

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 701**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/48** (2006.01)

**C12N 9/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2012** **E 12722933 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015** **EP 2699254**

54 Título: **Un método de hidrólisis de péptidos, uso de una composición como agente bacteriostático y bactericida y los usos de la forma activa de LytM de S. aureus**

30 Prioridad:

**19.04.2011 PL 39461911**

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

**11.06.2015**

73 Titular/es:

**MIEDZYNARODOWY INSTYTUT BIOLOGII  
MOLEKULARNEJ I KOMORKOWEJ (100.0%)  
Ul. Ks. Trojdena 4  
02-109 Warszawa, PL**

72 Inventor/es:

**SABALA IZABELA y  
BOCHTLER, MATTHIAS**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 537 701 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

Un método de hidrólisis de péptidos, uso de una composición como agente bacteriostático y bactericida y los usos de la forma activa de LytM de *S. aureus*

5

**Campo técnico**

[0001] La presente invención se refiere a un método de hidrólisis de péptidos y una peptidasa capaz de escindir las paredes celulares de bacterias Gram-positivas, el uso de una composición como agente bacteriostático y bactericida (por ejemplo, como bacteriolítico), y usos de la forma activa de LytM de *S. aureus*.

10

**Técnica antecedente**

[0002] Las infecciones causadas por *Staphylococci*, en particular *Staphylococcus aureus*, son cada vez más difíciles de tratar debido a la resistencia a fármacos de rápida emergencia. Por esta razón es incluso más importante no solo desarrollar nuevas terapias para combatir infecciones por estafilococos, para eliminar el germen portador, en particular entre el personal médico, sino también diseñar métodos más eficaces para eliminar estas bacterias del entorno, incluyendo hospitales. Uno de estos nuevos enfoques es la lisis de células bacterianas usando enzimas líticas.

15

[0003] Existen peptidoglucano hidrolasas conocidas, tales como lisostafina y LytM que escinden los puentes cruzados pentaglicina característicos en peptidoglucanos de *Staphylococcus*, por ejemplo, *S. aureus* y son, por lo tanto, de interés como agentes potenciales antiestafilococos.

20

[0004] El papel biológico de la lisostafina está bien establecido. La lisostafina es una bacteriocina secretada por *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. La proteína madura es inactiva contra el organismo productor pero altamente efectiva en la escisión de las paredes celulares de *S. aureus*.

La lisostafina madura es una proteína monomérica con actividad óptima a temperaturas de aproximadamente 37-40°C, pH 7,5 y tiene un punto isoeléctrico pI de 9,5 (Browder H. P. et al., 1965, Biochem. Biophys. Res. Commun.,

19:383-389 e Iversen O. et al., 1973, Eur. J. Biochem., 38:293-300). La lisostafina se ha usado para alterar biopelículas de *S. aureus* y *S. epidermidis* en superficies artificiales y también se ha ensayado como recubrimiento para catéteres. En un modelo de ratón, se ha usado lisostafina para erradicar biopelículas de *S. aureus* de vena

yugular cateterizada y también para el tratamiento de infecciones sistémicas. En un modelo de rata alodona, una crema de lisostafina ha demostrado ser efectiva para erradicar colonización nasal de *S. aureus*. En seres humanos,

se ha usado lisostafina en una base experimental para tratar endocarditis de válvula aórtica por *S. aureus* resistente a metilina.

35

[0005] Se sabe que *Staphylococcus*, en particular *S. aureus* a menudo puede causar envenenamiento de alimentos debido a la producción de enterotoxinas peptídicas termoestables que conducen a intoxicación. Debido a la gran escala de producción de alimentos, el uso de enzimas que destruyan las células de estafilococos para mejorar la calidad microbiológica del alimento es posible solamente si dichas enzimas son fácilmente accesibles y barato. Además, las enzimas estafilolíticas usadas en la industria alimentaria deben ser eficaces en un amplio intervalo de temperaturas, en particular en regímenes de baja temperatura de almacenamiento de alimentos y durante el proceso de producción, manteniendo al mismo tiempo su actividad a baja concentración salina, es decir, en agua que se usa para retirar las bacterias de las instalaciones de tuberías de producción y otras superficies. La lisostafina disponible en el mercado no cumple dichas demandas.

40

[0006] Existen métodos conocidos de lisis de células bacterianas o para dañar las paredes celulares bacterianas que necesitan la desintegración de la estructura de pared celular por enzimas bacterianas específicas. Esto es particularmente cierto para bacterias Gram-positivas a causa de la estructura particular de sus paredes celulares.

Por ejemplo, se usa lisostafina para lisar las células *S. aureus*. Los métodos de lisis celular conocidos requieren que la reacción se realice en condiciones que se parecen a condiciones fisiológicas y se realice a elevadas temperaturas de aproximadamente 30-37°C. En dichas condiciones, los componentes celulares aislados, tales como proteínas o ácidos nucleicos, pueden degradarse por las enzimas liberadas, cuya actividad es habitualmente la más alta en

condiciones fisiológicas. Dicha degradación podría evitarse si la lisis celular efectiva pudiera realizarse en condiciones no fisiológicas, tales como baja concentración de sal o un amplio intervalo de temperaturas, en particular en bajas temperaturas. Existen kits conocidos que contienen lisostafina que se usan para aislar

protoplastos, enzimas, proteínas, componentes celulares o ácidos nucleicos de bacterias Gram-positivas, por ejemplo, de especies de *Staphylococcus*.

60

[0007] LytM es una autolisina producida por *S. aureus*. El gen de LytM de *S. aureus* se clonó y secuenció (Ramadurai L. et al., 1997, J. Bacteriol. 179:3625-31). La proteína se sintetiza con un péptido señal (LytM<sub>1-25</sub>), seguido por un dominio N-terminal que no tiene similitud con el dominio N-terminal de lisostafina. El dominio C-terminal de LytM puede dividirse en una región ocluyente y una región de alta similitud con el dominio catalítico de

lisostafina. El análisis de la estructura de LytM sugiere que LytM de longitud completa no puede tener actividad

65

significativa, porque el sitio activo está ocluido mientras que el dominio catalítico solo debe ser más activo que la proteína de longitud completa. Se sabe que las paredes celulares de las bacterias Gram-positivas difieren en la cantidad y forma de aminoácidos presentes en los puentes interpeptídicos de los peptidoglucanos. Las glicilglicina endopeptidasas pueden requerir cierta cantidad de glicinas en los puentes interpeptídicos que escinden. Se ha demostrado que LytM escinde tetra y pentaglicina pero no una triglicina (Firczuk M. et al., 2005, J.Mol Biol. 354:578-590, Odintsov S. G. et al., 2004, J Mol Biol 335:775-8).

**[0008]** Bardelang et al. (2009, Biochem. J. 418:615-624 han demostrado que LytM puede escindir no solamente peptidoglucanos o péptidos sino también proteínas.

**[0009]** Odintsov S G et al: "Latent LytM at 1.3A Resolution", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, REINO UNIDO, vol. 335, nº 3, 16 de enero de 2004 (2004-01-16), pág. 775-785, XP004480547 describieron la forma activa de LytM<sub>185-316</sub> e indican que degrada las paredes celulares de *S. carnosus* y degrada de forma efectiva pentaglicina en contraste con LytM de longitud completa, en una mezcla de reacción en conductividad por encima de 10 mS/cm.

**[0010]** Firczuk et al: Characterization of a chromosomally encoded glycylglycine endopeptidase of *Staphylococcus aureus*", MICROBIOLOGY, vol. 145, nº 4, 1 de abril de 1999 (1999-04-01), pág. 801-808, XP55033113 describe el uso de lisostafina, una endopeptidasa diferente secretada por *Staphylococcus* sp. como agente antiestafilococos.

**[0011]** El documento WO2010/092333 A1 describe el uso de LytM para detectar patógenos.

**[0012]** El documento WO 2007/130655 A2 describe el uso de LytM en la preparación de un desinfectante o una composición para tratar una infección bacteriana.

Las proteínas recombinantes se producen en muchos casos como proteínas de fusión con marcas adheridas (péptido o proteína) que simplifican su posterior purificación. Sin embargo, es necesario retirar por escisión dichas marcas usando una proteasa específica. Dicha enzima tiene que ser muy efectiva pero también altamente específica para evitar escisión indeseable de la proteína. Las proteasas más habitualmente usadas son: factor Xa, PreScision y proteasas TEV. Son bastante caras y actúan de forma efectiva solamente en condiciones fisiológicas de conductividad aumentada e intervalo de temperatura de 30-40°C. En dichas condiciones, la proteína purificada se expone a la actividad degradante de proteasas presentes en la muestra, que incluso en cantidades residuales podría tener un efecto nocivo sobre la integridad de la proteína.

### Descripción de la invención

**[0013]** A la luz del estado de la técnica descrito, el objeto de la invención presentada es superar las desventajas indicadas y suministrar una enzima lítica con una actividad glicilglicina endopeptidasa activa contra bacterias Gram-positivas, en particular *S. aureus*, que se producirá de forma efectiva, estable, y proporcionará una alta especificidad contra el sustrato y alta actividad en condiciones no fisiológicas de baja concentración salina, que también será efectiva en un amplio intervalo de temperaturas, incluyendo bajas temperaturas.

**[0014]** Un objeto adicional de la invención es proporcionar una nueva herramienta útil en biología molecular en lisis de células bacterianas y en la preparación de proteínas tales como escisión de marcas y proteínas de proteínas de fusión.

**[0015]** Los inventores han descubierto inesperadamente que la forma estable y activa de una autolisina de *S. aureus* (LytM), en particular un fragmento correspondiente al dominio catalítico, supera las desventajas indicadas y es capaz de degradar de forma efectiva las paredes celulares de bacterias Gram-positivas, en particular *S. aureus* en un entorno significativamente diferente de las condiciones fisiológicas, en particular en baja conductividad, baja concentración salina y es efectiva sobre un amplio intervalo de temperaturas, incluyendo bajas y altas temperaturas.

**[0016]** La esencia de esta invención se basa en el hecho de que es posible usar una forma estable de proteína LytM o derivados de la misma para escindir un sustrato peptídico en las condiciones de conductividad inferiores a 10 mS/cm, preferentemente en condiciones de conductividad por debajo de 2 mS/cm, sobre un amplio intervalo de temperaturas.

**[0017]** De acuerdo con esta descripción, la expresión "forma activa de LytM" se refiere a proteínas, polipéptidos, péptidos o proteínas, polipéptidos, péptidos recombinantes de secuencia idéntica o altamente homóloga a la secuencia de aminoácidos de la proteína LytM de *Staphylococcus aureus* desde el resto 185 hasta el resto 316 que sostiene la actividad glicilglicina endopeptidasa característica del dominio catalítico LytM<sub>185-316</sub>. La forma activa preferible de LytM es un fragmento LytM<sub>180-316</sub> escindido de la LytM de longitud completa por tripsina, más preferentemente es LytM<sub>185-316</sub> o derivados de la misma. La forma activa de LytM tiene actividad de glicilglicina endopeptidasa contra sustrato, que está compuesto por al menos cuatro glicinas en una fila. La forma activa de LytM demuestra actividad hidrolítica contra puentes interpeptídicos en peptidoglucanos de bacterias Gram-positivas. Es obvio que algunos cambios en la secuencia de aminoácidos del polipéptido o en la secuencia de nucleótidos que

codifica dicho polipéptido que provocan cambios en la secuencia de aminoácidos no influirán en la actividad del polipéptido.

