategias similares para aislar dominios
45 SH3 bacterianos que se unen a las estructuras de la pared celular, proteínas que reconocen el peptidoglicano (PGRP), polipéptidos "líticos" de la cola de fago o a enlazadores para espaciar entre dominios.

IX. Expresión de polipéptidos deseados en células huésped

50 Las proteínas de degradación de la pared celular, u otras, de la invención se pueden expresar en diversas células huésped, incluyendo *E. coli*, otros huéspedes bacterianos, y levaduras. Las células huésped son, preferiblemente, microorganismos, tales como, por ejemplo, células de levadura, células bacterianas, o células fúngicas filamentosas. Ejemplos de células huésped adecuadas incluyen, por ejemplo, *Azotobacter sp.* (por ejemplo, *A. vinelandii*), *Pseudomonas sp.*, *Rhizobium sp.*, *Erwinia sp.*, *Escherichia sp.* (por ejemplo, *E. coli*), *Bacillus*, *Pseudomonas*,
55 *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, *Paracoccus* and *Klebsiella sp.*, entre muchos otros. Las células pueden ser de cualquiera de varios géneros, incluyendo *Saccharomyces* (por ejemplo, *S. cerevisiae*), *Candida* (por ejemplo, *C. utilis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. versatilis*, *C. lipolytica*, *C. zeylanoides*, *C. guilliermondii*, *C. albicans*, y *C. humicola*), *Pichia* (por ejemplo, *P. farinosa* y *P. ohmeri*), *Torulopsis* (por ejemplo, *T. candida*, *T. sphaerica*, *T. xylinus*, *T. famata*, y *T. versatilis*), *Debaryomyces* (por ejemplo, *D. subglobosus*, *D. cantarellii*, *D. globosus*, *D. hansenii*, y *D. japonicus*), *Zygosaccharomyces* (por ejemplo, *Z. rouxii* y *Z. bailii*), *Kluyveromyces* (e.g., *K. marxianus*), *Hansenula* (por ejemplo, *H. anomala* y *H. jadinii*), y *Brettanomyces* (por ejemplo, *B. lambicus* y *B. anomalus*). Ejemplos de bacterias útiles incluyen, entre otros, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Erwinia*,
60 *Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, y *Salmonella*.

65 Una vez expresados en una célula huésped, los polipéptidos que degradan la pared celular se pueden utilizar para prevenir el crecimiento de bacterias apropiadas. En una realización preferida, un polipéptido de ORF56 se utiliza

para disminuir el crecimiento de una bacteria *Staphylococcus*. En una realización preferida adicional, la proteína se usa para disminuir el crecimiento de una bacteria *S. aureus* u otra especie de *Staphylococcus* similar. Se pueden generar construcciones de fusión que combinan dichos fragmentos, incluyendo proteínas de fusión que comprenden una pluralidad de actividades de degradación de la pared, incluyendo actividades catalíticas tanto de peptidasa
 5 como de amidasa (que pueden escindir los enlaces Gly-Gly y Gly-ala), o la combinación de la actividad con un segmento dirigido que se une a estructuras de la pared celular. Las combinaciones de actividades de degradación pueden actuar sinérgicamente para efectuar la mejores actividades bacteriostáticas o bactericidas. Puede incorporarse un enlazador para proporcionar volumen adicional para los sitios catalíticos de alta concentración local cerca de la diana de unión.

10 Normalmente, un polinucleótido que codifica los polipéptidos que degradan la pared celular se coloca bajo el control de un promotor que es funcional en la célula huésped deseada. Se conoce bien una variedad extremadamente amplia de promotores y se pueden utilizar en vectores de expresión de la invención, dependiendo de la aplicación particular. Habitualmente, el promotor seleccionado depende de la célula en la que el promotor está para ser activo.
 15 Otras secuencias de control de la expresión tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de terminación de la transcripción y similares también se incluyen opcionalmente. Las construcciones que incluyen una o más de estas secuencias de control se denominan "casetes de expresión". Por consiguiente, la invención proporciona casetes de expresión en el que los ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión, por ejemplo, combinando un fragmento catalítico con un fragmento de unión, se incorporan para alto nivel de expresión en una célula huésped deseada.

20 Las secuencias de control de expresión que son adecuados para el uso en una célula huésped particular a menudo se obtienen por clonación de un gen que se expresa en esa célula. Secuencias de control procariontas de uso habitual, que en el presente documento se define que incluyen promotores para la iniciación de la transcripción, opcionalmente con un operador, junto con secuencias del sitio de unión al ribosoma, incluyen dichos promotores de
 25 uso habitual como los sistemas promotores de la beta-lactamasa (penicilinasa) y lactosa (*lac*) (Change, et al. (1977) Nature 198:1056), el sistema promotor del triptófano (*trp*) (Goeddel, et al. (1980) Nucleic Acids Res. 8:4057), el promotor *tac* (DeBoer, et al. (1983) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 80:21 - 25); y el promotor P_L derivado de lambda y el sitio de unión al ribosoma en el gen N (Shimatake, et al. (1981) Nature 292:128). El sistema promotor particular normalmente no es crucial para la invención, pueden usarse muchos promotores disponibles que funcionan en
 30 procariontas. En varios ejemplos se usa un promotor del bacteriófago T7.

Para la expresión de polipéptidos que degradan la pared celular en células procariontas distintas de *E. coli*, se usa un promotor que funciona en las especies procariontas concretas de producción. Tales promotores pueden obtenerse a
 35 partir de genes que se han clonados a partir de las especies o se pueden usar promotores heterólogos. Por ejemplo, el promotor *trp-lac* híbrido funciona en *Bacillus* además de en *E. coli*.

Un sitio de unión al ribosoma (RBS) está convenientemente incluido en los casetes de expresión de la invención. Un RBS de ejemplo en *E. coli* consiste en una secuencia de nucleótidos de 3-9 nucleótidos de longitud localizada 3-11
 40 nucleótidos aguas arriba del codón de iniciación (Shine y Dalgarno (1975) Nature 254:34; Steitz in Goldberger (ed. 1979) Biological regulation and development: Gene expression (vol. 1, p. 349) Plenum Publishing, NY).

Para la expresión de proteínas en la levadura, promotores convenientes incluyen GAL1 - 10 (Johnson y Davies (1984) Mol. Cell. Biol. 4:1440 - 1448) ADH2 (Russell, et al. (1983) J. Biol. Chem. 258:2674 - 2682), PHO5 (EMBD J. (1982) 6:675 - 680), y MF α (Herskowitz y Oshima (1982) en Strathern, et al. (eds.) The Molecular Biology of the
 45 Yeast *Saccharomyces* Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 181 - 209). Otro promotor adecuado para su uso en levaduras es el promotor híbrido ADH2 / GAPDH como se describe en Cousens, et al. (1987) Gene 61:265 - 275 (1987). Para hongos filamentosos tales como, por ejemplo, las cepas de los hongos *Aspergillus* (McKnight, et al., patente de EE.UU. N1 4.935.349), ejemplos de promotores útiles incluyen los derivados de los genes glicolíticos de *Aspergillus nidulans*, tales como el promotor ADH3 (McKnight, et al. (1985) EMBO J. 4:2093 -
 50 2099) y el promotor *tpiA*. Un ejemplo de un terminador adecuado es el terminador ADH3 (McKnight, et al.).

En la presente invención se pueden usar promotores constitutivos o regulados. Los promotores regulados pueden ser ventajosos porque las células huésped pueden cultivarse a altas densidades antes de inducir la expresión de las
 55 proteínas de fusión. Un nivel de expresión de polipéptidos heterólogos elevado ralentiza el crecimiento celular en algunas situaciones. Un promotor inducible es un promotor que dirige la expresión de un gen en el que el nivel de expresión es alterable por factores ambientales o de desarrollo tales como, por ejemplo, la temperatura, el pH, las condiciones anaerobias o aerobias, la luz, los factores de transcripción y las sustancias químicas. Dichos promotores se denominan en el presente documento promotores "inducibles", que le permiten controlar el momento de la
 60 expresión del polipéptido deseado. Para *E. coli* y otras células huésped bacterianas, los expertos en la técnica conocen los promotores inducibles. Estos incluyen, por ejemplo, el promotor *lac*, el promotor P_L del bacteriófago lambda, el promotor híbrido *trp-lac* (Amann, et al. (1983) Gene 25:167; de Boer, et al. (1983) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 80:21), y el promotor del bacteriófago T7 (Studier, et al. (1986) J. Mol. Biol.; Tabor, et al. (1985) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1074 - 78). Estos promotores y su uso se analizan en Sambrook, et al., citado anteriormente.

65 Una construcción que incluye un polinucleótido de interés unido operativamente a señales de control de la expresión de genes que, cuando se coloca en una célula huésped apropiada, dirige la expresión del polinucleótido de

denomina "casete de expresión." Los casetes de expresión que codifican las proteínas de fusión de la invención se colocan a menudo en vectores de expresión para la introducción en la célula huésped. Los vectores incluyen normalmente, además de un casete de expresión, una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse independientemente en una o más células huésped seleccionadas. Generalmente, esta secuencia es una que permite que el vector se replique de forma independiente del ADN cromosómico del huésped e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónomas. Dichas secuencias son bien conocidas para diversas bacterias. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias gramnegativas. Como alternativa, el vector puede replicarse al integrarse en el complemento genómico de la célula huésped y se replica cuando la célula sufre la replicación del ADN.

La fabricación de construcciones de polinucleótidos generalmente requiere el uso de vectores capaces de replicarse en bacterias. Una plétora de kits están disponibles comercialmente para la purificación de plásmidos a partir de bacterias (véase, por ejemplo, EasyPrepJ, FlexiPrepJ, ambos de Pharmacia Biotech; StrataCleanJ, de Stratagene; y QIAexpress Expression System, Qiagen). Los plásmidos aislados y purificados se pueden manipular adicionalmente para producir otros plásmidos y se utilizan para transfectar células. También es posible la clonación en *Streptomyces* o *Bacillus*.

A menudo se incorporan marcadores seleccionables en los vectores de expresión usados para expresar los polinucleótidos de la invención. Estos genes pueden codificar un producto génico, tal como un polipéptido, necesario para la supervivencia o crecimiento de células huésped transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Las células huésped no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican polipéptidos que confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas, tales como ampicilina, neomicina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Como alternativa, los marcadores seleccionables pueden codificar proteínas que complementan deficiencias auxotróficas o suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para *Bacilli*. A menudo, el vector tendrá un marcador seleccionable que es funcional en, por ejemplo, *E. coli*, u otras células en las que el vector se replica antes de su introducción en la célula huésped. Los expertos en la técnica conocen una serie de marcadores seleccionables se describen en, por ejemplo, Sambrook, et al., citado anteriormente.

La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los enumerados anteriormente emplea técnicas de ligación estándar como se describe en las referencias citadas anteriormente. Los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se escinden, se adaptan y se vuelven a ligar en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos. Para confirmar las secuencias correctas en los plásmidos construidos, los plásmidos se pueden analizar mediante técnicas estándar, tales como mediante digestión con endonucleasas de restricción, y / o secuenciación de acuerdo con métodos conocidos. Las técnicas de clonación molecular para conseguir estos extremos se conocen en la técnica. Los expertos en la técnica conocen en una amplia variedad de métodos de clonación y amplificación *in vitro* adecuados para la construcción de ácidos nucleicos recombinantes. Ejemplos de estas técnicas e instrucciones suficientes para dirigir a los expertos a través de muchos ejercicios de clonación se encuentra en Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); y Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1998 Suplemento) (Ausubel).