5 **[0018]** La expresión "derivado de la forma activa de LytM" o "derivado de la LytM<sub>185-316</sub>", que es un dominio catalítico, se refiere a polipéptidos de la secuencia de aminoácidos idéntica o altamente homóloga a la secuencia de la forma activa de LytM o LytM<sub>185-316</sub>, para la cual se han cambiado las secuencias codificantes por reemplazo, delección, inserción, de un modo que la actividad del derivado de la forma activa no esté cambiada.

10 **[0019]** La expresión "secuencia altamente homóloga" significa que la secuencia es homóloga en al menos un 70%, preferentemente en al menos un 80%, o más preferentemente en al menos un 90%, mucho más preferentemente en al menos un 95%.

15 **[0020]** De acuerdo con esta descripción, un "sustrato peptídico" o un "sustrato proteico" para la forma activa de LytM debe entenderse como un péptido o un polipéptido o una proteína compuesta por o que comprende al menos cuatro glicinas en una fila, que se reconocen y escinden pro la forma activa de LytM. En particular, los puentes de glicina en peptidoglucanos de bacterias Gram-positivas compuestos por al menos cuatro o más glicinas en una fila, son los sustratos péptidos de la forma activa de LytM. El sustrato peptídico o sustrato proteico puede ser proteínas de fusión que comprenden al menos cuatro glicinas en una fila en una región enlazadora.

20 **[0021]** Las bacterias Gram-positivas que tienen al menos cuatro glicinas en una fila en sus puentes interpeptídicos pertenecen al género *Staphylococcus*, entre otras especies: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. roseus*, *S. carnosus*, *S. lactis*, *S. saprophyticus* y al género *Micrococcus*, tales como *M. caseolyticus*, *M. candidans*, *M. naucinus*, *M. vernae*.

25 **[0022]** En el primer aspecto, la invención proporciona el método de hidrólisis de péptidos, en particular de las paredes celulares de bacterias Gram-positivas, donde la forma activa de LytM o derivados de la misma se ponen en contacto con un sustrato peptídico, preferentemente con las paredes celulares de bacterias Gram-positivas, en entorno acuoso de conductividad inferior a 10 mS/cm, más preferentemente de conductividad inferior a 2 mS/cm. La forma activa preferida de LytM es el polipéptido LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2 o derivados de la misma. En un método preferido de hidrólisis de péptidos, el contacto se realiza en un intervalo de temperatura de  
30 aproximadamente 0°C a aproximadamente 45°C, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 0-37°C, en particular por debajo de 10°C. Además, el pH de la reacción varía preferentemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, particularmente en el intervalo de aproximadamente 7 a aproximadamente 9. Preferentemente las bacterias Gram-positivas son bacterias que pertenecen al género *Staphylococcus* o *Micrococcus*, más preferentemente especies tales como: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. roseus*, *S. carnosus*, *S. lactis*, *S. saprophyticus* y  
35 *M. caseolyticus*, *M. candidans*, *M. naucinus*, *M. vernae*.

40 **[0023]** La presente descripción también describe una composición para su uso como agente bacteriostático o bactericida (por ejemplo, como bacteriolítico), particularmente contra bacterias Gram-positivas, en particular contra el género *Staphylococcus* o *Micrococcus*, en el que la composición comprende la forma activa de LytM o derivado de la misma, y en el que la composición es para su uso en entorno acuoso de conductividad inferior a 10 mS/cm, preferentemente inferior a 2 mS/cm. En la composición preferida la forma activa de LytM es el polipéptido LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2, o derivados de la misma. La composición preferida es para su uso para desinfectar la superficie y preferentemente está en forma de líquido, emulsión, gel, pulverización, loción o toallitas húmedas. La composición podría suplementarse con un vehículo adecuado, conservante, aroma, tampón y otros componentes  
45 útiles para eliminar bacterias, en particular detergentes, disolventes, antibióticos, y bacteriocinas.

50 **[0024]** La invención también proporciona el uso de una composición que comprende la forma activa de LytM o derivados de la misma, como agente bacteriostático o bactericida o para desinfectar la superficie, preferentemente contra bacterias Gram-positivas, en particular contra el género *Staphylococcus* o *Micrococcus*, en el que dicha composición se usa en entorno acuoso de conductividad inferior a 10 mS/cm, más preferentemente de conductividad inferior a 2 mS/cm. En un uso preferido de la composición, la forma activa de LytM es el polipéptido LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2, o derivados de la misma.

55 **[0025]** La descripción también describe una peptidasa capaz de escindir paredes celulares de bacterias Gram-positivas en un entorno acuoso de conductividad inferior a 10 mS/cm. La peptidasa comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 o derivados de la misma y demuestra actividad sobre sustrato peptídico, en particular sobre puentes interpeptídicos compuestos por al menos cuatro glicinas en peptidoglucanos de bacterias Gram-positivas. La peptidasa preferida es activa en las condiciones de reacción de conductividad por debajo de 2 mS/cm. Además, la peptidasa preferida es activa en el intervalo de temperatura de aproximadamente 0°C a  
60 aproximadamente 45°C, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 0°C a aproximadamente 37°C, en particular por debajo de 10°C.

65 **[0026]** La invención también proporciona el uso de la forma activa de LytM o derivados de la misma como agente bacteriostático o bactericida en industria alimentaria, en el que el agente se usa en las condiciones de reacción de conductividad inferior a 10 mS/cm, preferentemente inferior a 2 mS/cm. La forma activa preferida de LytM es el

polipéptido LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2 o derivados de la misma. El agente se usa preferentemente como aditivo para alimentos humanos o animales o para descontaminar las superficies, preferentemente contra las bacterias Gram-positivas, en particular que pertenecen al género *Staphylococcus* o *Micrococcus*.

5 **[0027]** En el siguiente aspecto, la invención proporciona el uso de la forma activa de LytM o derivados de la misma como agente bacteriostático o bactericida en medicina, veterinaria y diagnóstico, en el que el agente se usa en las condiciones de reacción de conductividad inferior a 10 mS/cm, preferentemente inferior a 2 mS/cm. La forma activa preferida de LytM es el polipéptido LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2 o derivados de la misma. El agente se usa preferentemente para desinfectar las herramientas y equipos usados en medicina, veterinaria y diagnóstico, en particular superficies en hospitales y laboratorios, preferentemente contra bacterias Gram-positivas, particularmente que pertenecen al género *Staphylococcus* o *Micrococcus*.

15 **[0028]** En otro aspecto más, la invención proporciona el uso de la forma activa de LytM o derivados de la misma para aislar los componentes celulares de bacterias Gram-positivas en las condiciones de reacción de conductividad inferior a 10 mS/cm, preferentemente inferior a 2 mS/cm. La forma activa preferida de LytM es el polipéptido LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2, o derivados de la misma. El aislamiento de los componentes celulares se realiza preferentemente en las temperaturas de aproximadamente 0°C a aproximadamente 45°C, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 0-37°C, más preferentemente por debajo de 10°C, particularmente de bacterias que pertenecen al género *Staphylococcus* o *Micrococcus*, particularmente al grupo que incluye *S. aureus*, *S. epidermidis*,  
20 *S. roseus*, *S. carnosus*, *S. lactis*, *S. saprophyticus* y *M. caseolyticus*, *M. candidans*, *M. naucinus*, *M. vernae*.

**[0029]** La invención también proporciona el uso de la forma activa de LytM o derivados de la misma en diagnóstico de bacterias Gram-positivas, particularmente que pertenecen al género *Staphylococcus* o *Micrococcus* en las condiciones de reacción de conductividad inferior a 10 mS/cm, preferentemente inferior a 2 mS/cm, en el que la forma activa preferida de LytM es el polipéptido LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2 o derivados de la misma.

**[0030]** En otro aspecto, la invención proporciona el uso de la forma activa de LytM o derivados de la misma para impregnar o recubrir la superficie expuesta a bacterias Gram-positivas, en el que las condiciones en que se usa la forma activa de LytM o derivados de la misma como impregnación o como recubrimiento de una superficie tiene la conductividad inferior a 10 mS/cm, preferentemente inferior a 2 mS/cm. Dicha forma activa preferida de LytM es el polipéptido LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2 o derivados de la misma.

**[0031]** La presente descripción también describe un kit para la lisis de las bacterias Gram-positivas que comprende la forma activa de LytM o derivados de la misma, en el que la forma activa de LytM o derivados de la misma se usan en un entorno de conductividad inferior a 10 mS/cm, preferentemente inferior a 2 mS/cm. Dicha forma activa preferida de LytM es el polipéptido LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2 o derivados de la misma. La lisis de células bacterianas se realiza para aislar los componentes celulares de bacterias Gram-positivas, en particular ADN, ARN, proteínas, péptidos, glucopéptidos, lípidos, elementos celulares y metabolitos útiles.

40 **[0032]** La forma activa de LytM o derivado de la misma se está usando en el método para preparar una proteína por escisión enzimática de una marca de un sustrato proteico, que es preferentemente una proteína de fusión. La proteína de fusión es una proteína recombinante producida en un sistema de expresión a partir del ácido nucleico introducido/modificado por ingeniería en que la secuencia codificante de la proteína se une a la secuencia codificante de una marca. La secuencia enlazadora se diseña para codificar una secuencia de reconocimiento para la proteasa específica usada para retirar por escisión la marca de la proteína de fusión recombinante. Cuando la forma activa de LytM se usa para retirar por escisión la marca, el enlazador peptídico tiene que contener al menos cuatro o más glicinas en una fila.

50 **[0033]** En el siguiente aspecto, la presente descripción describe un método para preparar una proteína por escisión enzimática de una marca de un sustrato proteico que es una proteína de fusión, comprendiendo dicho método las siguientes etapas: se forma una proteína de fusión por unión de una secuencia que codifica la proteína con una secuencia que codifica el enlazador que tiene al menos cuatro o más glicinas en una fila, y en la siguiente etapa se retira por escisión la proteína de fusión con la forma activa de LytM o derivados de la misma. La forma activa preferida de LytM es LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2 o derivados de la misma. La segunda etapa del método se realiza preferentemente en conductividad inferior a 10 mS/cm, preferentemente inferior a 2 mS/cm y/o a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 0°C a aproximadamente 45°C, más preferentemente en el intervalo de 0-37°C, en particular inferior a 10°C.

60 **[0034]** La invención también proporciona el uso de una forma activa de LytM o derivado de la misma para escindir una o más marcas o proteínas de un sustrato proteico, preferentemente de una proteína de fusión, en que la escisión es en la región enlazadora del sustrato proteico que comprende al menos cuatro o más glicinas en una fila. Preferentemente, la forma activa de LytM es la LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2 o derivados de la misma. Preferentemente la escisión se realiza en conductividad inferior a 10 mS/cm, preferentemente inferior a 2 mS/cm y/o en un intervalo de temperatura de 0°C a aproximadamente 45°C, más preferentemente en el intervalo de 0-37°C, en particular inferior a 10°C.