Diversos vectores frecuentes adecuados para su uso como materiales de partida para la construcción de los vectores de expresión de la invención son bien conocidos en la técnica. Para la clonación en bacterias, los vectores frecuentes incluyen vectores derivados de pBR322, tales como pBLUESCRJPT™ y vectores derivados del fago λ. En levaduras, los vectores incluyen plásmidos de integración en levadura (por ejemplo, YIp5) y plásmidos de replicación en levaduras (los plásmidos de la serie YRp) y PGPD-2. La expresión en células de mamífero se puede lograr usando diversos plásmidos disponibles habitualmente, incluyendo pSV2, pBC12BI, y p91023, así como vectores de virus líticos (por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus, y baculovirus), vectores de virus episomal (por ejemplo, virus del papiloma bovino) y vectores retrovirales (por ejemplo, retrovirus murinos).

Los métodos para introducir los vectores de expresión en una célula huésped seleccionada son normalmente convencionales y tales métodos son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los vectores de expresión pueden introducirse en células procariontas, incluyendo *E. coli*, mediante transformación con cloruro de calcio, y en células eucariotas mediante el tratamiento con fosfato de calcio o electroporación. También son adecuados otros métodos de transformación.

Se puede usar el acoplamiento de la traducción para potenciar la expresión. La estrategia utiliza un marco de lectura abierto corto aguas arriba derivado de un gen altamente expresado nativo para el sistema de traducción, que se coloca aguas abajo del promotor, y un sitio de unión al ribosoma seguido después de unos pocos codones de aminoácidos por un codón de terminación. Justo antes del codón de terminación es un segundo sitio de unión al ribosoma y después del codón de terminación es un codón de inicio para la iniciación de la traducción. El sistema disuelve la estructura secundaria en el ARN, permitiendo la iniciación eficaz de la traducción. Véase Squires, et al. (1988) J. Biol. Chem. 263: 16297 - 16302.

Los diversos polipéptidos de la invención pueden expresarse intracelularmente o pueden secretarse desde la célula. La expresión intracelular a menudo resulta en altos rendimientos. Si es necesario, la cantidad de polipéptido de fusión soluble activo puede aumentarse mediante la realización de procedimientos de replegamiento (véase, por ejemplo, Sambrook, et al., citado anteriormente; Marston, et al. (1984) *Bio/Technology* 2:800; Schoner, et al. (1985) *Bio/Technology* 3:151). En realizaciones en las que el polipéptido deseado se secreta desde la célula, ya sea en el periplasma o en el medio extracelular, la secuencia de ADN a menudo se une a una secuencia de péptido señal escindible. La secuencia señal dirige la translocación del polipéptido de fusión a través de la membrana celular. Un ejemplo de un vector adecuado para su uso en *E. coli* que contiene una unidad de secuencia señal-promotor es pTA1529, que tiene el promotor *phoA* de *E. coli* y la secuencia señal (véase, por ejemplo, Sambrook, et al., citado anteriormente, Oka, et al. (1985) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:7212; Talmadge, et al. (1980) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 77:3988; Takahara, et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2670). En otra realización, los polipéptidos de fusión se fusionan a una subsecuencia de la proteína A o seroalbúmina bovina (BSA), por ejemplo, para facilitar la purificación, la secreción, o la estabilidad. Los métodos de afinidad, por ejemplo usando la diana del fragmento de unión, pueden ser adecuados.

Los polipéptidos que degradan la pared celular de la invención también se pueden unir además a otros segmentos polipeptídicos bacterianos, por ejemplo, fragmentos dirigidos. Este enfoque a menudo resulta en altos rendimientos, porque las secuencias de control procariontas normales dirigen la transcripción y la traducción. En *E. coli*, las fusiones de *lacZ* se utilizan a menudo para expresar proteínas heterólogas. Los vectores adecuados están fácilmente disponibles, tales como ePUR, pEX, y la serie depMR100 (véase Sambrook, et al., citado anteriormente). Para ciertas aplicaciones, puede ser deseable escindir la secuencia extraña desde el polipéptido de fusión después de la purificación. Esto se puede lograr por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica, incluyendo la escisión mediante bromuro de cianógeno, una proteasa, o mediante el Factor (véase, por ejemplo Sambrook, et al., citado anteriormente; Itakura, et al. (1977) *Science* 198:1056; Goeddel, et al. (1979) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 76:106; Nagai, et al. (1984) *Nature* 309:810; Sung, et al. (1986) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:561). Los sitios de escisión pueden modificarse en el gen para el polipéptido de fusión en el punto de escisión deseado.

Más de un polipéptido recombinante se puede expresar en una sola célula huésped mediante la colocación de múltiples casetes de transcripción en un único vector de expresión, o mediante la utilización de diferentes marcadores seleccionables para cada uno de los vectores de expresión que se emplean en la estrategia de clonación.

Un sistema adecuado para obtener proteínas recombinantes a partir de *E. coli* que mantiene la integridad de su extremo N se ha descrito en Miller, et al. (1989) *Biotechnology* 7:698 - 704. En este sistema, el gen de interés se produce como una fusión C-terminal a los primeros 76 residuos del gen de la ubiquitina de levadura que contiene un sitio de escisión de peptidasa. La escisión en la unión de los dos restos tiene como resultado la producción de una proteína que tiene un auténtico residuo en N-terminal intacto.

X. Purificación de polipéptidos deseados

Los polipéptidos de la presente invención pueden expresarse como proteínas intracelulares o como proteínas que son secretadas desde la célula, pueden utilizarse en esta forma, en los métodos de la presente invención. Por ejemplo, un extracto celular crudo que contiene los polipéptidos intracelulares expresados o secretados se puede utilizar en los métodos de la presente invención.

Como alternativa, los polipéptidos pueden purificarse de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase, en general, Scopes (1982) *Protein Purification* Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher (1990) *Methods in Enzymology* (vol. 182) *Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc. NY). Debido a que los segmentos degradantes, al menos, derivan de proteínas del fago seleccionadas según la estabilidad, la purificación puede hacer uso de estas propiedades para desnaturalizar materiales contaminantes. Los más preferidos son las composiciones sustancialmente puras de al menos aproximadamente 70, 75, 80, 85, se prefieren 90 % de homogeneidad, y aproximadamente de 92, 95, 98 a 99 % o más homogeneidad. Los polipéptidos purificados también se pueden utilizar, por ejemplo, como inmunógenos para la producción de anticuerpos, anticuerpos que se pueden usar en métodos de purificación por inmunoselección.

Para facilitar la purificación de los polipéptidos de la invención, los ácidos nucleicos que los codifican también puede incluir una secuencia de codificación para un epítipo o "marcador" para el que un reactivo de unión por afinidad está disponible, por ejemplo, un marcador de purificación. Ejemplos de epítopos adecuados incluyen los genes indicadores myc y V-5; vectores de expresión útiles para la producción recombinante de polipéptidos de fusión que tienen estos epítopos están disponibles comercialmente (por ejemplo, los vectores pcDNA3,1/Myc-His y pcDNA3,1/V5-His de Invitrogen (Carlsbad CA) son adecuados para la expresión en células de mamífero). Los vectores de expresión adicionales adecuados para unir un marcador a los polipéptidos de la invención y los correspondientes sistemas de detección son conocidos para los expertos en la técnica y varios están disponibles comercialmente (por ejemplo, FLAG, Kodak, Rochester NY). Otro ejemplo de un marcador adecuado es una secuencia de polihistidina, que es capaz de unirse a ligandos de afinidad de quelato de metal. Normalmente se usan

seis histidinas adyacentes, aunque se puede utilizar más o menos de seis. Los ligandos de afinidad de quelatos metálicos adecuados que pueden servir como resto de unión para un marcador de polihistidina incluyen ácido acético-nitrilo tri-acético (NTA) (Hochuli "Purification of recombinant proteins with metal chelating adsorbents" en Setlow (ed. 1990) Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, NY; disponible comercialmente en Qiagen (Santa Clarita, CA)). Los marcadores de purificación también incluyen dominios de unión a maltosa y dominios de unión a almidón. La purificación de proteínas del dominio de unión a maltosa es bien conocida para los expertos en la técnica.

Otros haptenos que son adecuados para su uso como marcadores son conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en el Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6ª ed., Molecular Probes, Inc., Eugene OR). Por ejemplo, dinitrofenol (DNP), digoxigenina, barbitúricos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.414.085), y varios tipos de fluoróforos son útiles como haptenos, como lo son los derivados de estos compuestos. Los kits están disponibles comercialmente para la unión de haptenos y otros restos a proteínas y otras moléculas. Por ejemplo, cuando el hapteno incluye un tiol, un enlazador heterobifuncional tal como SMCC se puede utilizar para fijar el marcador a residuos de lisina presentes en el reactivo de captura.

Un experto reconocería que se pueden hacer ciertas modificaciones en los dominios catalíticos o funcionales del polipéptido sin disminuir su actividad biológica. Se pueden realizar algunas modificaciones para facilitar la clonación, expresión, o incorporación del dominio catalítico en un polipéptido de fusión. Dichas modificaciones son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la adición de codones en cualquier extremo terminal del polinucleótido que codifica el dominio catalítico, por ejemplo, una metionina añadida en el extremo amino para proporcionar un sitio de iniciación, o aminoácidos adicionales (por ejemplo, poli His) colocados en cualquier extremo para crear sitios para enzimas de restricción localizados convenientemente o codones de terminación o secuencias de purificación.

Cabe destacar que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "uno", "una" y "el" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un bacteriófago" incluye una pluralidad de dichos bacteriófagos y una referencia a "una bacteria huésped" incluye la referencia a uno o más bacterias huésped y equivalentes de las mismas conocidas para los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

Las publicaciones descritas en el presente documento se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. En el presente documento nada se tiene que interpretar como admisión de que la presente invención no tiene el derecho de antedatar dicha divulgación en virtud de la invención previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar confirmarse de forma independiente. Las citas se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

Aunque la invención anterior se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de entendimiento, a la luz de las enseñanzas de la presente invención es fácilmente evidente para un experto en la técnica que se pueden realizar ciertos cambios y modificaciones sin desviarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

I. ORF56 de longitud completa

Número de Acceso YP_024486 notificó un ORF56 putativo hallado en un fago K de *Staphylococcus*. Según este informe, un ORF56 del fago k de longitud completa se amplificó por PCR a partir de una fuente de fago apropiada. Usando cebadores específicos de genes con un sitio NdeI en el cebador directo y XhoI en el cebador inverso, este producto de PCR se clonó en un vector PET21 bajo un promotor de T7 como un inserto de NdeI-XhoI. Este clon se denominó pGMB617 y contenía la región de codificación correspondiente a los aminoácidos 1 a 808 del producto esperado (SEC ID N° 1), que debería producir un producto proteico de aproximadamente 91 kDa.

A. Dominio CHAP

El informe que describe el número de acceso YP_024486 identificó un dominio descrito como una aminohidrolasa / peptidasa dependiente de cisteína-histidina (CHAP). Véase, por ejemplo, Rigden, et al. (2003) Trends Biochem. Sci. 28:230 - 234. Ciertos genes reconocidos como que contienen actividades líticas poseen dominios CHAP, generalmente con el dominio en la región N proximal de los polipéptidos codificados. El dominio CHAP está en la región C proximal de la ORF56 C putativa y debe corresponder a los aminoácidos designados desde aproximadamente los aminoácidos 690 a 805.

B. Producto de degradación

Sin embargo, después de la producción y purificación, los productos proteicos de aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 23 kDa estaban presentes en cantidades sustanciales como se observa mediante PAGE. Estos parecían representar los productos de degradación estables de la proteína de 91 kDa expresada original.