- La forma activa de LytM o derivados de la misma podría usarse como agente bacteriostático o bactericida (por ejemplo, bacteriolítico) en medicina, veterinaria o diagnóstico. La forma activa de LytM o derivado de la misma se usa preferentemente en las condiciones de reacción de conductividad inferior a 10 mS/cm, preferentemente inferior a 2 mS/cm. La forma activa preferida de LytM es LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2 o derivados de la misma. El agente bacteriostático o bactericida que comprende la forma activa de LytM se usa contra bacterias Gram-positivas, preferentemente que pertenecen al género *Staphylococcus* o *Micrococcus*. Dicho agente bacteriostático o bactericida es útil para desinfectar las superficies de herramientas y equipos usados en medicina, veterinaria y diagnóstico, superficies de hospitales y laboratorios y como agente tensioactivo sobre superficies que pueden contaminarse por bacterias. Dicho agente podría usarse solo o en combinación con otros componentes usados para eliminar bacterias, particularmente detergentes, disolventes, antibióticos, bacteriocinas u otras enzimas. Aunque el agente se use en combinación, dicha composición puede comprender adicionalmente un vehículo adecuado, estabilizante, tampón u otros aditivos. La forma activa de LytM o derivados de la misma podrían usarse como agente bacteriostático o bactericida en una forma de líquido, emulsión, gel, pulverización, loción, toallitas húmedas o similares.
- 15 La forma activa de LytM o derivados de la misma se usa como componente para el diagnóstico de ciertas especies de bacterias Gram-positivas, preferentemente que pertenecen al género *Staphylococcus* o *Micrococcus*, en particular especies tales como por ejemplo: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. roseus*, *S. carnosus*, *S. lactis*, *S. saprophyticus* así como *M. caseolyticus*, *M. candidans*, *M. naucinus*, *M. vernae*. La forma activa de LytM o derivados de la misma preferentemente se usarán en condiciones de conductividad inferior a 10 mS/cm, más preferentemente inferior a 2 mS/cm. La forma activa de LytM o derivados de la misma podría usarse como herramienta para realizar hidrólisis de péptidos específica de bacterias para diagnóstico directo de especies o cepas bacterianas así como en la fase de lisis celular preliminar para diagnóstico adicional con, por ejemplo, métodos tales como PCR, hibridación de ácido nucleico, métodos inmunológicos e inmunofluorescentes, ELISA, y métodos basados en componentes celulares tales como ensayos enzimáticos y otros.
- 25 La forma activa de LytM o derivados de la misma se usas como herramientas para desintegrar las paredes celulares de bacterias Gram-positivas por ejemplo para aislar componentes de células de bacterias Gram-positivas en las condiciones de reacción de conductividad inferior a 10 mS/cm, preferentemente inferior a 2 mS/cm. La forma activa preferida de LytM es LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2, o derivados de la misma. El aislamiento de los componentes celulares podría realizarse en temperaturas de aproximadamente 0°C a aproximadamente 45°C, preferentemente en el intervalo de 0 - 37°C, en particular por debajo de 10°C. La forma activa de LytM o derivados de la misma se usan preferentemente para aislar componentes de células del género *Staphylococcus* o *Micrococcus* en particular especies tales como por ejemplo: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. roseus*, *S. carnosus*, *S. lactis*, *S. saprophyticus* así como *M. caseolyticus*, *M. candidans*, *M. naucinus*, *M. vernae*. La desintegración de las paredes celulares bacterianas para lisar las bacterias puede asistirse mediante la adición de detergentes u otros factores que debilitan la estructura de la pared celular, tales como otras enzimas. La desintegración de las paredes celulares también podría realizarse para liberar protoplastos, posibilitar la transformación de células bacterianas, para aislar ácidos nucleicos, proteínas, péptidos así como metabolitos útiles tales como carbohidratos de cadena larga.

- [0035]** La forma activa de LytM o derivados de la misma, en particular LytM<sub>185-316</sub> o derivados de la misma, por lo tanto se usa en kits pretendidos para desintegrar pared celulares de bacterias Gram-positivas por ejemplo para aislar componentes celulares de bacterias Gram-positivas en condiciones de reacción de conductividad inferior a 10 mS/cm, preferentemente inferior a 2 mS/cm. Dichos kits también se describen. La forma activa de LytM o derivado de la misma se usa como agente bacteriostático o bactericida en industria alimentaria. La forma activa de LytM o derivados de la misma se usa preferentemente en la condiciones de reacción de conductividad inferior a 10 mS/cm, preferentemente inferior a 2 mS/cm. La forma activa preferida de LytM es el polipéptido LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2, o derivados de la misma. El agente bacteriostático o bactericida que comprende la forma activa de LytM se usa contra bacterias Gram-positivas, preferentemente que pertenecen al género *Staphylococcus* o *Micrococcus*. Dicho agente bacteriostático o bactericida se usa como aditivo para alimentos para seres humanos o animales, para desinfectar las superficies, que entran en contacto con alimentos, en particular herramientas y equipos usados en industria alimentaria así como espacios que entran en contacto con alimentos o productos intermedios. La forma activa de LytM o derivados de la misma se usan en particular en la industria láctea y productos lácteos. La forma activa de LytM o derivados de la misma se usan para impregnar o para recubrir superficies expuestas a bacterias Gram-positivas, en el que el entorno en que se usa como impregnación o recubrimiento tiene la conductividad inferior a 10 mS/cm, preferentemente inferior a 2 mS/cm. La forma activa preferida de LytM es el polipéptido LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2, o derivados de la misma. La forma activa de LytM puede conjugarse o añadirse a vehículos como polímeros, copolímeros o nanovehículos tales como nanobolas o nanotubos, por ejemplo nanotubos de carbono. Las superficies recubiertas o impregnadas pueden afectar a diversas superficies por ejemplo espacios, herramientas, máquinas, aparatos, equipos médicos, equipos de diagnóstico o equipos de laboratorio. Dichas superficies impregnadas o recubiertas con una capa que comprende la forma activa de LytM o derivados de la misma actuarán mediante el periodo prolongado de tiempo como agente bacteriostático o bactericida sobre bacterias Gram-positivas.

- [0036]** La forma activa de LytM o derivados de la misma se usan como agente bacteriostático o bactericida en industria cosmética. La forma activa de LytM o derivados de la misma se usarán preferentemente en las condiciones de reacción de conductividad inferior a 10 mS/cm, preferentemente inferior a 2 mS/cm. La forma activa preferida de

LytM es el polipéptido LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2 o derivados de la misma. El agente bacteriostático o bactericida que comprende la forma activa de LytM se usa contra bacterias Gram-positivas, preferentemente que pertenecen al género *Staphylococcus* o *Micrococcus*. Dicho agente bacteriostático o bactericida se está usando como aditivo a cosméticos que mejora su calidad microbiológica, o como aditivo a líquidos, cremas, emulsiones y lociones o como agente para desinfectar superficies o para desinfectar superficies de diversos aparatos, como herramientas y equipos usados en industria cosmética.

La forma activa de LytM o derivados de la misma es una peptidasa de especificidad muy elevada contra secuencias de al menos cuatro o más glicinas en una fila. Las secuencias reconocidas por LytM son muy raras en proteínas. Además, la escisión realizada por la forma activa de LytM o derivados de la misma es muy efectiva en condiciones de baja conductividad como inferior a 10 mS/cm o incluso por debajo de 2 mS/cm sobre un amplio intervalo de temperaturas de aproximadamente 0°C a aproximadamente 45°C, más preferentemente en el intervalo de 0 - 37°C, en particular en temperaturas bajas por debajo de 10°C. Por lo tanto, LytM puede escindir la proteína de un sustrato proteico incluso en condiciones en que está suprimida la actividad de otras proteasas. Esta ventaja permite usar la forma activa de LytM o derivados de la misma en condiciones en que la actividad degradante de proteasas contaminantes u otras impurezas está significativamente reducida o su actividad es insignificante. La forma activa de LytM o derivados de la misma se usa para escindir la proteína de un sustrato proteico, preferentemente una proteína de fusión, en que la escisión es en el sitio del enlazador del sustrato proteico de secuencia que comprende al menos cuatro o más glicinas en una fila.

#### 20 La forma activa de LytM reconoce los peptidoglucanos bacterianos directamente

**[0037]** Las afinidades de lisostafina y LytM por diferentes preparaciones de paredes celulares agitadas de ciertos componentes (por ejemplo proteínas, ácidos teicoico y lipoteicoico), así como peptidoglucanos purificados disponibles en el mercado se compararon en el ensayo de despliegue (Fig. 2). En todos los casos la lisostafina se unió a las preparaciones de pared celular con diversas eficacias (Fig. 2A). LytM<sub>185-316</sub> no se unió de forma efectiva a los extractos crudos sonicados de las paredes celulares. Después de lavado adicional de las paredes celulares, que probablemente eliminó el acceso de sales o/y finalmente algunos inhibidores, la LytM<sub>185-316</sub> se unió de forma efectiva en el ensayo de despliegue. La purificación adicional no influyó en la unión significativamente. Estos resultados indican que LytM<sub>185-316</sub> se une a las paredes celulares directamente e interacciona más con peptidoglucanos que con otros componentes de las paredes celulares (Fig. 2B).

#### El papel de diversos fragmentos de LytM y la necesidad de la integridad del sitio activo para la unión de LytM a peptidoglucanos

**[0038]** Se ensayó el papel de diversos fragmentos de LytM en la unión de peptidoglucanos en el ensayo de despliegue (Fig. 3A). Se compararon las cantidades de proteína en el sobrenadante y en la fracción unida indicando que la proteína de longitud completa (LytM<sub>26-316</sub>) no se une a peptidoglucanos. La mutación del ligando Zn<sup>2+</sup> Asn117 a alanina debe desbloquear el acceso al centro activo del dominio catalítico pero dicho cambio no tuvo influencia significativa sobre la unión a peptidoglucano. El dominio N-terminal aislado (LytM<sub>24-105</sub>) no se unió a peptidoglucanos mientras la forma activa de LytM (LytM<sub>185-316</sub>) se unía a los peptidoglucanos de forma efectiva. Cuando se mutaron por separado otros dos ligandos Zn<sup>2+</sup> H210 y D214 en alaninas, la proteína perdió la capacidad de unión. El intercambio del cuarto ligando Zn<sup>2+</sup>, His293 del motivo HxH en alanina produjo proteína insoluble (Odintsov S. G. et al., 2004, J Mol Biol 335:775-85) que impidió el ensayo. El intercambio de la primera histidina His291 del motivo HxH en alanina produjo unión de peptidoglucano menos efectiva pero no completamente suprimido.

**[0039]** La necesidad de la integridad del centro activo para la unión efectiva a peptidoglucanos también se confirmó por ensayo del efecto de inhibidores. Se demostró que quelantes de iones inhiben la unión de LytM<sub>185-316</sub> a peptidoglucanos (Fig. 3B, carriles 1-2). Sin embargo, el débil quelante de iones Zn<sup>2+</sup>, hidroxamato de glicina, y otros inhibidores de proteasa no influyeron en la unión a peptidoglucanos (Fig. 3B, carriles 3-6). Los resultados muestran que la accesibilidad e integridad del centro activo son necesarias para la unión activa de proteína LytM a peptidoglucanos (Fig. 3). El ejemplo de dicha forma activa de LytM que tiene centro activo accesible con integridad sostenida es LytM<sub>180-316</sub> generada por escisión del dominio N-terminal y la región ocluyente de la LytM de longitud completa por tripsina, así como la LytM<sub>185-316</sub> recombinante expresada en *E. coli*.