II. Especies diana de Staphylococcus

Las construcciones de proteína purificada se analizaron inicialmente para determinar la disminución de las UFC (unidades formadoras de colonias) en un aislado de *Staphylococcus aureus*. Ciertas construcciones se analizaron adicionalmente para determinar la disminución de las UFC en aislados de *S. epidermidis*, *S. lentis*, y *S. carnosus*. Parece que las actividades líticas observadas aquí son menos específicas de cepa que muchas selectividades de infección con fagos. Por lo tanto, es probable que el uso de las actividades líticas descritas en el presente documento también exhibirán múltiples especificidades de cepa e incluso puede ser amplia a través de muchos géneros o otras clases funcionales o estructurales de bacterias, por ejemplo, todas grampositivas, incluso incluidas algunas o todas gramnegativas. Además, las actividades líticas también pueden ser genéricas para las características estructurales compartidas entre las clases grampositivas y gramnegativas. Por ejemplo, algunas características de las paredes celulares de las bacterias gramnegativas internas pueden ser compartidas con las paredes celulares grampositivas.

III. Construcciones de truncamiento

La región descrita como ORF56 hipotético tiene un sitio PstI interno único, cuyo uso podría generar fácilmente una construcción que proporcionaría aproximadamente 57 kDa de la región C terminal de la proteína desde aproximadamente los aminoácidos 297 a 808 de la SEC ID N° 1. Desde el clon de longitud completa ORF56 descrito anteriormente, se escindió un fragmento PstI-HindIII que codifica la porción C terminal del marco de lectura. El fragmento PstI-HindIII se clonó en un vector pRSETA generando la construcción del clon pRSETA-57 kDa (PGMB 599) ORF6. A partir de este se escindió un fragmento NdeI-HindIII que se clonó en un vector pET21 como NdeI-HindIII para generar PGMB 612. Este clon expresó la proteína de 57 kDa (esperada), así como proteínas de aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 23 kDa. Las proteínas más pequeñas son, inesperadamente, productos de degradación aparentemente estables de aproximadamente el mismo tamaño a partir de la construcción que expresa la proteína de longitud completa de 91 kDa.

Se construyó una secuencia de ADN para producir una porción en C terminal DE 50 kDa de la región putativa ORF56 correspondiente a aproximadamente los aminoácidos 363-808 de la SEC ID N° 1. Un producto de PCR amplificado se generó usando cebadores específicos apropiados. El producto de PCR tenía un sitio NdeI en el cebador directo y un sitio XhoI en el cebador inverso, y el fragmento NdeI-XhoI resultante se clonó en el vector PET2 para incorporar un inserto NdeI-XhoI. Este producto se denominó pGDC060 / 061. Esta construcción expresó una proteína de 50 kDa (como estaba previsto) y una proteína de aproximadamente 23 kDa. Una vez más, la proteína más pequeña es, de forma inesperada, aparentemente una proteína ORF56 degradada estable de aproximadamente el mismo tamaño que la observada para las construcciones de la proteína ORF56 de longitud completa de 91 kDa y la proteína ORF56 de 57 kDa truncada.

Se generó una construcción de ADN para producir la porción en C terminal de kDa de la proteína ORF56 correspondiente a aproximadamente Met- (aminoácidos 603-808). La secuencia de ADN del ORF56 que codifica los 23 kDa de la región en C terminal se amplificó por PCR mediante la introducción de un codón de iniciación ATG en el cebador directo. El producto de PCR se clonó en pET21a como un fragmento NdeI-XhoI para generar una construcción denominada pGDC070. Esta construcción expresó proteínas que corren a aproximadamente 27 kDa en SDS PAGE y otra proteína que corre a aproximadamente 23 kDa. En el almacenamiento a 4 °C, las dos formas se unen en una sola banda de aproximadamente 23 kDa.

Se generó una construcción de ADN para producir un fragmento en C terminal de 19 kDa de la proteína ORF56 correspondiente a aproximadamente los aminoácidos 620 a 808. La secuencia de ADN correspondiente a la misma se amplificó utilizando cebadores específicos y se clonó en pET21a como inserto de NdeI-XhoI. La construcción resultante se denominó pGDC089. Esta construcción expresó una única proteína que corrió en el SDS PAGE a aproximadamente 21 kDa, aproximadamente igual que el producto de degradación estable observado de las construcciones descritas anteriormente.

Estas diversas construcciones sugieren que el producto proteico de 91 kDa de longitud completa no es particularmente estable en las condiciones utilizadas. Aparecen dos productos de degradación razonablemente estables, primero una proteína de 50 kDa, y luego una proteína de 23 kDa. La degradación, ya sea de una actividad exoproteasa rápida, de una actividad endoproteasa, o de una combinación de ambos es todavía poco clara. Sin embargo, sí parece que las diferentes construcciones se degradan hasta una proteína ORF56 estable de 23 kDa truncada.

IV. Actividad antimicrobiana de las proteínas purificadas

Los diversos truncamientos y / o productos de degradación de ORF56 se analizaron para determinar la actividad lítica utilizando un ensayo que determinó la disminución de las UFC (unidades formadoras de colonias) de cultivos de bacterias *Staphylococcus aureus*. En todos los casos, los truncamientos o productos de degradación de ORF56 mostraron una capacidad significativa para disminuir las UFC de *S. aureus* en solución, lo que sugiere que todas las construcciones y los productos de degradación estables conservan actividad lítica en las paredes celulares. La característica estructural común en todas las construcciones es la región C terminal, incluyendo el dominio CHAP.

V. Genes Homólogos candidatos con CHAP dominios a para analizar su actividad lítica

La actividad bactericida de ORF56 se correlacionó con el dominio CHAP en C. Por lo tanto, se utilizó una búsqueda BLAST para identificar actividades "líticas" adicionales en los genomas de fagos secuenciados. Otras fuentes útiles de estos segmentos "líticos" incluyen componentes que intervienen en la penetración del genoma del fago en huéspedes, por ejemplo, derivados de colas o componentes de unión utilizados por fagos para unirse a los huéspedes diana o del profago o de estructuras de tipo plocina. Además, las denominadas actividades "líticas" pueden identificarse como que están en los segmentos de codificación para los casetes de la cola del fago, por ejemplo según la organización característica de los genes.

Las búsquedas se realizan utilizando el dominio CHAP u otras características. En particular, esos genes en los que el dominio CHAP está en la región C-terminal del ORF es más probable que sean relevantes para esta actividad. De particular interés son las proteínas que contienen el dominio CHAP de los fagos K, Twort y G1 estafilocócicos.

VI. Construcciones quiméricas

Se han realizado una serie de construcciones de fusión uniendo un fragmento catalítico que actúa sobre la pared celular de las cepas de estafilococos diana a un fragmento dirigido que se une a una entidad de la superficie celular. El resto de unión proporciona la localización selectiva en la superficie de la bacteria diana apropiada, y la actividad catalítica actúa sobre los sitios de sustrato cercanos. Se puede incorporar un enlazador, lo que permite una región más amplia de accesibilidad del sustrato (región de alta concentración de sitio activo). Podrían usarse diferentes grupos de unión que reconocen marcadores de superficie celular bacteriana altamente accesibles, altamente expresados, o selectivos. Se pueden encontrar segmentos de unión marcadores de la pared celular de gramnegativas a partir de proteínas derivadas de la bacteria huésped, y los segmentos de unión marcadores pared de gramnegativas similares se pueden encontrar a partir de proteínas usadas por ellos para controlar la estructura de la pared celular. Fagos específicos para los huéspedes también deben tener polipéptidos de la cola que reconocen y se unen a su respectiva pared de la célula huésped. Las proteínas de reconocimiento de peptidoglicano (PGRP) de fuentes que van de eucariotas inferiores a superiores y otras proteínas de unión que se unen con afinidad a paredes celulares de bacterias concretas preferiblemente en condiciones y formas fisiológicas, serán fuentes de fragmentos de actividad de unión adecuados. En algunas circunstancias, podría emplearse una pluralidad de restos diferentes. Los enlazadores pueden seleccionarse por su capacidad para permitir que los otros fragmentos se plieguen correctamente sin interferencias al tiempo que proporcionan una sujeción para aumentar la concentración catalítica local cerca de sustratos apropiados. Los fragmentos catalíticos pueden dirigirse a los sustratos preferidos, y una pluralidad de fragmentos puede dirigirse a diferentes enlaces que se encuentran en las bacterias diana.

En particular, al dirigirse a las dianas grampositivas, los segmentos de unión se originarían preferiblemente de proteínas que reconocen la pared celular extracelular como la "exhiben" fisiológicamente las bacterias. Así, las proteínas que reconocen las paredes celulares de gramnegativos pueden incluir componentes del sistema inmunológico que reconocen estos agentes infecciosos. Una fuente apropiada para los dominios de degradación de la pared celular serán estructuras de la cola de los fagos que infectan huéspedes gramnegativos. Asimismo, para los grampositivos, los dominios de unión pueden derivar de las estructuras de la cola de fagos que infectan grampositivos o de los PGRP para las bacterias gramnegativas. Las actividades de degradación de la pared pueden derivar de las estructuras de la cola que infectan huéspedes gramnegativos. En la medida en que las micobacterias, esporas, u otros procariontes u organismos relacionados comparten la estructura de la pared celular, estos reactivos pueden ser útiles para modular su crecimiento.

Además, debido a los procesos de selección de fagos que infectan a huéspedes particulares, los fagos que se dirigen a los huéspedes diana que viven en condiciones extremas, termófilos, halófilos, condiciones de especies de alta oxidación o reactivas, pH extremos, ambientes altamente proteolíticos y similares son fuentes particularmente interesantes para los fragmentos catalíticos o de unión útiles. Las proteínas que están expuestas al ambiente externo fuera de la célula (anhelando entrar) deben tener características muy evolucionadas para sobrevivir fuera del ambiente intracelular relativamente seguro. Como tal, esta estabilidad a las condiciones hostiles seleccionará las características estructurales del dominio que proporcionarán una gran estabilidad al producto. Y el producto deberá tener buenas propiedades de almacenamiento, se puede seleccionar según la supervivencia farmacológica y la vida, y puede proporcionar medios sencillos para la purificación y aislamiento.

Se realizaron construcciones que comprendían varios segmentos de la secuencia de ORF56 (véase GeneID 2948023, YP_024486, YP_024486,1); el fragmento de 16 KDa correspondiente a aa669 - 808; el fragmento de 19 KDa correspondiente a aa629 - 808; el fragmento de 13 KDa correspondiente a aa691 - 808; y el fragmento de unión de ORF56 correspondiente a aa629 - 690. Los segmentos de lisostafina de *Staphylococcus* (lss; AAB53783) incluyen el fragmento de unión correspondiente a aa395 - 493; y el fragmento catalítico (escisión lys-lys) correspondiente a aa248 - 394. Un fragmento de unión de L54a amidasa (AAW38858; YP_185281) corresponde a aa376 - 484. Un fragmento catalítico de LytM peptidasa (L77194; AAV62278,1) corresponde a aa223 - 322. Un fragmento de amidasa del fago phi11 (NP_803306; AAL82281; véase 40893 - 42365 of AF424781,1) corresponde a aa391 - 490. Las construcciones estaban dirigidas por un promotor de T7.