#### La ausencia del dominio de dirección a la pared celular (CWT) en la forma activa de LytM

**[0040]** Tanto lisostafina como LytM<sub>185-316</sub> se unen a interpuentes de pentaglicina en peptidoglucanos de *S. aureus*. Ambas proteínas reconocen interpuentes tal cual, probablemente al menos parcialmente por interacción en la hendidura de sitio activo. La lisostafina tiene un dominio adicional que se une a la pared celular que proporciona especificidad. La LytM de longitud completa y LytM<sub>185-316</sub> carecen de dicho dominio, por lo tanto había una posibilidad de que el dominio N-terminal de la proteína de longitud completa desempeñara dicho papel, especialmente a la luz de la alta homología observada con SsaA (antígeno secretor A de estafilococos). Sin embargo, los experimentos refutan dicha posibilidad, ya que ni la proteína de longitud completa LytM ni el dominio N-terminal generado por separado LytM<sub>24-105</sub> se unen a peptidoglucanos.

Preferencia de sustrato de la forma activa de LytM

[0041] La forma activa de LytM (LytM<sub>185-316</sub>) se une a los peptidoglucanos purificados de forma más efectiva mientras que la lisostafina se une mejor a extractos crudos, lo que sugiere que la lisostafina también reconoce otros componentes de las paredes celulares. Los autores de esta invención han demostrado que la forma activa de LytM se une a peptidoglucanos de estafilococos directamente y que se une a peptidoglucanos lavados con Tris-HCl 20 mM pH 7,5 que podría eliminar el acceso de sales y/o inhibidores de forma más efectiva.

La resistencia de la forma activa de LytM a proteasas bacterianas

[0042] Los autores de esta invención han demostrado que la forma activa de LytM, especialmente LytM<sub>185-316</sub>, se producía de forma efectiva como una proteína recombinante en *E. coli*, es muy estable en presencia de proteasas de estafilococos.

La forma activa de LytM lisa de forma efectiva las células vivas de *S. aureus*

[0043] Los autores han demostrado que la forma activa de LytM aplicada de forma externa lisa de forma efectiva células vivas de bacterias Gram-positivas, particularmente *S. aureus*, por unión y lisis de sustratos peptídicos de sus paredes celulares en condiciones de baja conductividad. La LytM aplicada de forma externa inhibía el crecimiento de estafilococos y actuaba como un agente bacteriostático y bactericida lo que conduce a lisis de las células de *S. aureus*, que se demostró en los ensayos realizados de lisis celular controlada por los cambios de la densidad óptica de suspensión celular. Los experimentos previos han demostrado solamente la capacidad de LytM<sub>185-316</sub> de digerir tetra- y pentaglicina en experimentos *in vitro*. No fue obvio que la forma activa de LytM aplicada de forma externa a la solución de células vivas bacterianas no se degradara instantáneamente y fuera capaz de unirse de forma efectiva y degradar los sustratos peptídicos en las paredes celulares de las células vivas de *S. aureus*.

Las actividades de la forma activa de LytM y lisostafina dependen del pH de un modo diferente

[0044] La actividad de las peptidoglucano hidrolasas se determinó en los ensayos de lisis de paredes celulares de *S. aureus* controlando los cambios de densidad óptica de la suspensión celular. Se observó una disminución insignificante de la densidad óptica también en el control sin enzima añadida, probablemente debido a la actividad enzimática residual de las enzimas de la pared celular. Por lo tanto, todos los valores de DO a 595 nm se presentan como un porcentaje del control. El valor cercano al 100% indica baja actividad mientras que un bajo porcentaje indica alta actividad de la enzima. Tanto lisostafina como LytM<sub>185-316</sub> fueron eficaces de forma solamente insignificante a pH aproximadamente 6 (tampón fosfato 50 mM) pero fueron más eficaces en pH aproximadamente 7. Un aumento adicional del pH de 7 a 9 (Tris-HCl 50 mM) tuvo poca influencia sobre la actividad de lisostafina pero tuvo impacto sobre el aumento de actividad LytM<sub>185-316</sub> (Fig. 5). Los autores de la invención han demostrado que la forma activa de LytM actúa de forma efectiva en el intervalo de pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, particularmente en el intervalo de pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 9.

Dependencia de la actividad de la forma activa de LytM y lisostafina sobre la conductividad de las condiciones de reacción

[0045] Inesperadamente, resultó que la eficacia de la lisis de bacterias por la forma activa de LytM depende sustancialmente del tampón de reacción. Por ejemplo la actividad de LytM<sub>185-316</sub> fue mayor en 20 mM que en 50 mM de Tris-HCl (ambos a pH 8,0) y fue incluso mayor cuando se reemplazó Tris por glicina a pH 8,0. Sin embargo, la glicina no actúa como activador alostérico ya que no potencia la actividad cuando se añade en presencia de tampones de diferente composición. También se observaron resultados similares de dependencia de la actividad sobre la conductividad para tampones de diferentes composiciones (Fig. 8).

[0046] La actividad lítica de LytM<sub>185-316</sub> y lisostafina depende de forma obvia de la conductividad del tampón (Fig. 6); en tampones de baja conductividad la degradación de las paredes celulares de *S. aureus* por lisostafina es inefectiva en contraste con LytM<sub>185-316</sub> que actúa mejor en tampones de baja conductividad mientras que es menos efectiva en tampones de alta conductividad.

[0047] La baja conductividad refleja ambos parámetros, la concentración de iones y su movilidad. El efecto de la conductividad sobre la actividad de LytM<sub>185-316</sub> se ensayó en soluciones de diversa fuerza iónica cambiando la concentración de NaCl de 0 a 500 mM. La actividad de lisostafina y LytM<sub>185-316</sub> resultó ser dependiente de la fuerza iónica de un modo predicho pero la conductividad en este experimento estaba más directamente correlacionada con la fuerza iónica (Fig. 7).

[0048] La forma activa de LytM (LytM<sub>185-316</sub>) actúa en soluciones con una baja concentración de sal de conductividad de aproximadamente 10 mS/cm correspondiente aproximadamente a una concentración de NaCl de 100 mM. La alta actividad preferida de LytM<sub>185-316</sub> se ha demostrado en soluciones de conductividad por debajo de 2 mS/cm correspondiente a la concentración total aproximada de iones de 15-20 mM para cationes y aniones



ligeramente cargados de movilidad típica, así como en agua doblemente destilada.

#### Dependencia de la actividad de la forma activa de LytM y lisostafina en la temperatura

- 5 **[0049]** Se ha demostrado que la forma activa de LytM es una proteína estable que actúa de forma efectiva sobre un amplio intervalo de temperaturas de aproximadamente 0°C a aproximadamente 50°C, particularmente en el intervalo de aproximadamente 0°C a 45°C, preferentemente en temperaturas de 0 - 37°C, más preferentemente de 0 - 25°C, particularmente en temperatura por debajo de 10°C. Es particularmente sorprendente la alta actividad de la forma activa de LytM en temperatura de aproximadamente 4°C en que LytM<sub>185-316</sub> es varias veces más activa que

10 lisostafina.

Breve descripción de los dibujos

- [0050]** Para comprender la invención mejor, se presentan varios ejemplos de uso y figuras a modo de ejemplo 15 solamente.

**Figura 1** (A) ilustra una organización esquemática de los dominios en la LytM de longitud completa y preprolisostafina: SP - péptido señal, ND - dominio N-terminal, OR - región ocluyente, CD - dominio catalítico, CWT - dominio de dirección a pared celular. La alineación muestra la similitud significativa de estas dos proteínas en la región de dominio catalítico. Los motivos Hx<sub>3</sub>D y HxH contienen restos catalíticos. Ambos aminoácidos, His y Asp, en el motivo Hx<sub>3</sub>D así como la segunda His en el motivo HxH son ligandos de Zn<sup>2+</sup>. La primera His del motivo HxH está localizada en las cercanías de Zn<sup>2+</sup> pero no coordina el ión. Se ensayaron las variantes de LytM con restos indicados (negrita) mutados a alaninas. Un mutante en que la segunda His del motivo HxH se mutó a alanina no pudo usarse a causa de la insolubilidad. (B) ilustra la representación esquemática de lisostafina (Lss), LytM y sus fragmentos usados en los ejemplos de uso.

**Figura 2** ilustra resultados del ensayo de despliegue de (A) lisostafina, (B) LytM<sub>185-316</sub> y (C) LytM<sub>26-316</sub> con paredes celulares de *S. aureus* tratadas de diversos modos. (1) Entrada (proteína de control), (2) paredes celulares crudas sonicadas, (3) paredes celulares crudas lavadas, (4) paredes celulares tratadas con SDS, (5) paredes celulares tratadas con TCA, (6) paredes celulares tratadas con tripsina, (7) peptidoglucanos purificados, (8) peptidoglucanos disponibles en el mercado (Fluka). Las proteínas que se usaron como entrada (carril 1) o desplegadas (carriles 2-8) se visualizaron por transferencia de Western con los anticuerpos anti-LytM.

**Figura 3** ilustra resultados del ensayo de despliegue con peptidoglucanos purificados de *S. aureus*. (A) La LytM de longitud completa y sus diversos fragmentos se analizaron por electroforesis en gel desnaturizante y tinción con Coomassie directamente (control, C) o después de separación en fracciones de unión a peptidoglucano (PG) y sobrenadante (S). (B) Se incubó LytM<sub>185-316</sub> con peptidoglucanos en presencia de diversos inhibidores de proteasa y la fracción de sedimento después de despliegue se analizó por electroforesis en gel desnaturizante y transferencia de Western con anticuerpos anti-LytM. (1) EDTA 10 mM, (2) 1,10-fenantrolina 1 mM, (3) N-acetilglucosamina 10 mM, (4) hidroxamato de glicina 10 mM, (5) PMSF 1 mM, (6) E-64 1 mM, (C) control sin inhibidores.

**Figura 4** ilustra los resultados de ensayo de estabilidad de la forma activa de LytM<sub>185-316</sub> en presencia de células de *S. aureus* y proteasas secretadas de estafilococos. La proteína LytM<sub>185-316</sub> se incubó con células de *S. aureus* ((+)S.A) o en las mismas condiciones pero sin células de *S. aureus* ((-) S.a.) durante 1 hora (1 h) o 4 horas (4 h). Se usó la cantidad idéntica de proteína LytM<sub>185-316</sub> no incubada a 37°C (0 h) como control. Después incubación las muestras se separaron electroforéticamente en geles de SDS-PAGE y se visualizaron por hibridación de transferencia de Western con anticuerpos anti-LytM.

**Figura 5** ilustra la actividad de lisostafina (líneas continuas) y LytM<sub>185-316</sub> (líneas discontinuas) en tampón Tris 50 mM a pH 7,0 (cuadrados), 8,0 (círculos) y 9,0 (triángulos), respectivamente. Se recogieron células de *S. aureus* en la fase de crecimiento exponencial, se lavaron y resuspendieron en el tampón de ensayo a una DO<sub>595</sub> aparente ~1,8. La adición de LytM<sub>185-316</sub> o lisostafina (ambas a concentración final 18 mM) condujo a lisis celular, que redujo la dispersión de luz y por tanto la DO<sub>595</sub> aparente. Como también se observó algún descenso de DO en ausencia de enzima, todos los valores de DO<sub>595</sub> se expresaron como porcentaje del control sin enzima.