Se realizó una serie de construcciones de fusión: La construcción 1 tiene la secuencia Met (fragmento catalítico de 16 KDa ORF56)-Leu-Glu (fragmento de unión de lisostafina) y el producto proteico resultante se denomina quimera 128 (SEC ID N° 4). La construcción 2 tiene la secuencia (fragmento catalítico de 19 KDa ORF56)-Leu-Glu (fragmento de unión de lisostafina). La construcción 3 tiene la secuencia (fragmento catalítico de 13 KDa ORF56)-Leu-Glu (fragmento de unión de lisostafina). La construcción 4 tiene la secuencia (fragmento catalítico de 16 KDa ORF56)-Leu-Glu (fragmento de unión de L54a amidasa). La construcción 5 tiene la secuencia Met (fragmento catalítico de LytM peptidasa)-Leu-Glu (fragmento de unión de lisostafina). La construcción 6 tiene la secuencia Met (fragmento catalítico de lisostafina) (fragmento de unión de ORF56). La construcción 7 tiene la secuencia (fragmento catalítico de LytM peptidasa)-Construcción 1, que tiene dos dominios catalíticos (LytM peptidasa, ORF56). La construcción 8 tiene la secuencia Met-16-fragmento catalítico de 6 KDa ORF56)-Leu-Glu (fragmento de unión de phi11 amidasa). Del mismo modo, se pueden utilizar otros fragmentos catalíticos o de unión de otras fuentes, o se pueden generar variantes de estos y optimizar para las características deseadas.

La construcción 1 se produjo en el huésped apropiado, y el huésped se lisó incluyendo una etapa de sonicación. Métodos similares se aplican para las otras construcciones. El lisado bruto se purificó por precipitación con sulfato de amonio (20-50 %), cromatografía de columna Q-500 (pH 7,5), cromatografía de celulosa CM (pH 6,0) usando NaCl 200 mM para la elución, y filtración en gel. El producto se estimó que tenía una pureza > 98 % de pureza mediante tinción con plata.

VII. Análisis de la actividad

El producto de la construcción 1, quimera 128, se analizó en un panel de 30 cepas de distinto tipado de *Staphylococcus aureus*, seleccionada para los tipos spa, Agr, o Mec e incluyendo MLST y resistencia a la meticilina. La quimera 128 era activa en estas cepas analizadas y la inhibición de la manta se observó con manchas de 1,5 microgramos de proteína. Usando una cepa B911 de MRSA a aproximadamente 1E8 UFC, la proteína ORF56 de longitud completa a 50 microgramos disminuyó las UFC en aproximadamente 2 unidades logarítmicas, mientras que la quimera 128 a 1,5 microgramos redujo las UFC en aproximadamente 5 unidades logarítmicas (10.000 veces). En varias cepas representativas de *Staph. aureus* en 5E5 células / ml en caldo de Mueller Hinton que contiene 1 % de BSA (véase Kusuma y Kokai-Kun (2005) "Comparison of four methods for determining lysostaphin susceptibility of various strains of *Staphylococcus aureus*" Antimicrob. Agents Chemother. 49:3256 - 263; PMID: 16048934) incubadas a 35 °C, las colonias estaban estáticas durante 16 horas. La concentración inhibitoria mínima (CIM) para la quimera 128 era de aproximadamente 1-10 microgramos / ml. Las pruebas de los supervivientes de la cepa COL de *S. aureus* a una primera exposición con la quimera 128 se analizaron y se encontró que los supervivientes eran sensibles a la proteína en la reexposición. Las pruebas de una variante resistente a lisostafina de la cepa B911 *S. aureus* mostraron que el 99,9 % de las células eran susceptibles a 1,5 microgramos de la proteína quimera 128.

La quimera 128 es estable en tampón Tris a 4 °C durante al menos un mes, aproximadamente 4 semanas a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), y alrededor de 1 día a 37 °C. Determinados formulaciones en gel y líquidas tenían duraciones de estabilidad mucho más largas.

Construcciones adicionales de la quimera se analizaron para determinar la actividad usando ensayos de inhibición de manta, zimografías y ensayos de reducción de las unidades formadoras de colonias (UFC). Un ensayo de inhibición de la manta es un ensayo cualitativo en el que las proteínas de ensayo se pasan a una manta de bacterias y se miden las zonas de inhibición de crecimiento. La actividad bactericida se corresponde a una zona de inhibición en la manta; nada de actividad corresponde a una zona sin inhibición visible. Una zimografía también es un ensayo cualitativo en el que un gel de SDS-PAGE se impregna con células bacterianas diana sometidas a autoclave y una preparación de fagos se somete a electroforesis a través del gel. Las proteínas en los geles se dejan renaturalizar in situ y después actuar sobre los componentes de la pared celular dando lugar a zonas claras "líticas" después de teñir el gel con el colorante azul de metileno. Véase, por ejemplo, Lepeuple, et al. (1998) Appl. Environ. Microbiol. 64:4142 - 428, PMID: 9797258. La actividad corresponde a zonas claras visibles sobre un fondo azul oscuro. El ensayo de reducción de las UFC es un ensayo cuantitativo en el que la actividad se mide mediante el porcentaje de muerte. Los cultivos bacterianos se mezclan con las proteínas quimera y se sembraron en medio LB. La actividad corresponde a la reducción en el número de células en al menos un 99,9 %. Ausencia de actividad corresponde a ausencia de reducción en el número de células. En cada ensayo se realizan controles positivos y negativos apropiados. Los resultados para una serie de proteínas quiméricas se muestran en la Tabla 1. Se demostró actividad para una serie de proteínas TAME-CBD que comprendían un dominio muralítico de ORF56, también denominado

dominio catalítico (CD). Una proteína TAME-CDB que formaba lisostafina CD y un dominio de unión de ORF56 también tenía actividad bactericida.

TABLA 1

QUIMERA	Inhibición de la manta	Zimograma	Ensayo de disminución de UFC
ORF56 de 16 kDa-BD de Lisostafina	Activa	Activa	Activa
ORF56 de 19kDa-BD de Lisostafina	Activa	Activa	Activa
ORF56 de 16 kDa-BD de Lys17	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad
ORF56 de 16kDa- BD de L54a amidasa	Activa	Activa	Sin actividad
ORF56 de 13 kDa-BD de Lisostafina	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad
LytM peptidasa- ORF56 de 16kDa- BD de Lisostafina	Activa	Activa	Activa
CD de Lisostafina- proteína de fusión ORF56 BD	Activa	Activa	-

5

Identificación de dominios conservados de TAME

Los inventores han desarrollado una estrategia integral para identificar genes de TAME en genomas de fagos caudovirales. Para buscar genes candidatos TAME, los inventores se apoyaron en la presencia en cada TAME de un dominio conservado (CD) asociado con la unión a la pared celular bacteriana, un dominio de unión (CDB) o degradación, dominio muralítico (MD). La Figura 1 es una lista de ejemplos de tales dominios que se han generado a partir de una búsqueda de la NCBI CDD (base de datos de dominios conservado) en su página web ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml, utilizando la siguiente cadena de búsqueda por palabra clave: "lisozima O endolisina O lisina O muramidasa O muraminidasa O glucosaminidasa O mureína O peptidoglicano o pared celular o lisis O amidasa O transglicosilasa O autolisina O hidrolasa ". Los expertos reconocerán que se pueden realizar diversas estrategias de búsqueda utilizando diferentes términos de búsqueda. También se pueden realizar búsquedas en otras bases de datos.

El producto de búsqueda se inspeccionó de forma manual si es pertinente para la unión a la pared celular bacteriana, mantenimiento o degradación. Una lista no limitante de dominios conservados asociados con la función de unión a la pared celular bacteriana (abreviado CDB para el dominio de unión celular) o la función degradante (MD abreviado para el dominio muralítico. Cualquiera de los dominios conservados se indican a continuación pueden usarse en cualquier combinación para generar una proteína quimérica TAME-CDB bactericida de la invención.

pfam05382: Amidasa_5: hidrolasa del peptidoglicano bacteriófago. Al menos uno de los miembros de esta familia, la proteína Pal del bacteriófago neumocócico Dp-I ha demostrado ser una N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa. De acuerdo con la estructura modular conocido de esta y otras hidrolasas de peptidoglicano desde el sistema neumocócico, el sitio activo debe residir en el dominio N-terminal mientras que el dominio C-terminal se une a los residuos de colina de los ácidos teicoicos de la pared celular. Esta familia parece estar relacionada con pfam00877. [pfam05382|68934]. MD

pfam01510: Amidasa_2: N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa. Esta familia incluye amidasas de cinc que tienen actividad de N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa EC: 3.5.1.28. Este dominio enzimático escinde el enlace amida entre N-acetilmuramoil y aminoácidos L en las paredes bacterianas (preferentemente: D-lactil-L-Ala). La estructura se conoce para la estructura del bacteriófago T7 y muestra que dos de las histidinas conservadas son de unión a cinc. [pfam01510|65318]. MD

pfam01520: Amidasa_3: N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa. Este dominio enzimático escinde el enlace amida entre N-acetilmuramoil y aminoácidos L en las paredes bacterianas. [pfam01520|65327]. MD

pfam00912: Transgli: transglicosilasa. Las proteínas de unión a penicilina son proteínas bifuncionales que consisten en transglicosilasa y transpeptidasa en los extremos N y C, respectivamente. El dominio transglicosilasa cataliza la polimerización de las cadenas glicano de mureína. [pfam00912|64762]. MD

cd00737: endolisina-autolisina: Las endolisinas y autolisinas se encuentran en virus y bacterias, respectivamente. Los fagos de ADNds de eubacterias utilizan endolisinas o enzimas muralíticas junto con hollina, una pequeña proteína de membrana, para degradar el peptidoglicano que se encuentra en las paredes celulares de las bacterias. Del mismo modo, las bacterias producen autolisinas para facilitar la biosíntesis de peptidoglicano sus peptidoglicano heteropolimérico de la pared celular y división celular. Ambas enzimas endolisina y autolisina escinden los enlaces beta-1,4-glucosídicos entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina del peptidoglicano. [cd00737|29561]. MD

- 5 pfam07486: Hidrolasa_2: Hidrolasa de la pared celular. Estas enzimas se han implicado en la hidrólisis de la pared celular, más ampliamente en *Bacillus subtilis*. Por ejemplo *Bacillus subtilis* SCLE, la enzima lítica-corteza de espora se expresa durante la esporulación como una forma inactiva y después se deposita en la corteza externa de la célula. Durante la germinación, la enzima se activa y se hidroliza la corteza. Una función similar se lleva a cabo por la hidrolasa de la pared celular parcialmente redundante. cwlJ. Estas enzimas pueden ser amidasas o peptidasas. [pfam07486|70935]. MD
- 10 pfam05257: Dominio CHAP. Este dominio corresponde a una función de amidasa. Muchas de estas proteínas están implicadas en el metabolismo de la pared celular de las bacterias. Este dominio se encuentra en el extremo N de una enzima de *Escherichia coli* bifuncional, en la que funciona como un glutatiónilpermidina amidasa EC:3,5,1,78. [pfam05257|68816] ORF56 ORP56 proporciona un ejemplo de un dominio CHAP. MD
- 15 pfam03562: MltA: Dominio de inserto específico de MltA. Este dominio en barril beta se encuentra insertado en MltA, una enzima transglicosilasa de degradación de mureína. Este dominio puede estar implicado en la unión al peptidoglicano. [pfam03562|67195]. MD
- 20 pfam01471: PG_unión_1: dominio de unión a peptidoglicano putativo. Este dominio se compone de tres hélices alfa. Este dominio se encuentra en el extremo N o C de diversas enzimas implicadas en la degradación de la pared celular bacteriana. Este dominio puede tener una función de unión peptidoglicano general. Esta familia se encuentra en N terminal del dominio catalítico de matrixinas. [pfam01471|65280] CBD
- 25 pfam08823: PG_unión_2: dominio de unión a peptidoglicano putativo. Esta familia puede ser un dominio de unión al peptidoglicano. [pfam08823|72246] CBD
- 30 pfam06737: Transglicosilasa: dominio de tipo transglicosilasa. Esta familia de proteínas es muy probable que actúen como enzimas transglicosilasa relacionados con pfam00062 y pfam01464. Estas otras familias están débilmente emparejadas por esta familia e incluyen los residuos del sitio activo conocidos. [pfam06737|70216]. MD
- 35 pfam06267: DUF1028: Familia de función desconocida (DUF1028). Familia de proteínas bacterianas y arqueobacterias con función desconocida. Algunos miembros están asociados con un dominio de unión al peptidoglicano en C terminal y pueden estar implicados en el metabolismo del peptidoglicano. [pfam06267|69772]. CBD y MD
- 40 pfam01476: LysM: Dominio LysM. El de dominio LysM (motivo lisina) tiene una longitud de aproximadamente 40 residuos. Se encuentra en diversas enzimas implicadas en la degradación de la pared celular bacteriana. Este dominio puede tener una función de unión peptidoglicano general. La estructura de este dominio es conocida. [pfam01476|65285]. CBD
- 45 smart00701: PGRP: proteínas de reconocimiento de peptidoglicano animales homólogas a la lisozima del bacteriófago T3. La molécula del bacteriófago, pero no su homólogo en polilla, se ha demostrado que tiene actividad N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa. Un miembro de esta familia, Tag7, es una citoquina. [smart00701|47970]. CBD
- 50 COG2951: MltB: transglicosilasa mureína B de mureína lítica unida a la membrana [biogénesis de la cubierta celular, membrana externa] [COG2951|32773]. MD
- COG2821: MltA: transglicosilasa mureína B de mureína lítica unida a la membrana [biogénesis de la cubierta celular, membrana externa] [COG2821|32649]. MD
- 55 COG0741: MltE: transglicosilasa mureína lítica soluble proteínas reguladoras relacionadas (algunas contienen dominios LysM/invasina) [biogénesis de la cubierta celular, membrana externa] [COG0741|31084]. MD
- 60 cd00736: Lisozima del bacteriófago lambda: La lisozima del bacteriófago lambda hidroliza el enlace beta-1,4-glicosídico entre el ácido N-acetilmurámico (MurNAc) y la N-acetilglucosamina (GlcNAc), al igual que otras lisozimas. Pero a diferencia de otras lisozimas, el bacteriófago lambda no produce un extremo reductor tras la escisión del peptidoglicano sino que usa el 6-OH del mismo residuo MurNAc para producir un residuo terminal de ácido 6-anhidromurámico y, por tanto, es una transglicosilasa lítica. Se forma un enlace 1,6-anhidro idéntico en peptidoglicanos bacterianos por la acción de las transglicosilasas líticas de *E. coli*. Sin embargo, difieren estructuralmente. [cd00736|29560]. MD
- 65 cd00118: LysM: dominio de lisina, que se encuentra en diversas enzimas implicadas en la degradación de la pared celular bacteriana. Este dominio puede tener una función de unión peptidoglicano general. [cd00118|29017]. CBD
- pfam08230: Cpl-7: Lisozima Cpl-7 en el dominio C-terminal. Este dominio se encontró originalmente en la porción C terminal de la lisozima CPL-7 codificada por el bacteriófago Cp-7 de *Streptococcus pneumoniae*. [pfam08230|71664] CBD y MD

- 5 pfam03411: Peptidasa_M74: Endopeptidasa de mureína insensible a la penicilina. [pfam03411|67049] 22:
 pfam01473 CW_unión_1: Repetición putativa de unión a la pared celular. Estas repeticiones se caracterizan por
 residuos aromáticos conservados y se encuentran glicinas en múltiples copias en tándem en una serie de proteínas.
 La repetición de CW tiene una longitud de 20 residuos de aminoácidos. Estas repeticiones en la lisozima del fago
 CP-1 de *Streptococcus* pueden ser responsables del reconocimiento específico de las paredes celulares que
 contienen colina. Se encuentran repeticiones similares pero más largas en las glucosiltransferasas y proteínas de
 unión a glucano de *Streptococcus* orales y se ha demostrado que están implicadas en la unión a glucano, así
 como en las dextranosacarinas relacionadas de *Leuconostoc mesenteroides*. Las repeticiones también están en las
 toxinas de *Clostridium difficile* y otros clostridios, aunque los ligandos no siempre se conocen. [pfam01473|65282]
 10 CBD
- 15 pfam01464: SLT: dominio SLT de transglicosilasa. Esta familia está relacionada de lejos con pfam00062. Los
 miembros se encuentran en fagos, sistemas de secreción de tipo II, de tipo III y de tipo IV (revisado en).
 [pfam01464|65274]. MD
- 20 pfam00062: Lys: familia de lisozima de tipo C/ alfa-lactoalbúmina. La alfa-lactoalbúmina es la subunidad reguladora
 de la lactosa sintasa, cambiando la especificidad de sustrato de la galactosiltransferasa desde N-acetilglucosamina a
 glucosa. Las lisozimas de tipo C son enzimas bacteriolíticas secretadas que escinden el peptidoglicano de la pared
 celular bacteriana. La estructura es un multidominio, de mezcla de pliegues alfa y beta, que contiene cuatro enlaces
 disulfuro conservados. [pfam00062|63951]. MD
- 25 COG5632: COG5632: N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa [biogénesis de la cubierta celular, membrana externa]
 [COG5632|35191 MD
- 30 COG5479: COG5479: proteína no caracterizada potencialmente implicada en la biosíntesis del peptidoglicano
 [amidasa [biogénesis de la cubierta celular, membrana externa] [COG5479|35038]. CBD y MD
- 35 COG4623: COG4623: transglicosilasa lítica soluble predicha fusionada a una proteína de unión a amino ácido de
 tipo ABC [biogénesis de la cubierta celular, membrana externa] [COG4623|34243]. CBD y MD
- 40 COG3863: COG3863: Pariente lejano sin caracterizar de hidrolasas asociadas a la pared celular [COG3863|33653].
 CBD y MD
- 45 COG3773: SleB: hidrólisis de la pared celular que participan en la germinación de esporas [biogénesis de la cubierta
 celular, membrana externa] [COG3773|33568]. CBD y MD
- 50 COG3770: MepA: mureína endopeptidasa [biogénesis de la cubierta celular, membrana externa] [COG3770|33565].
 MD
- 55 COG3409: COG3409: Proteína que contiene el dominio de unión putativo a peptidoglicano [biogénesis de la cubierta
 celular, membrana externa] [COG3409|33215]. CBD
- 60 COG3023: ampD: N-acetil-anhidromuramoil-L-alanina amidasa [biogénesis de la cubierta celular, membrana
 externa] [COG3023|32839]. MD
- 65 COG2247: LytB: dominio de unión putativo a la pared celular [biogénesis de la cubierta celular, membrana externa]
 [COG2247|32428]. CBD
- COG1215: COG1215: Glicosiltransferasas, probablemente involucradas en la biogénesis de la pared celular
 [biogénesis de la cubierta celular, membrana externa] [COG1215|31408]. CBD
- COG0860: AmiC: N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa [biogénesis de la cubierta celular, membrana externa]
 [COG0860|31201]. MD
- COG0791: Spr: hidrolasas asociadas a la pared celular (proteínas asociadas a la invasión) [[biogénesis de la
 cubierta celular, membrana externa] [COG0791|31134]. MD
- cd02848: Quitinasa_N_term: dominio Quitinasa en N-terminal. Las quitinasas hidrolizan el abundante biopolímero
 natural quitina, produciendo oligosacáridos más pequeños. La quitina consiste en múltiples residuos de N-
 acetil-D-glucosamina (NAG) conectados a través de enlaces beta 1,4-glicosídicos y es un elemento estructural
 importante de la pared celular de los hongos y de exoesqueletos artrópodos. Sobre la base de la modalidad de la
 hidrólisis de la quitina, las quitinasas se clasifican aleatorias, endo-, y exo quitinasas y basándose en criterios de
 secuencia, las quitinasas pertenecen a las familias 18 y 19 de las glicosil hidrolasas. El extremo N de la quitinasa
 puede estar relacionado con las superfamilias de las inmunoglobulinas y / o de tipo III fibronectina. Estos dominios
 están asociados con diferentes tipos de dominios catalíticos, en el extremo N o en el extremo C y pueden estar
 implicados en interacciones homodiméricas/tetraméricas/dodecaméricas. Los miembros de esta familia incluyen

miembros de la familia de alfa-amilasa, sialidasa, galactosa oxidasa, celulasa, celulosa, hialuronatoliasa, quitobiasa y quitinasa. [cd02848|30335]. MD

5 cd02847: Quitobiasa_C term: dominio Quitobiasa en N-terminal. El quitobiasa (también conocido como N-acetilglucosaminidasa) digiere los enlaces beta-1-4 glicosídicos de los oligómeros de N-acetilglucosamina (NAG) que se encuentran en la quitina, elemento estructural importante de la pared celular de hongos y de los exoesqueletos de artrópodos. Se cree que sufren un mecanismo de reacción ácido-base, en el que una proteína carboxilato actúa como ácido catalítico, mientras que el nucleófilo es el grupo acetamido polar del azúcar en una reacción asistida por sustrato con retención de la configuración anomérica. El extremo C de la quitobiasa puede estar relacionado con las superfamilias de las inmunoglobulinas y / o de tipo III fibronectina. Estos dominios están asociados con diferentes tipos de dominios catalíticos, en el extremo N o en el extremo C y pueden estar implicados en interacciones homodiméricas/tetraméricas/dodecaméricas. Los miembros de esta familia incluyen miembros de la familia de alfa-amilasa, sialidasa, galactosa oxidasa, celulasa, celulosa, hialuronatoliasa, quitobiasa y quitinasa. [cd02847|30334]. MD

15 cd00735 : Lisozima del tipo del bacteriófago T4: Las lisozimas de tipo bacteriófagos T4 hidrolizan los enlaces beta-1,4-glicosídicos entre el ácido N-acetilmurámico (MurNAc) y la N-acetilglucosamina (GlcNAc) en heteropolímeros peptidoglicano de las paredes celulares procariontas. Los miembros incluyen diversos bacteriófagos (T4, RB49, RB69, Aehl), así como Dictyostelium. [cd00735|29559]. MD

20 cd00254: LT_GEWL: transglicosilasa lítica (LT) y dominio de lisozima de clara de huevo de ganso (GEWL). Los miembros incluyen los LT unidos a membrana solubles e insolubles en las bacterias, los LT en el bacteriófago lambda, así como, las lisozimas eucariotas de "tipo ganso" (GEWL). Los LT catalizan la escisión de los enlaces beta-1,4-glicosídicos entre el ácido N-acetilmurámico (MurNAc) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), al igual que las lisozimas "de tipo ganso". Sin embargo, además de esto, también forman un nuevo enlace glicosídico con el grupo hidroxilo C6 del mismo residuo de ácido murámico. [cd00254|29556]. MD