**Figura 6** ilustra el efecto de diversos tampones sobre la actividad lítica *in vitro* de LytM<sub>185-316</sub> (cuadrados abiertos) y lisostafina (cuadrados cerrados). La lisis se realizó en los siguientes tampones: (1) agua dd, (2) glicina-NaOH, (3) D,L-alanina-NaOH, (4) diglicina-NaOH, (5) bicina-NaOH, (6) triglicina-NaOH, (7) Tris-HCl, (8) Hepes-NaOH, (9) tampón fosfato, (10) L-arginina-HCl, (11) ácido L-glutámico-NaOH, (12) ácido diaminopimélico-NaOH. Todos los tampones estaban 50 mM con pH ajustado a 8,0 y los datos se recogieron después de 60 min de reacción. La conductividad de los tampones se midió a temperatura ambiente después de la adición de células de *S. aureus*.

**Figura 7** ilustra el efecto de la fuerza iónica del tampón de reacción sobre la actividad lítica de lisostafina y LytM<sub>185-316</sub>. La lisis se realizó en condiciones convencionales (Ejemplo 9b) en tampón glicina 20 mM pH 8,0 suplementado con NaCl 0 a 500 mM. La conductividad de la reacción se midió a temperatura ambiente después de la adición de células de *S. aureus*. Los resultados presentados se recogieron después de 60 min. de reacción de lisis a 37°C.

**Figura 8** ilustra el efecto de diversas condiciones de reacción sobre la actividad lítica de lisostafina y LytM<sub>185-316</sub>. (A) Efecto de glicina. Se hicieron experimentos de lisis en glicina-NaOH 100 mM, pH 8,0 (Gly), Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 y glicina 100 mM (Gly) en Tris-HCl 50 mM pH 8,0. (B) Efecto de mono- (Gly) di- (2Gly) y triglicina (3Gly)

en lisis celular. Los tampones se prepararon como 50 mM con pH ajustado a 8,0 usando NaOH. Para comparación también se comprobó la lisis en agua dd. (C) Efecto de diversos aminoácidos. Se ensayaron D,L-alanina-NaOH (Ala), L-arginina-HCl (Arg), ácido L-glutámico-NaOH (Glu), (12) ácido diaminopimélico (DAP)-NaOH de pH 8,0. Se realizaron experimentos de lisis como se describe en el Ejemplo 8.

5 Figura 9 ilustra la comparación de la actividad de la forma activa de LytM (LytM<sub>185-316</sub>) y lisostafina (Lss) en diversas temperaturas. Los resultados se presentan como porcentaje de la DO inicial (%DO<sub>600</sub>) de la suspensión celular de *S. aureus*. Los resultados se obtuvieron para reacciones realizadas durante 60 min. en tampones óptimos para cada enzima en temperaturas de 4°C, 23°C y 37°C.

10 Figura 10 ilustra la actividad de la forma activa de LytM a diversas temperaturas. Los resultados se presentan como porcentaje de la DO inicial (%DO<sub>600</sub>) de la suspensión celular de *S. aureus*. Los resultados se obtuvieron para la reacción realizada durante 60 min. en tampones óptimos para cada enzima en temperaturas de 0, 4, 10, 15, 23, 37 y 45°C, respectivamente.

### Descripción de realizaciones

15 **[0051]** Los siguientes ejemplos se presentan solamente para ilustrar la invención y para explicar cierto aspecto de la misma y no para limitar la invención, por lo tanto no deben identificarse con su alcance completo, que se define en las reivindicaciones adjuntas.

### 20 Ejemplos

#### Ejemplo 1

#### Producción de diversas formas de proteína LytM

25 **[0052]** Los fragmentos de ADN correspondientes a las proteínas LytM<sub>24-105</sub>, LytM<sub>185-316</sub> y LytM<sub>26-316</sub> se amplificaron por PCR a partir del clon LytM de longitud completa descrito previamente (Odintsov et al., 2004, J. Mol. Biol. 335:775-785), se insertaron en el vector pET15mod y se llamaron pET15modLytM<sub>24-105</sub>, pET15modLytM<sub>185-316</sub>, pET15modLytM<sub>26-316</sub>, respectivamente. Se fusionaron marcas de histidina a una parte N-terminal de las  
30 construcciones codificadas por los fragmentos LytM. La secuencia codificante de LytM<sub>185-316</sub> estaba precedida por una marca His de la siguiente secuencia MGHHHHHHEF. Las formas solubles de LytM<sub>24-105</sub>, LytM<sub>185-316</sub> y LytM<sub>26-316</sub> se obtuvieron expresando las construcciones en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) del modo descrito para LytM<sub>185-316</sub> en Odintsov S.G. et al., 2004, J.Mol. Biol. 335:775-785. La expresión de proteínas se indujo durante la fase logarítmica del crecimiento bacteriano (DO<sub>595</sub> de 0,8) mediante la adición de IPTG 1 mM y se continuó durante 4 h a 25°C. La  
35 proteína recombinante se purificó por cromatografía de afinidad sobre una columna de nitrilo-ácido triacético (NTA) agarosa cargada con Ni<sup>2+</sup> (Qiagen), seguido de filtración en gel en una columna Sephacril S200 (Amersham Bioscience) de acuerdo con la descripción del fabricante. En los ejemplos presentados a continuación se usó la forma estable y activa de LytM<sub>185-316</sub> con marca His pero no se observaron diferencias en la unión y actividad de la forma activa de LytM con y sin marca His.

40 **[0053]** Los mutantes puntuales N117A, H210A, D214A, H291A, H293A se crearon por mutagénesis basada en PCR usando el kit Stratagene. Todos los mutantes se generaron en vector pET15modLytM<sub>155-316</sub>. La expresión y purificación de las proteínas mutadas fueron iguales que para la proteína LytM<sub>185-316</sub>. La lisostafina (forma madura) usada en los ejemplos presentados se adquirió de Sigma y se usó sin purificación adicional.

#### 45 Ejemplo 2

#### Generación de anticuerpos policlonales anti-LytM<sub>185-316</sub>

50 **[0054]** Se crearon anticuerpos policlonales contra LytM<sub>185-316</sub> en conejo (Pineda Antibody Service, Berlín, Alemania). La purificación de anticuerpo se realizó por afinidad a proteína LytM<sub>185-316</sub> acoplada a Sepharose 4B activado por CNBr (Amersham Bioscience) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de lavado, los anticuerpos se eluyeron con glicina 100 mM pH 2,7. El pH del eluyente se neutralizó inmediatamente mediante la adición de 1/10 volumen de Tris-HCl 2 M pH 8,0. La concentración de los anticuerpos en el eluyente se estimó en  
55 base a la absorción a DO<sub>280</sub>.

#### Ejemplo 3

#### Generación de fragmentos de pared celular y peptidoglucanos de *S. aureus*

60 **[0055]** Se recogieron cultivos en fase exponencial tardía de *S. aureus* cultivados en medio de caldo CASO a 37°C por centrifugación, se resuspendieron en tampón A (Tris-HCl 20 mM pH 7,5) y se sometieron a autoclave durante 20 min. El extracto crudo se obtuvo después de sonicar las células durante 3 min. Los polímeros de pared secundarios se retiraron por los siguientes métodos:

65

- Paredes celulares tratadas con SDS se hirvieron en SDS al 4% durante 30 min,
- Paredes tratadas con tripsina se prepararon por digestión con tripsina 8 h (0,5 mg/ml) a 37°C
- Se realizó tratamiento con ácido tricloroacético (TCA) por incubación 48 h en TCA al 10% a 4°C,
- Se prepararon peptidoglucanos purificados como se ha descrito previamente Odintsov S.G. et al., 2004, J. Mol. Biol. 335:775-785 combinando todos los métodos descritos anteriormente.

**[0056]** Después de cada uno de estos tratamientos, las paredes celulares se lavaron extensivamente en Tris-HCl 20 mM pH 7,5.

#### 10 Ejemplo 4

##### **Unión de diversas formas de LytM y lisostafina a peptidoglucanos en el ensayo de despliegue**

**[0057]** Para evaluar la unión, se mezclaron 2 µg de proteína producida en el Ejemplo 1 y lisostafina (Sigma) con 15 paredes celulares o peptidoglucanos (100 µg) producidos en el Ejemplo 3 y peptidoglucanos purificados disponibles en el mercado (Fluka Biochemika, 77140) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Después, se separaron fracciones soluble e insoluble por centrifugación y los peptidoglucanos se lavaron con tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 50 mM. Las fracciones solubles y peptidoglucanos lavados se mezclaron con tampón de carga y se separaron por SDS-PAGE. Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron en membrana ECL 20 (Amersham Bioscience) por transferencia semiseca y después se incubaron con 0,5 µg/ml de anticuerpos purificados contra proteína LytM<sub>185-316</sub> producida en el Ejemplo 2. Se detectaron anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo conjugados con peroxidasa (Sigma) usando reactivo Luminol de transferencia de Western (Santa Cruz Biotechnology) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La lisostafina también se reconoció por los anticuerpos. Los resultados se presentan en la Fig. 2. La forma activa de LytM (LytM<sub>185-316</sub>) reconoce diferentes 25 componentes de las paredes celulares que lisostafina - la capacidad de lisostafina y la forma activa de LytM<sub>185-316</sub> se compararon en el ensayo de despliegue con diversas preparaciones de las paredes celulares de las que se retiraron diferentes componentes, aparte de peptidoglucanos (Fig. 2).

**[0058]** Las paredes celulares se usaron crudas (carril 2) o sometidas a una etapa de lavado adicional en Tris-HCl 30 20 mM pH 7,5 (carril 3), a tratamiento con SDS, que debe eliminar los componentes lipídicos (carril 4), a tratamiento con TCA, que está pensado para retirar ácidos teicoicos (carril 5), o a tratamiento con tripsina, que puede esperarse para retirar componentes proteicos de las paredes celulares (carril 6). El ensayo de despliegue también se realizó con peptidoglucano "purificado", que se obtuvo de preparaciones de pared celular cruda mediante una combinación de los tratamientos con SDS, TCA y tripsina (carril 7), y con peptidoglucano purificado de una fuente comercial 35 (Fluka Biochemika) (carril 8). En todos los casos, la lisostafina se unió a las preparaciones de pared celular aunque con diferente eficacia.

**[0059]** Los resultados obtenidos muestran que la unión de lisostafina a extracto crudo fue la más efectiva probablemente debido a interacciones entre lisostafina y componentes no peptidoglucanos de paredes celulares de 40 *S. aureus* (Fig. 2A). En contraste, LytM<sub>185-316</sub> no se unió de forma efectiva por extracto sonificado sin lavado adicional. Sin embargo, cuando las paredes celulares se sometieron a una etapa de lavado adicional antes del ensayo de despliegue la LytM<sub>185-316</sub> se unió de forma efectiva. Esta purificación por lavado en Tris-HCl 20 mM pH 7,5 podría disminuir la concentración salina en las condiciones de reacción pero también es posible que los elementos inhibidores potenciales se retiraran de las paredes celulares sonicadas. La purificación adicional tuvo 45 poco efecto sobre el resultado del ensayo de despliegue. Los autores por lo tanto han demostrado que la forma activa de LytM<sub>185-316</sub> interacciona principalmente con peptidoglucanos en lugar de con otros componentes de las paredes celulares (Fig. 2B). LytM de longitud completa (sin péptido señal predicho, LytM<sub>26-316</sub>) no se desplegó de forma efectiva por ninguna de las preparaciones de peptidoglucano. Pudieron detectarse trazas de proteína en la fracción desplegada en algunos casos pero este efecto no fue específico porque no se observó tendencia 50 sistemática con pureza creciente de peptidoglucano (Fig. 2C).