25 cd00119: LYZ1: Lisozima de tipo C (, 4-beta-N-acetilmuramidasa, LYZ) y alfa-lactoalbúmina (proteína B lactosa proteína sintasa, LA). Tienen una estrecha relación evolutiva y la estructura terciaria similar, sin embargo, funcionalmente son bastante diferentes. Las lisozimas tienen una función principalmente bacteriolítica; hidrólisis de peptidoglicano de las paredes celulares procariontas y transglicosilación. LA es una metaloproteína de unión a calcio que se expresa exclusivamente en la glándula mamaria durante la lactancia. LA es la subunidad reguladora de la enzima lactosa sintasa. La asociación de LA con el componente catalítico de la lactosa sintetasa, galactosiltransferasa, altera la especificidad de sustrato aceptor de esta glicosiltransferasa, facilitando la biosíntesis de la lactosa. [cd00119|29018]. MD

30 smart00047: LYZ2: Subfamilia 2 de lisozimas; enzimas eubacterianas relacionadas de lejos con las lisozimas eucariotas. [smart00047|47396]. MD

35 pfam02016: Peptidasa_S66: LD-carboxipeptidasa. La muramoil-tetrapéptido carboxipeptidasa hidroliza un enlace peptídico entre un aminoácido di básico y la D-alanina en C terminal en el resto tetrapéptido en el peptidoglicano. Esto escinde el enlace entre el aminoácido L y D. La función de esta actividad está en el reciclaje de la mureína. Esta familia también incluye la proteína de autoinmunidad c7 microcina. Esta familia corresponde a la familia Merops S66. [pfam02016|65774]. MD

40 pfam02324: Glico_hidro_70: Familia hidrolasa Glicosil 70. Los miembros de esta familia pertenecen a la familia 70 de la glicosil hidrolasa glucosiltransferasas o sacarosa 6-glicosiltransferasas (GTF-S) catalizan la transferencia de unidades de D-glucopiranosil desde sacarosa a moléculas aceptoras, EC:2,4.1.5. Esta familia se corresponde aproximadamente con el dominio catalítico en N terminal de la enzima. Los miembros de esta familia también contienen el dominio putativo de unión a la pared celular pfamO1473, que corresponde al dominio de unión al glucano en C terminal. [pfam02324|66049]. MD

45 pfam06347: SH3_4: dominio SH3 bacteriano. Esta familia consiste en varias proteínas bacterianas hipotéticas de función desconocida. Estas están compuestas por dominios de tipo SH3. [pfam06347|69844]. CBD

50 pfam08239: SH3_3: dominio SH3 bacteriano. [pfam08239|71673]. CBD

55 pfam08460: SH3_5: dominio SH3 bacteriano. [pfam08460|71889]. CBD

60 COG4991: COG4991: proteína no caracterizada con un homólogo del dominio SH3 bacteriano [COG4991|34596]. CBD

65 COG3103: COG3103: Proteína del dominio SH3 [mecanismos de transducción de señal] [COG3103|32917]. CBD

smart00287 : SH3b: homólogos del dominio SH3 bacteriano; [smart00287|47616]. CBD

pfam01551: Peptidasa_M23: Familia Peptidasa M23. Los miembros de esta familia son metalopeptidasas de cinc con una serie de especificidades. La familia de peptidasas M23 está incluida en esta familia, son endopeptidasas Gly-Gly. La familia de peptidasa M23 también son endopeptidasas. Esta familia también incluye algunas lipoproteínas bacterianas para las cuales se ha demostrado ninguna actividad proteolítica. Esta familia también incluye proteínas quimiotoxina 2 derivada de leucocitos (2) LECT2. LECT2 es una proteína específica del hígado que se cree que está relacionada con el crecimiento de hepatocitos aunque la función exacta de esta proteína es desconocida. [pfam01551|65358]. MD

Método de escaneo de genomas de fagos genomas para candidatos a TAME

Actualmente, el proceso se realiza mediante inspección manual de cada genoma del fago, aunque puede implementarse el escaneo automatizado por CDD [Base de datos de dominios conservados en NCBI; o su equivalente] en el futuro. El proceso paso a paso se enumera a continuación, utilizando el fago 11 de *Staphylococcus* como ejemplo.

1. Identificar un genoma del fago en [base de datos adecuada, por ejemplo,] la base de datos GenBank de genomas de fagos ([ncbi.nlm.nih.gov/genomes /static/phg.html](http://ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/phg.html)). Seleccionar su número de referencia (el número NC a la derecha de la pantalla; para el fago 11, es NC_004615). [Esta descripción se basa en el uso de esta base de datos, en esta fecha; a medida que el diseño de vista/sensación evoluciona, esta descripción se convierte entonces en "de ejemplo"]

2. Desde la ventana general del Genoma, seleccionar la función de codificación de proteínas [o su equivalente funcional] (en este caso, 53 proteínas). Se abrirá una ventana con el listado de todos los productos proteicos predichos del genoma, con la lista completa de proteínas previstas. En este caso, los productos génicos se han anotado ampliamente; sin embargo, este método no requiere una anotación anterior, aparte de la identificación automatizada de ORF potenciales.

3. El siguiente paso es examinar cada producto proteico predicho para determinar la presencia de uno de los CD [dominios conservados; es decir, un dominio de unión celular o un dominio muralítico] enumerados anteriormente. Este examen manual debe comenzar con la mayor proteína predicha y avanzar por la lista de tamaños. En el caso de fago 11 [por ejemplo], el mayor ORF es Phil 1_45, que se ha predicho que abarca 636 aa. El procedimiento más sencillo es seleccionar la ID del gen de 7 dígitos. Esto lleva a una visión general del ORF, que incluye una pantalla gráfica del ORF que muestra su ubicación en el genoma del fago. Al seleccionar esta pantalla gráfica, aparecerá un menú desplegable. Si hay algún CD en el ORF, una de las opciones serán los dominios conservados. Al seleccionar esta opción, el ORF se mostrará de forma gráfica con la identidad y la posición de los CD detectados en su secuencia. En el caso del ejemplo de phi11_45, no se detecta ningún CD. Este proceso se repite para el siguiente producto de proteína más grande predicho; en este caso, sería Phil 1_44, en 633 aa. Hay dos CD presentes en este ORF, pero ninguno pertenece a la lista mostrada en la Figura 1. En el ejemplo, el siguiente ORF es Phil 1_49. Este ORF resulta tener dos CD, CHAP y Lyz2, ambos presentes en la Figura 1. Idealmente, el proceso se debe repetir para todos los ORF de más de 150 aa. Generalmente, un segundo ORF producirá al menos un hit en la figura 1. En el caso de phil 1, se encuentra que el ORF phil 1_53 tiene los dominios CHAP, AMI2 y SH3_5.

Después de analizar la lista completa de ORF predichos, en general, se identificarán dos ORF: el TAME y la endolisina lítica. Se aplican varios criterios para seleccionar el TAME. En primer lugar, un TAME será normalmente la ORF más grande que contiene un CD que aparece en la figura 1. En el ejemplo de fago 11, el TAME es Phil 1_49, que es mayor que la endolisina, Phil 1_53 (amidasa). Un segundo criterio confirmatorio puede estar disponible si se han identificado proteínas de la cola del fago. El TAME se agrupa con los genes de la cola. En el caso del fago 11, el gen de TAME, Phil 1_49, está adyacente al gen de la fibra de la cola, Phil 1_50, en la misma cadena (+) del ADN, y aguas abajo de otros genes de la cola, incluyendo el gen de la cinta métrica, Phil 1_42. La endolisina (en este caso, amidasa; phil 1_53), está por lo general al lado o cerca de la hollina (en este caso, phil 1_52).

TAME en los fagos de estafilococos actuales

La aplicación de este procedimiento a los fagos estafilocócicos disponibles actualmente generó la Figura 1. En esta figura, se expone el candidato a TAME (con su número de GI en la columna de la derecha) para cada bacteriófago; en la fila que correspondiente a cada fago se enumeran los CD utilizados para identificar el TAME.

Una vez que se identifican los dominios de unión celular y los dominios muralíticos, los expertos pueden, usando la divulgación de esta memoria descriptiva y las técnicas estándar de biología molecular, generar proteínas TAME - CBD. La función bactericida de gran número de proteínas TAME-CDB puede analizarse usando los ensayos descritos en el presente documento, por ejemplo, ensayos de inhibición de manta, zimografías y ensayos de disminución de unidades formadoras de colonias (UFC).

Muchos genomas de fagos se describen en las bases de datos públicamente disponibles. La identificación de dominios conservados de fagos estafilocócicos, tanto CDB como MD, que se pueden utilizar en las proteínas TAME-

CDB químicas la extender los expertos para identificar dominios conservados, tanto CDB como MD, a partir de los fagos que infectan a otras bacterias, por ejemplo, fagos que infectan cepas de bacterias Streptococcus y Anthrax.

LISTADO INFORMAL DE SECUENCIAS

5

SEC ID Nº 1

1: YP_024489. Informes prot. Hipotética ...(gi: 4869645):

```

1 mrrirrpkvr ieivtdndtf tlrfedtrdy ngdefgakll gfgtknsmed dssvfqinma
61 gdtYWdKlVm andiirifit pnddpndkeg kqerliqvGM vsqVskVgSy gndqtqfrit
121 gqsfvkpfmk fglgviqevq avlpevgwli dgdgdnevKf tgssahevmt giirrfipym
181 kynytektyN tidnyldydd lsswdefekl tevsaftnfd gslkqlmdmv tarpfnelff
241 knsektPgKa qlvlrktpfn ptewraldmi kvptedfief dvgksdvety siftatpAgM
301 lkelngdvfs kpqfhpeltd rygytkfeve niylstksgs atedsdssgd dngtergtys
361 kimkdlSnyg rdniskgidk ytsklsskyk nlkkaqakki iekfvkegkv tekeyekitg
421 nkvddeLtsd nrpkltkdKl ksilkefkt qddfnnskkk kkaktDalke lttkyrfgnk
481 thattlldey ikykgeppnd eafdkylkai egvsnvatdt gsdasdsplv mfsrmlfnwy
541 hgnpnfyagd iivlgdpyd lgkrlfiedk qrgdtwefyi esvehkfdyk qgyyttvgvt
601 rglkdaiLed gkgsphrfag lwnqssdfmg glmgedtske lkekgvaekq ssgdkdggSD
661 sggagdgGsl dslkkyngkl pkhdpsfvqp gnrhykyqct wyaynrRgql gipvplwgda
721 adwiggakga gygvgrtpkq gacviwqrgv qggspqyghv afvekvldgg kkifisehny
781 atpnygtrt idmssaigkn aqfiydKk
    
```