#### Ejemplo 5

##### **Ensayo de despliegue de peptidoglucanos purificados de *S. aureus* con diversos fragmentos de LytM**

**[0060]** Para evaluar la unión de diversos fragmentos de LytM, se mezclaron 2 µg de proteína producida en el Ejemplo 1 con peptidoglucanos purificados producidos en el Ejemplo 3 y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Después, se separaron fracciones soluble e insoluble por centrifugación y los peptidoglucanos se lavaron con 1 ml de tampón A (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 50 mM). Se mezclaron las fracciones soluble (S) y de 60 peptidoglucanos lavados (PG) con tampón de carga y se separaron por SDS-PAGE en presencia de control (C) que era un fragmento LytM ensayado.

**[0061]** Las muestras se separaron por SDS-PAGE y se tificaron con Coomassie de acuerdo con el protocolo convencional. Los resultados se presentan en la Fig. 3A. Los resultados indican que la LytM de longitud completa 65 (LytM<sub>26-316</sub>) así como el dominio N-terminal aislado de la enzima LytM<sub>24-105</sub> no se unen a los peptidoglucanos

purificados. La única unión efectiva pudo observarse para la forma activa de LytM (LytM<sub>185-316</sub>). La afinidad a peptidoglucanos también se ensayó para los mutantes LytM<sub>26-316</sub> N117A y LytM<sub>185-316</sub> H210A, D214A, H291A pero resultó que estos mutantes se unían a peptidoglucanos muy débilmente o perdían completamente la capacidad de unirse. Los resultados muestran que para la unión efectiva de peptidoglucanos, es necesaria la forma activa de LytM con integridad sostenida del centro activo.

#### Ejemplo 6

##### **Ensayo de despliegue de la forma activa de LytM en presencia de inhibidores de proteasa**

10 [0062] El ensayo se realizó como en el Ejemplo 4 pero para comprobar el efecto de inhibidores de proteasa sobre la unión a peptidoglucano la proteína LytM<sub>185-316</sub> se incubó con peptidoglucanos purificados en presencia de diversos inhibidores en las concentraciones finales: (1) EDTA 10 mM, (2) 1,10-fenantrolina 1 mM, (3) N-acetilglucosamina 10 mM, (4) hidroxamato de glicina 10 mM, (5) PMSF 1 mM y (6) E-64 1 mM un inhibidor de cisteína proteasa (*trans*-  
15 Epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino)butano), (C) control sin inhibidores. Los resultados se presentan en la Fig. 3B. Los resultados obtenidos indican que los quelantes de iones de metal, EDTA y 1,10-fenantrolina, logran la unión de la forma activa de LytM<sub>185-316</sub> a peptidoglucanos (Fig. 3B, carriles 1-2) mientras que los quelantes débiles de iones Zn<sup>2+</sup>, como hidroxamato de glicina e inhibidores de proteasa no tuvieron efecto sobre la unión a peptidoglucanos (Fig. 3B, carriles 3-6).

#### Ejemplo 7

##### **Estabilidad de la forma activa de LytM en presencia de proteasas bacterianas**

25 [0063] Se incubaron 3 µg de LytM<sub>185-316</sub> obtenida en el Ejemplo 1 con ~10<sup>6</sup> células de *S. aureus* durante 1 y 4 horas a 37°C. LytM<sub>185-316</sub> no incubada a 37°C se usó como control. Después de incubación las muestras se separaron por SDS-PAGE seguido de hibridación de transferencia de Western con anticuerpos obtenidos en la muestra 2 de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 4. Los resultados obtenidos se representan en la Fig. 4. Las bandas detectadas corresponden a LytM<sub>185-316</sub>. La banda inferior está presente en todas las muestras y su  
30 intensidad no difiere entre ellas. Como dicha banda se detecta en el control, su presencia no resulta de la degradación de LytM<sub>185-316</sub> debido a la presencia de las células de *S. aureus*. Por lo tanto, los autores han demostrado la alta estabilidad de la forma activa LytM<sub>185-316</sub> en presencia de células de *S. aureus*.

#### Ejemplo 8

35 [0064] El ensayo de lisis de pared celular medido por los cambios de densidad óptica de la suspensión celular (ensayo de eliminación de turbidez)

##### **a) Efecto del pH sobre la eficacia de la forma activa de LytM y lisostafina**

40 [0065] Las células de *S. aureus* cultivadas en medio CASO en 37°C con agitación se recogieron en la fase exponencial, se lavaron y suspendieron en el tampón de ensayo de Tris 50 mM pH 7,0 o Tris 50 mM pH 8,0 o Tris 50 mM pH 9,0 a DO<sub>595</sub> de aproximadamente 1,8 suplementado con 200 µg/ml de eritromicina. La LytM<sub>185-316</sub> obtenida en el Ejemplo 1 y lisostafina (Sigma) se añadieron a la concentración final de 18 nM y 200 µl de la mezcla de  
45 reacción se transfirieron a placa de microtitulación. Las placas se incubaron a 37°C con agitación de 2 segundos cada 5 minutos. La DO de la suspensión se midió a 595 nm después de 0, 20, 40, 60, 90 y 120 min de incubación. Como se observó alguna disminución de la DO en el control sin enzima, todos los valores en la Fig. 5 se presentan como el porcentaje del control sin enzima. Se ha demostrado que el aumento del pH en el intervalo de aproximadamente 7 a aproximadamente 9 (Tris-HCl 50 mM) tuvo poco efecto sobre la actividad de lisostafina pero  
50 potenció la actividad de LytM<sub>185-316</sub>.

##### **b) El efecto de las condiciones de tampón sobre la eficacia de la forma activa de LytM y lisostafina**

[0066] El experimento se realizó como en a) con la excepción de que la reacción de lisis se realizó (A) para  
55 comprobar el efecto de glicina sobre la reacción en los tampones de glicina-NaOH 100 mM pH 8,0, Tris-HCl 50 mM pH 8,0 y glicina 100 mM en Tris HCl 50 mM pH 8,0, (B) para comprobar el efecto de mono-, di- y triglicina sobre la lisis celular en tampones 50 mM a pH ajustado a 8,0 con NaOH y en agua destilada, (C) para comprobar el efecto de diversos aminoácidos: 50 mM de L-arginina-HCl, D,L-alanina-NaOH, L-arginina-HCl, ácido L-glutámico-NaOH, ácido diaminopimélico-NaOH, todos a pH 8,0. Los resultados obtenidos se presentan en la Fig. 8. Todos los tampones  
60 ensayados eran de diferente composición pero el mismo pH de 8,0.

[0067] El tampón glicina resultó ser el más preferible. Por lo tanto, se ha comprobado si la glicina en solitario podría activar LytM como aditivo a otros tampones. Los resultados no indican dicho efecto de glicina. Teniendo en mente que la forma activa de LytM corta el enlace peptídico entre dos glicinas, se ha comprobado también si di- y  
65 triglicina tienen el mismo efecto que la monoglicina. Los resultados lo refutaron. Se ha demostrado que la actividad

de la forma activa de LytM es la más elevada en el tampón que contenía monoglicina y que no está relacionada con el sustrato LytM. La alta actividad de LytM<sub>185-316</sub> también se observó en el agua doblemente destilada. También se ensayó el efecto de otros varios aminoácidos sobre la actividad de LytM<sub>185-316</sub>. La actividad varió en las soluciones ensayadas de aminoácidos pero en ninguna de ellas fue tan alta como en tampón glicina. Para revelar la relación  
5 entre el tampón y la actividad enzimática, se ensayaron en el Ejemplo 9 las características fisicoquímicas de los tampones de reacción y las actividades de la enzima descrita.

#### Ejemplo 9

### 10 Efecto de las condiciones de reacción y la actividad lítica de LytM y lisostafina

#### a) El efecto de diversos tampones

**[0068]** Las células de *S. aureus* cultivadas en medio CASO a 37°C con agitación se recogieron por centrifugación  
15 en la fase exponencial, se lavaron y suspendieron en el tampón 50 mM a pH establecido a 8,0 o en agua doblemente destilada suplementada con 200 µg/ml de eritromicina. Las células se diluyeron en el tampón ensayado hasta DO<sub>595</sub> de 1,8. La LytM<sub>185-316</sub> obtenida en el Ejemplo 1 y la lisostafina (Sigma) se añadieron a la concentración final de 18 nM y 200 µl de la mezcla de reacción se transfirieron a la placa de microtitulación. Las placas se incubaron a 37°C con agitación de 2 segundos cada 5 minutos. En el inicio del ensayo, se midió la conductividad de  
20 las células suspendidas en el tampón adecuado o agua usando medidos de conductividad MeteLab CDM230 (Radiometer Analytical, Francia). Las mediciones de conductividad se hicieron a temperatura ambiente después de adición de las células de *S. aureus*.

**[0069]** La DO de la suspensión se midió a la longitud de onda de 595 nm después de 60 min. de reacción. La  
25 actividad lítica se presenta como un porcentaje de la DO<sub>595</sub> de control (muestras igual que para la reacción pero sin enzima añadida). Se hicieron las mismas reacciones sobre células vivas sin eritromicina añadida. Cada experimento se realizó dos veces con cuatro paralelos. Los resultados se presentan en la Fig. 6. Se obtuvieron los mismos resultados para muestras suplementadas con eritromicina y sin ella. Inesperadamente resultó que la forma activa de LytM (LytM<sub>185-316</sub>) es muy efectiva en tampones de baja conductividad mientras que la degradación de las paredes  
30 celulares de *S. aureus* por lisostafina en las condiciones de baja conductividad es insignificante.

**[0070]** La actividad de la forma activa de LytM fue particularmente elevada en las condiciones de reacción de conductividad por debajo de 2 mS/cm e incluso en condiciones de conductividad inferior a 1 mS/cm. LytM<sub>185-31</sub> actúa de forma efectiva también en agua doblemente destilada mientras que la actividad de lisostafina fue casi  
35 indetectable en dichas condiciones.

#### b) El efecto de la fuerza iónica del tampón

**[0071]** El experimento se realizó como en la parte a) con la excepción de que la reacción de lisis se realizó en  
40 tampón glicina 20 mM pH 8,0 suplementado con NaCl 0 a 500 mM. Los resultados de las mediciones de conductividad se presentan en la Fig. 7. Los autores han demostrado que en contraste con lisostafina, la forma activa de LytM (LytM<sub>185-316</sub>) es efectiva en tampones de baja conductividad, en particular en las condiciones de reacción de conductividad inferior a 10 mS/cm, preferentemente inferior a 5 mS/cm, más preferentemente inferior a 2  
45 mS/cm.