10

ES 2 536 852 T3

SEC ID N° 2

De la que la ORF parece ir de 58185 a 60611 dentro del segmento:

```

58021 ctggagacat tatcggagga agaattagag aagttctaga tagtaacatg gatatctttg
58081 caaatgaaca taagagaagt tattagtaat tttgtattga cacaagagta gtatcatagt
58141 atactactct tatacatata aaaaaataaaa ggaagtatgt gtat
58185 atgcgt agaataagaa
58201 gacctaaggt aagaatagaa atagttacag atgataatac atttacattg agatttgaag
58261 atacacgaga ctataatggg gatgagtttg gagctaaact tttaggattc caaactaaaa
58321 actctatgga agatgatagt tcagttttcc aaataaataat ggcaggagat acttattggg
58381 ataagctagt tatggctaat gatatacataa gaataattat tacacctaat gatgacccta
58441 acgataaaga aggaaaacaa gaacgactta tccaggtagg tatggtttct caagtatcaa
58501 aagtaggtag ttacggtaat gaccaaactc aatttagaat aacaggtcaa tcttttgtaa
58561 aaccttttat gaaatttgga ttaggcgcta ttcaggaagt tcaagctgta ttacctgaag
58621 taggttggtc tattgatggg gatggagata atgaagtaaa atttactggg agctcagctc
58681 atgaagtaat gactgggatt atacgtagat ttatacctta tatgaaatat aactatactg
58741 aaaaaacata taatacaatt gataactatc ttgattatga tgatttaagt agttgggatg
58801 agtttgaaaa acttacagaa gtttcagcct ttactaattt tggatgggtca ttaaacaagt
58861 taatggatat ggtaacagct agacctttta atgagttatt cttcaaaaat tcagaaaaaa
58921 cacctggaaa ggctcaactt gtattaagaa agaccccttt taatcctact gattggagag
58981 cttagatata gattaaagta cctactgagg attttataga agaggatgta ggtaaaagtg
59041 atgttagaac atattctata tttcacgcaa cacctgcagg tatgttgaaa gacctaacag
59101 gtgatgtatt ttctaacca caattccacc ctgaattaac tgatagatat ggtataacta
59161 aatttgaagt agaaaatatt tatcttagta caaaatcagg ttcagctact gaggattcag
59221 attcctcagg tgatgataat ggcaagaaac gaggaactta ttctaaaatt atgaaagatt
59281 taagtaacta tggagagat aatatactta aaggtataga taagtataca agtaaattat
59341 cttcaaaaaa taaaaactta aaaaaagccc aagctaaaaa aattatagag aagtttgtaa
59401 aagaaggaaa agtaacagaa aaagaatatg aaaaaataac aggtaataag gtagatgatg
59461 aattaacatc agataacaga ccgaagttga caaaagataa attaaagagt atactaaaag
59521 agaagtttaa aacacaagat gatttttaata attctaagaa aaagaaaaaa gctaagacag
59581 atgcacttaa agaattgaca actaaatatc gttttggtaa taaaacacat gctacaactt
59641 tatttagatga atatttataa tataaaaggag agccacctaa cgatgaggct ttgtataaat
59701 atcttaaagc tattgaaggt gttagtaatg tagctacaga cacaggttca gatgcaagtg
59761 atagcccttt agttatggtt tctagaatgc tatttaattg gtatcatggt aaccctaact
59821 tctatgcagg agatattatt gttttaggag accctaagta tgacctagg aaagaattat
59881 ttattgaaga taagcaacga ggagacactt gggagttcta tattgaatct gtagaacata
59941 aattcgatta taaacagggg tattatacaa ctgtaggagt aactagaggt ttaaagacg
60001 ctattctaga agatggtaaa ggtagtcgca atagatttgc aggattatgg aatcaatcat
60061 cagactcat gggaggtcct atgggtgaag atacttctaa agaacttaaa gaaaaaggtg
60121 tagcagagaa acaaagtagt ggagataaag atgggtggtc tgatagtggt ggagctcaag
60181 atgggtggtc tttagattca cttaaaaaat ataacggcaa acttccctaa catgacccaa
60241 gttttgttca acctggtaac cgacattata agtatcagtg tacatgggat gcttataata
60301 gaagaggtca attaggcata cctgtgcctt tatgggggga cgcccgcgac tggataggtg
60361 gtgctaaagg agcagggtat ggtgtaggta gaacacctaa acaaggtgct tgtgtatat
60421 ggcaaagagg agttcaagga ggtagcccac aatatgggtca cgtagcggtt gtagagaaag
60481 tatttagatgg aggtaaaaaa atatttatct ctgaacataa ctatgctacc cctaattggt
60541 atgggtactag aacgatagat atgagttcag ccataggtaa gaatgcacaa ttcatattacg
60601 ataagaata a
60612 agggagata gtctatggca acagataaag aagctaaaga tgttattgat
60661 aaatttatag acaatgtatt taattttgat gtacttacia aagaaagaat aaaaagaaaa
60721 gatgaagaaa ttaaaaaaat aactacagat gatatgtatg aaaaggttgt gtatatacga
60781 ccttatggtg gagtaataca aagccttaac cctcagcatg ttcagtatga atcattttct
60841 aataatggtt atgatataga ggcagaatta agtttcagga aagtaagtta tttagttgat
60901 aaaggtgcta tacctacaga ttctttatct actttaaacyg ttcatttagt agaacgaaat
60961 caagaactat taatagatta ctttgatgag atacaagatg tgttgatgg agaataatg
61021 gaagaagaat atgtatttga tgaagatgta ccattaagta cgatactagc attagactta

```

5 SEC ID N° 3

NO:803303 (ORF49 del fago phi1)

```

1 mglpnpknrk ptasevvewa lyiaknkiai dvpqsgmgaq cwdlpnyild kywgftrwgn
61 adamaqksny rgrdfkiirn tkdfvpqpgd gwvwtggwag hvnivvgpct kdywygvdqg
121 wytnnatgsp pykikhshyd gpgggvkyfv rppyhpdkt papkpedds dneknkkvp
181 iwkdvttiky tissqevnyp eyiyhfiveg nrrlekpkgi mirnaqtms veslynsrkk
241 ykqdveyphf yvdrhniwap rravfepne pdyividvce dysasknefi fneihamvva
301 vdmmakeyip lsienlkvdd siwrsmlehv nwnmidngvp pkdkyealek allnifknre
361 kllnsitkpt vtksrikvmv dnknadianv rdsstannng saskqpqiit etspytfkqa
421 ldqmqmargnp kksnawgwan atraqtssam nvkriwesnt qcyqmnlng yqgvsvsaln
481 kilkgkgtln nqgkafaeac kkhneiyli iahaflesgy gtsnfangkd gvnyfyfgiga
541 ydnpnyamt farnkgwtsp akaimggasf vrkdyinkgq ntlyrirwmp knpathqyat
601 aiewcqhgas tiaklykqig lkgyiftrdk yk

```

SEC ID Nº 4
Quimera 128

M S L D S L K K Y N G K L P K H D P S F V Q P G N R H Y K Y Q C T W Y A Y
N R R G Q L G I P V P L W G D A A D W I G G A K G A G Y G V G R T P K Q G
A C V I W Q R G V Q G G S P Q Y G H V A F V E K V L D G G K K I F I S E H N
Y A T P N G Y G T R T I D M S S A I G K N A Q F I Y D K K L E T P N T G W K
T N K Y G T L Y K S E S A S F T P N T D I I T R T T G P F R S M P Q S G V L K
A G Q T I H Y D E V M K Q D G H V W V G Y T G N S G Q R I Y L P V R T W N
K S T N T L G V L W G T I K

5 SEC ID Nº 5
BD de Lisostafina fusionado con el extremo C de ORF56 de 16 kDa

M S L D S L K K Y N G K L P K H D P S F V Q P G N R H Y K Y Q C T W Y A Y N R R
G Q L G I P V P L W G D A A D W I G G A K G A G Y G V G R T P K Q G A C V I W Q
R G V Q G G S P Q Y G H V A F V E K V L D G G K K I F I S E H N Y A T P N G Y G T
R T I D M S S A I G K N A Q F I Y D K K L E T P N T G W K T N K Y G T L Y K S E S
A S F T P N T D I I T R T T G P F R S M P Q S G V L K A G Q T I H Y D E V M K Q D G
H V W V G Y T G N S G Q R I Y L P V R T W N K S T N T L G V L W G T I K

10 SEC ID Nº 6
BD de Lisostafina fusionado con el extremo C de ORF56 de 19 kDa

M G G L M M G E D T S K E L K E K G V A E K Q S S G D K D G G S D S G G A Q D G
G S L D S L K K Y N G K L P K H D P S F V Q P G N R H Y K Y Q C T W Y A Y N R R
G Q L G I P V P L W G D A A D W I G G A K G A G Y G V G R T P K Q G A C V I W Q
R G V Q G G S P Q Y G H V A F V E K V L D G G K K I F I S E H N Y A T P N G Y G T
R T I D M S S A I G K N A Q F I Y D K K L E T P N T G W K T N K Y G T L Y K S E S
A S F T P N T D I I T R T T G P F R S M P Q S G V L K A G Q T I H Y D E V M K Q D G
H V W V G Y T G N S G Q R I Y L P V R T W N K S T N T L G V L W G T I K

SEC ID Nº 7
BD de Lisostafina fusionado con el extremo C de ORF56 del dominio CHAP de 13 kDa

G N R H Y K Y Q C T W Y A Y N R R G Q L G I P V P L W G D A A D W I G G A K G
A G Y G V G R T P K Q G A C V I W Q R G V Q G G S P Q Y G H V A F V E K V L D G
G K K I F I S E H N Y A T P N G Y G T R T I D M S S A I G K N A Q F I Y D K K L E T
P N T G W K T N K Y G T L Y K S E S A S F T P N T D I I T R T T G P F R S M P Q S G
V L K A G Q T I H Y D E V M K Q D G H V W V G Y T G N S G Q R I Y L P V R T W N
K S T N T L G V L W G T I K

SEC ID Nº 8
BD de L54a amidasa del fago fusionado con el extremo C de ORF56 de 6 kDa

M A Q D G G S L D S L K K Y N G K L P K H D P S F V Q P G N R H Y K Y Q C T W Y
A Y N R R G Q L G I P V P L W G D A A D W I G G A K G A G Y G V G R T P K Q G A
C V I W Q R G V Q G G S P Q Y G H V A F V E K V L D G G K K I F I S E H N Y A T P
N G Y G T R T I D M S S A I G K N A Q F I Y D K K L E K T S A K N Q K N P P V P A
G Y T L D K N N V P Y K K E Q G N Y T V A N V K G N N V R D G Y S T N S R I T G
V L P N N T T I T Y D G A Y C I N G Y R W I T Y I A N S G Q R R Y I A T G E V D K A
G N R I S S F G K F S T I

20

SEC ID Nº 9

Dominio de LytM peptidasa fusionado con el ND de lisostafina en el extremo C

MPENSPVYSLTDGTVVQAGWSNYGGGNQVTIKEANSNNYQWYMHNNRLTVSAGD
KVKAGDQIAYSGSTGNSTAPHVHFQRMMSGGIGNQYAVDPTSYLQSRLETPNTG
WKTNKYGTLYKSESASFPTNTDIITRTTGPFRSMPQSGVLKAGQTIHYDEVMKQDGHVWVG
YTGNSGQRIYLPVRTWNKSTNTLGVLWGTTIK

5 SEC ID Nº 10

El dominio catalítico de lisostafina fusionado con el dominio de unión de ORF56

MAATHEHSAQWLNNYKKGYGYGPYPPLGINGGMHYGVDF
FMNIGTPVKAISSGKIVEAGWSNYGGGNQIGLIENDGVHRQW
YMHLSKYNVKGVDYVKAGQIIGWSGSTGYSTAPHLHFQRM
VNSFSNSTAQDPMFLKSAGYGKAGGTVMGGLMMGEDTSK
ELKEKGVAEKQSSGDKDGGSDSGGAQDGGSLDSLKKYNGK
LPKHDPSPVQP

SED ID Nº 11

10 Fusión de LytM peptidasa- ORF56 de 16 kDa-BD de lisistafina

MPENSPVYSLTDGTVVQAGWSNYGGGNQVTIKEANSNNYQWYMHNNRLTVSAGD
KVKAGDQIAYSGSTGNSTAPHVHFQRMMSGGIGNQYAVDPTSYLQSRMSLD
SLK KYNGKLPKHDPSPVQPGNRHYKYQCTWYAYNRRGQLGIPV
PLWGDAADWIGGAKGAGYGVGRTPKQGACVIWQRGVQGG
SPQYGHVAFVEKVLDDGGKKIFISEHNYATPNGYGTRTIDMSS
AIGKNAQFIYDKKLETPNTGWKTNKYGTLYKSESASFPTNT
DIITRTTGPFRSMPQSGVLKAGQTIHYDEVMKQDGHVWVG
YTGNSGQRIYLPVRTWNKSTNTLGVLWGTTIK