#### Ejemplo 10

### Efecto de la temperatura sobre la eficacia de la forma activa de LytM (LytM<sub>185-316</sub>) y lisostafina (Lss)

**[0072]** Las células de *S. aureus* cultivadas en medio CASO a 37°C con agitación se recogieron por centrifugación  
50 en la fase exponencial y se suspendieron en el tampón glicina 50 mM pH 7,5 para LytM y en el mismo tampón suplementado con NaCl 150 mM para lisostafina a la densidad óptica final de 1,8 a DO<sub>595</sub>. LytM<sub>185-316</sub> obtenida en el Ejemplo 1 y lisostafina (Sigma) se añadieron a la concentración final de 18 nM (cantidades molares iguales) y se incubaron 200 µl de la mezcla de reacción en las temperaturas ensayadas durante 60 min. Después de eso se  
55 midieron los cambios en la densidad óptica a DO<sub>595</sub>. Los resultados mostrados en la Fig. 9 y Fig. 10 se presentan como un porcentaje de la DO inicial de la suspensión celular de *S. aureus*. La forma activa de LytM (LytM<sub>185-316</sub>) lisaba bacterias sobre un amplio intervalo de temperaturas de 0°C a 45°C. A 4°C LytM<sub>185-316</sub> es más de cuatro veces más activa que lisostafina.

### 60 La lista de secuencias:

#### **[0073]**

- La SEC ID N° 1 corresponde a la secuencia de aminoácidos de LytM de longitud completa de *S. aureus*
- 65 - La SEC ID N° 2 corresponde a la secuencia de aminoácidos de LytM<sub>185-316</sub> de *S. aureus*

Lista de secuencias

**[0074]**

- 5 <110> Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej
- <120> Un método de hidrólisis de péptidos, peptidasa, la composición para su uso como agente bacteriostático y bactericida, un kit y los usos de la forma activa de LytM de *S. aureus* o derivados de la misma.
- 10 <130> PZ/1182/AGR/PCT
- <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.3
- 15 <210> 1
- <211> 316
- <212> PRT
- <213> *Staphylococcus aureus*
- 20 <400> 1

Met Lys Lys Leu Thr Ala Ala Ala Ile Ala Thr Met Gly Phe Ala Thr  
1 5 10 15  
Phe Thr Met Ala His Gln Ala Asp Ser Ala Glu Thr Thr Asn Thr Gln  
20 25 30  
Gln Ala His Thr Gln Met Ser Thr Gln Ser Gln Asp Val Ser Tyr Gly  
35 40 45  
Thr Tyr Tyr Thr Ile Asp Ser Asn Gly Asp Tyr His His Thr Pro Asp  
50 55 60  
Gly Asn Trp Asn Gln Ala Met Phe Asp Asn Lys Glu Tyr Ser Tyr Thr  
65 70 75 80  
Phe Val Asp Ala Gln Gly His Thr His Tyr Phe Tyr Asn Cys Tyr Pro  
85 90 95  
Lys Asn Ala Asn Ala Asn Gly Ser Gly Gln Thr Tyr Val Asn Pro Ala  
100 105 110  
Thr Ala Gly Asp Asn Asn Asp Tyr Thr Ala Ser Gln Ser Gln Gln His  
115 120 125  
Ile Asn Gln Tyr Gly Tyr Gln Ser Asn Val Gly Pro Asp Ala Ser Tyr  
130 135 140  
Tyr Ser His Ser Asn Asn Asn Gln Ala Tyr Asn Ser His Asp Gly Asn  
145 150 155 160  
Gly Lys Val Asn Tyr Pro Asn Gly Thr Ser Asn Gln Asn Gly Gly Ser  
165 170 175  
Ala Ser Lys Ala Thr Arg Ser Gly His Ala Lys Asp Ala Ser Trp Leu  
180 185 190  
Thr Ser Arg Lys Gln Leu Gln Pro Tyr Gly Gln Tyr His Gly Gly Gly  
195 200 205  
Ala His Tyr Gly Val Asp Tyr Ala Met Pro Glu Asn Ser Pro Val Tyr  
210 215 220  
Ser Leu Thr Asp Gly Thr Val Val Gln Ala Gly Trp Ser Asn Tyr Gly  
225 230 235 240  
Gly Gly Asn Gln Val Thr Ile Lys Glu Ala Asn Ser Asn Asn Tyr Gln  
245 250 255  
Trp Tyr Met His Asn Asn Arg Leu Thr Val Ser Ala Gly Asp Lys Val  
260 265 270  
Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ala Tyr Ser Gly Ser Thr Gly Asn Ser Thr  
275 280 285  
Ala Pro His Val His Phe Gln Arg Met Ser Gly Gly Ile Gly Asn Gln  
290 295 300  
Tyr Ala Val Asp Pro Thr Ser Tyr Leu Gln Ser Arg  
305 310 315

<210> 2  
<211> 132

ES 2 537 701 T3

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 2

5

```

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

```



## REIVINDICACIONES

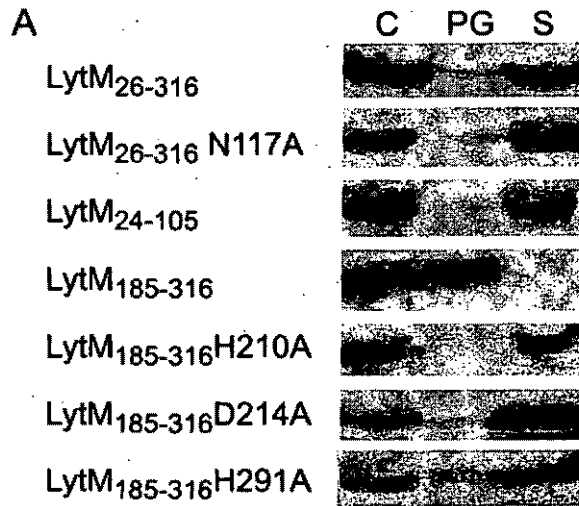
1. Un método de hidrólisis de péptidos que comprende la etapa en que la forma activa de LytM se pone en contacto con sustrato peptídico, en entorno acuoso de conductividad inferior a 2 mS/cm, y en donde la forma activa de LytM es al menos un 95% homóloga al fragmento LytM<sub>180-316</sub> que corresponde a los residuos 180-316 de secuencia SEC ID N°1 o a LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2, preferentemente la forma activa de LytM se selecciona entre el fragmento LytM<sub>180-316</sub> que corresponde a los residuos 180-316 de secuencia SEC ID N° 1 o LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2; y en donde la forma activa de LytM tiene actividad glicilglicina endopeptidasa del dominio catalítico LytM<sub>185-316</sub> que corresponde a los residuos 185-316 de secuencia SEC ID N° 1 frente al sustrato, que está compuesto por al menos cuatro glicinas en una fila, y en el cual el contacto se realiza preferentemente a un intervalo de temperatura de aproximadamente 0°C a aproximadamente 37°C, preferentemente a una temperatura por debajo de 10°C.
2. Un método de hidrólisis de péptidos *in vitro* de las paredes celulares de bacterias Gram-positivas, en el que la forma activa de LytM se pone en contacto con las paredes celulares de bacterias Gram-positivas, en entorno acuoso de conductividad inferior a 2 mS/cm, y en el que la forma activa de LytM es al menos un 95% homóloga al fragmento LytM<sub>180-316</sub> que corresponde a los residuos 180-316 de secuencia SEC ID N°1 o a LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2, en donde la forma activa de LytM se selecciona preferentemente entre el fragmento LytM<sub>180-316</sub> que corresponde a los restos 180-316 de secuencia SEC ID N° 1 o LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2; y en donde la forma activa de LytM tiene actividad glicilglicina endopeptidasa del dominio catalítico LytM<sub>185-316</sub> que corresponde a los residuos 185-316 de secuencia SEC ID N° 1 frente al sustrato, que está compuesto por al menos cuatro glicinas en una fila; en donde preferentemente las bacterias Gram-positivas son bacterias que pertenecen al género *Staphylococcus* o *Micrococcus*, más preferentemente especies seleccionadas entre el grupo que comprende: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. roseus*, *S. carnosus*, *S. lactis*, *S. saprophyticus* y *M. caseolyticus*, *M. candidans*, *M. naucinus*, *M. vernae*; y en donde preferentemente el contacto se realiza a un intervalo de temperatura de aproximadamente 0°C a aproximadamente 37°C, preferentemente a una temperatura por debajo de 10°C.
3. Un uso de una composición que comprende la forma activa de LytM, como agente bacteriostático o bactericida para desinfectar la superficie, contra bacterias Gram positivas, en particular contra el género *Staphylococcus* o *Micrococcus*, y en donde la composición se usa en entorno acuoso de conductividad inferior a 2 mS/cm, y en donde la forma activa de LytM es al menos un 95% homóloga al fragmento LytM<sub>180-316</sub> que corresponde a los residuos 180-316 de secuencia SEC ID N° 1 o a LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2, en donde preferentemente la forma activa de LytM se selecciona entre el fragmento LytM<sub>180-316</sub> que corresponde a los residuos 180-316 de secuencia SEC ID N° 1 o LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2; y en donde la forma activa de LytM tiene actividad glicilglicina endopeptidasa del dominio catalítico LytM<sub>185-316</sub> que corresponde a los residuos 185-316 de secuencia SEC ID N° 1 frente al sustrato, que está compuesto por al menos cuatro glicinas en una fila; y en el cual preferentemente la composición se usa a una temperatura por debajo de 10°C.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la forma activa de LytM se usa como agente bacteriostático o bactericida en industria alimentaria, preferentemente el agente se usa como un aditivo para alimento a seres humanos y animales o para descontaminar superficies.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la forma activa de LytM se usa como agente bacteriostático o bactericida en medicina, veterinaria, diagnóstico y/o en cosmética, preferentemente el agente se usa para desinfectar la superficie de herramientas y equipos usados en medicina, veterinaria, diagnóstico y/o en industria cosmética o para desinfectar las superficies en hospitales y laboratorios.
6. Un uso de la forma activa de LytM, para aislar componentes celulares de bacterias Gram-positivas que comprenden ADN, ARN, proteínas, péptidos, glucopéptidos, lípidos, elementos celulares y metabolitos útiles, en la condiciones de reacción de conductividad inferior a 2 mS/cm, y en donde la forma activa de LytM es al menos un 95% homóloga al fragmento LytM<sub>180-316</sub> que corresponde a los residuos 180-316 de secuencia SEC ID N°1 o a LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2, preferentemente la forma activa de LytM se selecciona entre el fragmento LytM<sub>180-316</sub> que corresponde a los residuos 180-316 de secuencia SEC ID N° 1 o LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2; y en donde la forma activa de LytM tiene actividad glicilglicina endopeptidasa del dominio catalítico LytM<sub>185-316</sub> que corresponde a los residuos 185-316 de secuencia SEC ID N° 1 frente al sustrato, que está compuesto por al menos cuatro glicinas en una fila; y en donde preferentemente el aislamiento de los componentes celulares se realiza a una temperatura por debajo de 10°C.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que las bacterias Gram-positivas son bacterias que pertenecen al

género *Staphylococcus* o *Micrococcus*, preferentemente especies seleccionadas entre el grupo que comprende *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. roseus*, *S. carnosus*, *S. lactis*, *S. saprophyticus* y *M. caseolyticus*, *M. candidans*, *M. naucinus*, *M. verna*.