SEC ID Nº 12

Orf56 DE 16 KdA-BD de almidasa de phi11

MSLDLKKYNGKLPKHDPSPVQPGNRHYKYQCTWYAYNRR
GQLGIPVPLWGDAADWIGGAKGAGYGVGRTPKQGACVIWQ
RGVQGGSPQYGHVAFVEKVLDDGGKKIFISEHNYATPNGYGT
RTIDMSSAIGKNAQFIYDKKLE
PVASAWKRNKYGTYYMEESARFTNGNQIPITVRKVGPF
LSCPVGYYQFQPGGYCDYTE
VMLQDGHVWVGYTWEQRYLPIRTWNGSAPPNQILGDLWGEIS

15

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido quimérico que comprende
- 5 (i) un dominio muralítico (MD) que tiene una identidad de al menos un 90 % con los aminoácidos 669 - 808 de la SEC ID N° 1; y
(ii) un dominio de unión celular heterólogo (CDB) que se une a una bacteria diana, teniendo dicho polipéptido quimérico actividad bactericida.
- 10 2. El polipéptido quimérico de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N° 4 – 6 y 8.
3. El polipéptido quimérico de la reivindicación 2, en donde dicho polipéptido comprende la SEC ID N° 4.
- 15 4. Un polipéptido quimérico que comprende
- (i) un dominio muralítico (MD) que tiene una identidad de al menos un 90 % con los aminoácidos 669 - 808 de la SEC ID N° 1; y
- 20 (ii) un dominio heterólogo de unión a la pared celular de *S. aureus*, teniendo dicho polipéptido quimérico actividad de degradación de la mureína de *Staphylococcus*.
5. El polipéptido quimérico de las reivindicaciones 1 o 4, en el que el MD comprende una secuencia con al menos una identidad del 90 % con los aminoácidos 629 - 808 de la SEC ID N° 1.
- 25 6. Un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 6.
8. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5 para su uso en un método de tratamiento de una
- 30 infección bacteriana en un sujeto que necesita tal tratamiento.
9. Un método *in vitro* de degradar la pared celular de una bacteria, comprendiendo el método poner en contacto la pared celular con el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5.
- 35 10. Un método no terapéutico de desinfectar una superficie, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto la superficie con el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5.
11. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en el que el MD comprende una secuencia con al menos una identidad del 95 % con los aminoácidos 669 - 808 de la SEC ID N° 1.
- 40 12. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en el que el MD comprende una secuencia con al menos una identidad del 95 % con los aminoácidos 629 - 808 de la SEC ID N° 1.

Genes candidatos a TAME en los fagos estafilocócicos actuales

Fago	Grupo de morfología	nt del genoma	Nº proteínas	TAME CO	TAME CO	TAME CO	Entrada en genBank de TAME
Fago de Staphylococcus 11	Siphoviridae	43004	53	CHAP	LYZZ	LYZO	XJ12920682 ref NP_063302.1 hidrolasa de la pared celular, fago de Staphylococcus aureus phi111
Fago de Staphylococcus 187	Siphoviridae	39620	77	CHAP	LYZZ	LYZO	XJ16336271 ref YP_238513.1 ORF002 fago de Staphylococcus 187
Fago de Staphylococcus 2630A	Siphoviridae	41318	57	LI_GENVL	Peptidase_M23		XJ16336451 ref YP_238811.1 ORF001 fago de Staphylococcus 2630A
Fago de Staphylococcus 29	Siphoviridae, fago 53 sensu lato	42002	75	CHAP	LYZZ		XJ162636812 ref AA091723.1 ORF004 [Bacteriófago 29]
Fago de Staphylococcus 37	Siphoviridae	43691	77	CHAP	LYZZ		XJ162636156 ref AA091287.1 ORF004 [Bacteriófago 37]
Fago de Staphylococcus 3A	Siphoviridae	43055	67	LI_GENVL			XJ121359767 ref AA0445603.1 AY513855_3_phi12 proteína de tipo de proteína de la fibra de la cola [Bacteriófago de Staphylococcus aureus phi 3A]
Fago de Staphylococcus 42E	Siphoviridae	45861	79	LI_GENVL			XJ162636012 ref AA091113.1 ORF001 [Bacteriófago 42E]
Fago de Staphylococcus 44AHJ0	Podophage virus de tipo Phi29	16784	21		CHAP		XJ162637635 ref AA083884.1 unlabeled [Fago de Staphylococcus 44AHJ0]
Fago de Staphylococcus 47	Siphoviridae, fago 53 sensu lato	44777	72	LI_GENVL			XJ163365657 ref YP_240016.1 ORF001 [Fago de Staphylococcus 47]
Fago de Staphylococcus 52A	Siphoviridae, fago 53 sensu lato	41690	65	CHAP	LYZZ		XJ162636687 ref AA091798.1 ORF004 [Bacteriófago 52A]
Fago de Staphylococcus 53	Siphoviridae, fago 53 sensu lato	43883	79	CHAP	LYZZ		XJ163365374 ref YP_238671.1 ORF004 [Fago de Staphylococcus 53]
Fago de Staphylococcus 55	Siphoviridae	41902	77	CHAP	LYZZ		XJ162636535 ref AA091646.1 ORF004 [Bacteriófago 55]
Fago de Staphylococcus 66	Podophage virus de tipo Phi29	18159	27		CHAP		XJ163365191 ref YP_239474.1 ORF004 [Fago de Staphylococcus 66]
Fago de Staphylococcus 69	Siphoviridae, fago 53 sensu lato	42732	76	CHAP	LYZZ		XJ163365297 ref YP_239581.1 ORF004 [Fago de Staphylococcus 69]
Fago de Staphylococcus 71	Siphoviridae, fago 53 sensu lato	43114	72	CHAP	LYZZ		XJ162636463 ref AA091574.1 ORF004 [Bacteriófago 71]
Fago de Staphylococcus 77	Siphoviridae	41708	69	LI_GENVL	Peptidase_M23		XJ141169516 ref NP_058615.1 77ORF001 [Bacteriófago 77]
Fago de Staphylococcus 85	Siphoviridae, fago 53 sensu lato	44263	78	CHAP	LYZZ		XJ162635903 ref AA090914.1 ORF004 [Bacteriófago 85]
Fago de Staphylococcus 88	Siphoviridae, fago 53 sensu lato	43231	72	CHAP	LYZZ		XJ163366337 ref YP_240695.1 ORF004 [Fago de Staphylococcus 88]
Fago de Staphylococcus 92	Siphoviridae, fago 53 sensu lato	42431	74	CHAP	LYZZ		XJ163366410 ref YP_240783.1 ORF004 [Fago de Staphylococcus 92]
Fago de Staphylococcus 96	Siphoviridae, fago 53 sensu lato	43576	79	CHAP	LYZZ		XJ163365989 ref YP_240255.1 ORF004 [Fago de Staphylococcus 96]
Fago de Staphylococcus EW	Siphoviridae, fago 53 sensu lato	45206	77	CHAP	LYZZ		XJ163365610 ref YP_240176.1 ORF003 [Fago de Staphylococcus EW]
Fago de Staphylococcus 3G1	Myoviridae	138715	214		CHAP		XJ163366454 ref YP_240921.1 ORF005 [Fago de Staphylococcus G1]
Fago de Staphylococcus K	Myoviridae	127395	115		CHAP		XJ163366445 ref YP_074466.1 [proteína hipotética XG0R265] [Fago de Staphylococcus K]

FIG. 1

Accession	Protein Name	CD	Function	Length	Start	End	Family	Notes
>gi1295557.5 refNP_817327.1	desconocido	CHAP	fago de Staphylococcus aureus	18227	22	18227	Pedophage Phi29-like viruses	phi1768
>gi11279083.9 refNP_04821813.1	hidrolasa	LYZ	fago de Staphylococcus aureus	44041	68	44041	Siphoviridae	PH15
>gi12902657.1 refNP_803346.1	proteína de fibras de la cola	LT_GEWL	fago de Staphylococcus aureus	44970	49	44970	Siphoviridae	phi 12
>gi12902670.1 refNP_803336.1	proteína de medida de la longitud de la cola	LT_GEWL	fago de Staphylococcus aureus	42722	49	42722	Siphoviridae	phi 13
>gi117426269.1 refNP_510955.1	similar al fago phi187 hidrolasa celular	CHAP	similar al fago phi187 hidrolasa celular	43061	66	43061	Siphoviridae	phi187
>gi122891770.1 refNP_01046324.1	hidrolasa de la pared celular	CHAP	bacteriófago phiETA3	43265	69	43265	Siphoviridae	phiETA3
>gi121305226.0 refNP_03454347.1	proteína hipotética SA1766	CHAP	fago de Staphylococcus aureus	43282	68	43282	Siphoviridae	phi1766
>gi13004394.9 refNP_835564.1	proteína de la pared celular	LT_GEWL	fago de Staphylococcus aureus	44082	65	44082	Siphoviridae	phi1315
>gi118430784.1 refNP_874009.1	proteína de medida de la cola del fago	CHAP	fago de Staphylococcus aureus	43128	64	43128	Siphoviridae	phiNM1
>gi118125103.1 refNP_508344.1	proteína de medida de la cola del fago	LT_GEWL	fago de Staphylococcus aureus	44061	65	44061	Siphoviridae	phiNM3
>gi119443702.1 refNP_218340.1	proteína de medida de la cola del fago	LT_GEWL	bacteriófago de Staphylococcus aureus	44857	59	44857	Siphoviridae	phiPVL100
>gi1469317463.0 refNP_1743.2	producto proteico sin nombre	LT_GEWL	fago templado de Staphylococcus aureus	42942	61	42942	Siphoviridae	phiS1
>gi166391282.1 refNP_238566.1	fago Twork de Staphylococcus	CHAP	fago Twork de Staphylococcus	130706	195	130706	Myoviridae	Twork
>gi16268899.0 refNP_443920.1	bacteriófago X2	CHAP	bacteriófago X2	43440	77	43440	Siphoviridae	phiX2
>gi1663577.1 refNP_051640.1	homólogo 16	Peptidase M23	profago de Staphylococcus aureus	45556	65	45556	Siphoviridae	phiP163
>gi11955570.1 refNP_55623.1	amidasa	CHAP	fago de Staphylococcus aureus	43420	65	43420	Siphoviridae	phiP163
>gi16268899.0 refNP_443920.1	bacteriófago ROSA	CHAP	bacteriófago ROSA	43155	74	43155	Siphoviridae	phiP163
>gi1663577.1 refNP_051640.1	fago 80 alfa de Staphylococcus	CHAP	fago 80 alfa de Staphylococcus	44970	49	44970	Siphoviridae	phi12
>gi12902657.1 refNP_803346.1	proteína de la fibra de la cola	LT_GEWL	fago de Staphylococcus aureus	44970	49	44970	Siphoviridae	phi12
>gi157652580.1 refNP_185271.1	Profago de Staphylococcus L54a	LT_GEWL	Profago de Staphylococcus L54a	44970	49	44970	Siphoviridae	L54a

nota: "sensu lato" = "en el sentido más amplio", este es el nuevo término del NCBI para designar los grupos de fagos (como en T4 sensu lato= T2, T4, T6 etc.)
 CHAP= Estos son los CD detectados por homología con los ORF que contienen CHAP; es decir el fago 66 ORF004

FIG. 1 (cont.)