- 5 8. Un uso de la forma activa de LytM en diagnóstico de bacterias Gram-positivas, preferentemente bacterias que pertenecen al género *Staphylococcus* o *Micrococcus*, en el cual el diagnóstico se realiza en condiciones de reacción de conductividad inferior a 2 mS/cm,  
 y en donde la forma activa de LytM es al menos un 95% homóloga al fragmento LytM<sub>180-316</sub> que corresponde a los residuos 180-316 de secuencia SEC ID N° 1 o a LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2, preferentemente la forma  
 10 activa de LytM se selecciona entre el fragmento LytM<sub>180-316</sub> que corresponde a los residuos 180-316 de secuencia SEC ID N° 1 o LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2;  
 y en donde la forma activa de LytM tiene actividad glicilglicina endopeptidasa del dominio catalítico LytM<sub>185-316</sub> que corresponde a los restos 185-316 de secuencia SEC ID N° 1 frente al sustrato, que está compuesto por al menos cuatro glicinas en una fila;  
 15 y en donde preferentemente la forma activa de LytM se usa en la temperatura por debajo de 10°C.
9. Un uso de la forma activa de LytM para impregnar o para recubrir una superficie expuesta a bacterias Gram-positivas, en donde la forma activa de LytM es al menos un 95% homóloga al fragmento LytM<sub>180-316</sub> que corresponde a los residuos 180-316 de secuencia SEC ID N° 1 o a LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2,  
 20 preferentemente la forma activa de LytM se selecciona entre el fragmento LytM<sub>180-316</sub> que corresponde a los residuos 180-316 de secuencia SEC ID N° 1 o LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2; y en donde la forma activa de LytM tiene actividad glicilglicina endopeptidasa del dominio catalítico LytM<sub>185-316</sub> que corresponde a los residuos 185-316 de secuencia SEC ID N° 1 frente al sustrato, que está compuesto por al menos cuatro glicinas en una fila, y en donde las condiciones en que dicha forma activa de LytM se usa como impregnación o como recubrimiento de superficie  
 25 tiene la conductividad inferior a 2 mS/cm;  
 y en el donde preferentemente la forma activa de LytM se usa a una temperatura por debajo de 10°C.
10. Un uso de la forma activa de LytM para la escisión de una marca de un sustrato proteico, preferentemente de una proteína de fusión, en donde la escisión tiene lugar en una posición de la secuencia del sustrato proteico donde  
 30 están presentes al menos cuatro o más glicinas en una fila y la escisión se realiza con una conductividad inferior a 2 mS/cm en un intervalo de temperatura de aproximadamente 0°C a aproximadamente 37°C, preferentemente a una temperatura por debajo de 10°C,  
 y en donde la forma activa de LytM es al menos un 95% homóloga al fragmento LytM<sub>180-316</sub> que corresponde a los residuos 180-316 de secuencia SEC ID N° 1 o a LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2, preferentemente la forma  
 35 activa de LytM se selecciona entre el fragmento LytM<sub>180-316</sub> que corresponde a los residuos 180-316 de secuencia SEC ID N° 1 o LytM<sub>185-316</sub> de secuencia SEC ID N° 2; y en donde la forma activa de LytM tiene actividad glicilglicina endopeptidasa del dominio catalítico LytM<sub>185-316</sub> que corresponde a los residuos 185-316 de secuencia SEC ID N° 1 frente al sustrato, que está compuesto por al menos cuatro glicinas en una fila.



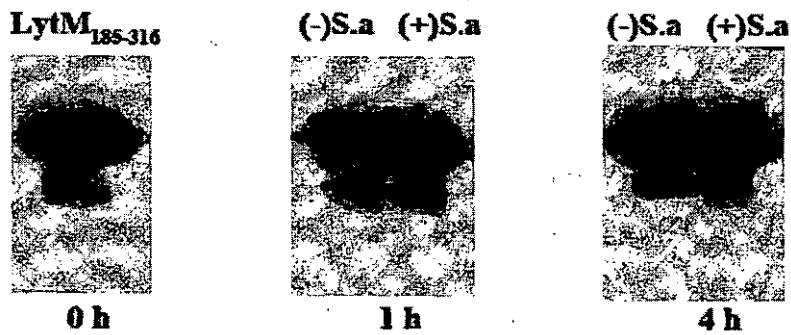
**Fig. 3**



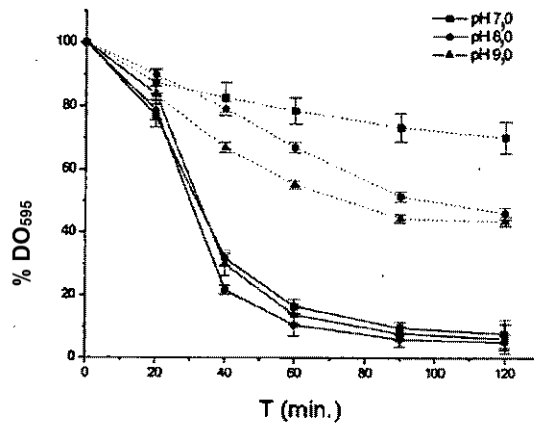
**B**



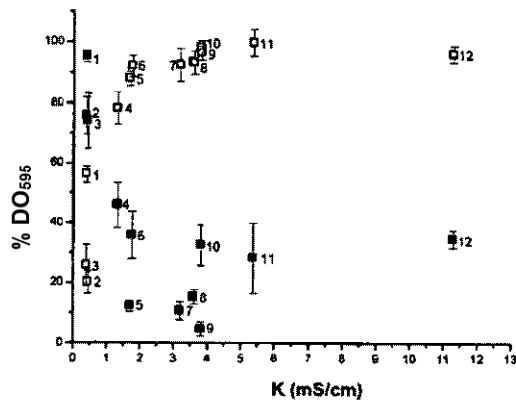
**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig. 7**

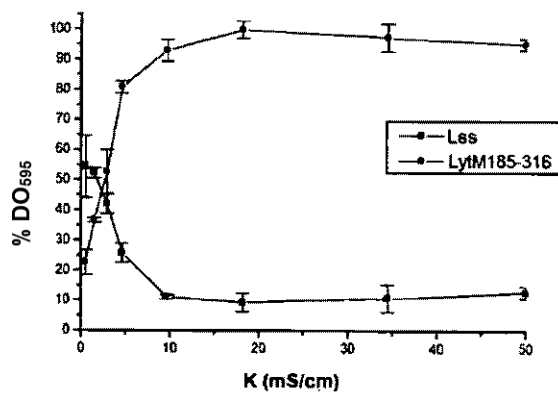
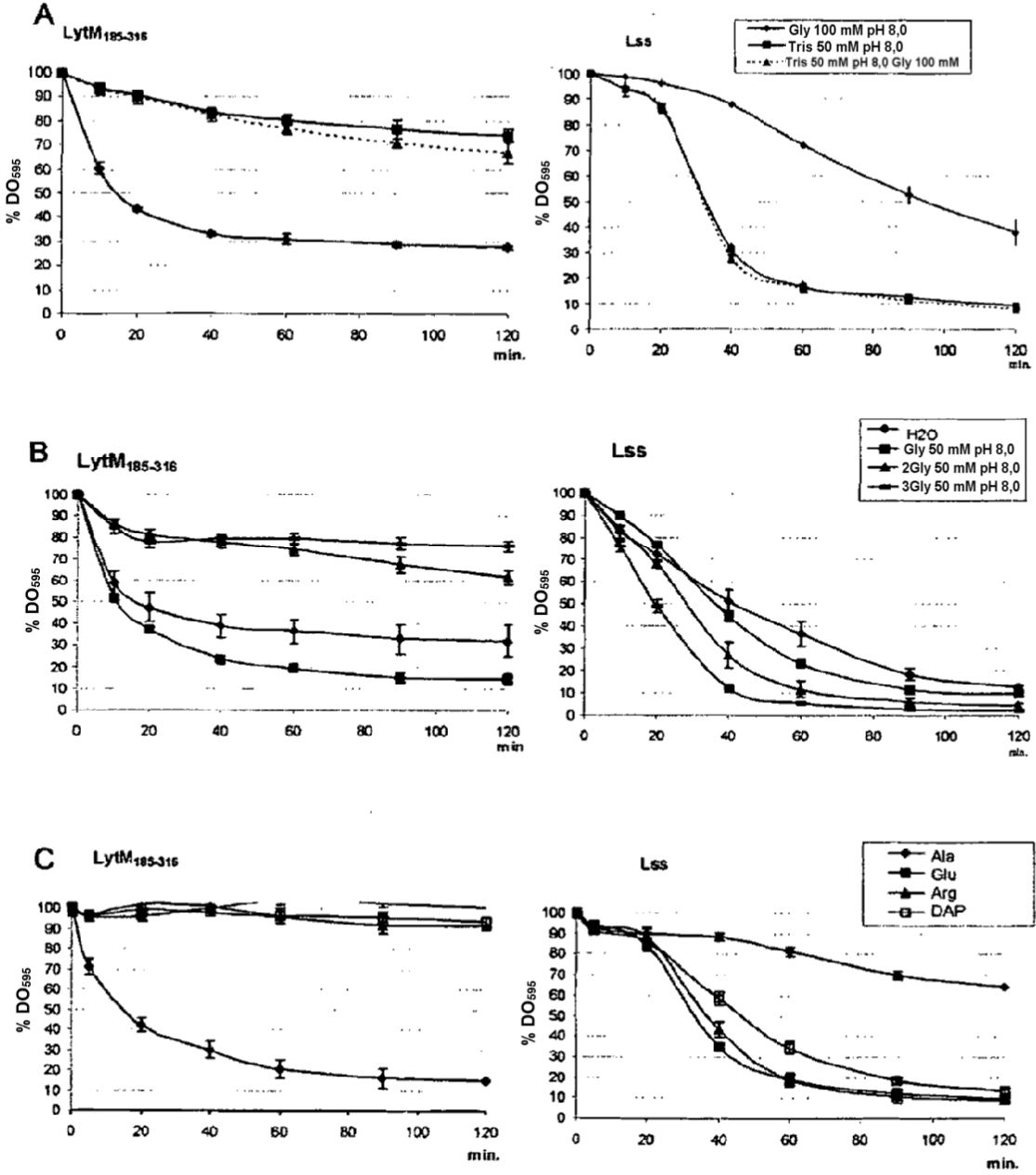
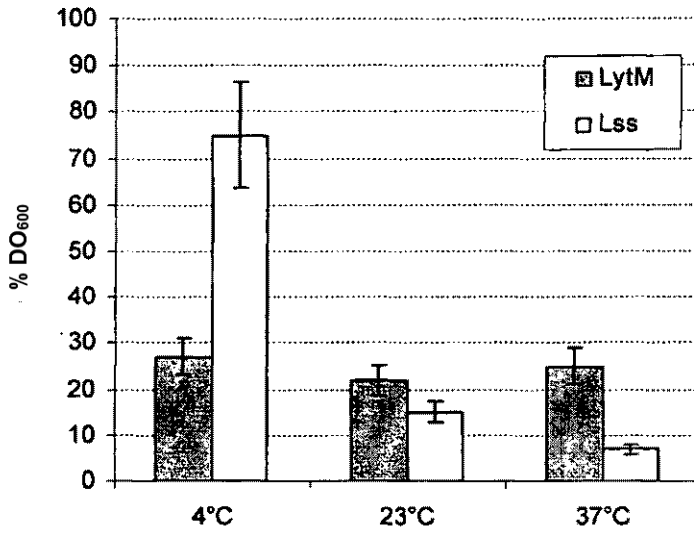


Fig.8



**Fig. 9**



**Fig. 10**

