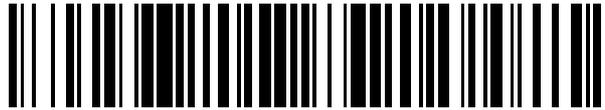


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 392**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2007** **E 11154069 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015** **EP 2371842**

54 Título: **Bacteriocinas modificadas y métodos para su uso**

30 Prioridad:

**15.05.2006 US 747299 P**

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

**16.10.2015**

73 Titular/es:

**AVIDBIOTICS CORPORATION (100.0%)**  
**100 Kimball Way**  
**South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**MARTIN, DAVID W. JR.;**  
**JAMIESON, ANDREW C.;**  
**SCHOLL, DEAN M. y**  
**WILLIAMS, STEVEN R.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 548 392 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

Bacteriocinas modificadas y métodos para su uso

**Campo de la divulgación**

5 Esta divulgación se refiere a formas modificadas de bacteriocinas de origen natural de elevado peso molecular (epm), tales como las piocinas de tipo R de *Pseudomonas aeruginosa*. Las bacteriocinas se modifican en los extremos de sus fibras caudales en una región responsable de la especificidad y afinidad de unión a sus ligandos o receptores afines, tales como aquellos de las superficies de las bacterias. También se describen métodos para el uso de las bacteriocinas modificadas, tal y como para que se unan a receptores, incluyendo factores de virulencia o aptitud, sobre las superficies de bacterias.

**10 Antecedentes de la divulgación**

Actualmente la atención global se centra más en amenazas de patógenos virales que en enfermedades bacterianas. Sin embargo, las bacterias resistentes a antibióticos omnipresentes continúan causando estragos en el cuidado de pacientes y en el sostenimiento del gasto en hospitales y otras instalaciones de cuidados médicos. Al mismo tiempo, hay una disminución en el desarrollo de antibióticos en favor de fármacos para enfermedades crónicas y mejoras en el estilo de vida. En los últimos veinte años solo se han introducido en el mercado de los Estados Unidos dos nuevas clases de antibióticos (oxazolidinonas y lipopéptidos) (Wenzel, 2004).

15 Solo en los Estados Unidos, hay más de 2 millones de casos de infecciones bacterianas hospitalarias cada año. De estas, mueren aproximadamente 90.000 personas. La estadística más alarmante es que más del 70% de estos agentes bacterianos son resistentes a al menos un fármaco antibacteriano (Bad Bugs, No Drugs, 2004). Esta cifra continúa aumentando a una velocidad alarmante. El coste anual para la economía de los Estados Unidos de estas infecciones nosocomiales resistentes a antibióticos supera los 5 mil millones de dólares. La realidad de esta situación global amenazante forzará a una nueva estrategia para el desarrollo y uso de agentes antibacterianos (Talbot et al., 2006). En los casos donde se ha producido un uso extensivo (y un abuso) de los antibióticos en medicina humana y animal, también se ha producido la aparición de patógenos bacterianos resistentes a los antibióticos hasta el punto de que muchos antibióticos que antes fueron "fármacos milagrosos" actualmente son clínicamente ineficaces (Microbial Threats to Health, 2003).

20 A modo de ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno ubicuo para plantas y animales que está mostrando una rápidamente creciente incidencia de resistencia a múltiples fármacos antibióticos (Microbial Threats to Health, 2003; Bad Bugs, No Drugs, 2004). *P. aeruginosa* es un bacilo bastón aerobio, móvil, gram-negativo. *P. aeruginosa* normalmente habita el suelo, el agua y la vegetación. Aunque rara vez causa enfermedad en personas sanas, es un patógeno oportunista que provoca aproximadamente el 10% de todas las infecciones nosocomiales (National Nosocomial Infection Survey report- Resumen de datos entre octubre de 1986-abril de 1996). *P. aeruginosa* es el patógeno más común que afecta a pacientes con fibrosis quística (FQ) con un 61% de cultivo de especímenes positivos (Govan, J. R. W. y V. Deretic, 1996, Microbiol. Reviews, 60(3):530-574) así como uno de los dos patógenos más comunes observados en las unidades de cuidados intensivos (Jarvis, W. R. et al., 1992, J. Antimicrob. Chemother., 29(a supp.):19-24).

30 La mortalidad a causa de algunas infecciones por *P. aeruginosa* puede llegar a alcanzar el 50%. Actualmente, la infección por *P. aeruginosa* puede aún controlarse de manera eficaz con antibióticos, particularmente usando una combinación de fármacos. Sin embargo, ha mostrado resistencia a varios de los antibióticos comunes y es particularmente problemática en las unidades de cuidados intensivos (Archibald, L. et al., 1997, Clin. Infectious Dis., 24(2):211-215; Fish, D. N., et al., 1995, Pharmacotherapy, 15(3):279-291). Además, *P. aeruginosa* ya ha demostrado mecanismos para adquirir plásmidos que contienen genes de resistencia múltiple a antibióticos (Jakoby, G. A. (1986), The bacteria, Vol. X, The biology of Pseudomonas, pp. 265-294, J. R. Sokach (ed.) Academic Press, London) y actualmente no hay vacunas aprobadas para la infección por *Pseudomonas*.

45 Al igual que otras muchas especies bacterianas, la variabilidad de cepas de *P. aeruginosa* es bastante significativa. Se ha demostrado que la variabilidad sucede mediante una serie de mecanismos diferentes, estos incluyen, pero sin limitación, la integración de profagos en un genoma bacteriano (Zierdt, C. H. y P. J. Schmidt, 1964, J. Bacteriol. 87:1003-1010), la adición del gen de citotoxina de bacteriófagos (Hayashi, T., et al., 1994, FEMS Microbiol. Lett. 122:239-244) y a través de transposones (Sinclair, M. I. and B. W. Holloway, 1982, J. Bacteriol. 151:569-579). Mediante este tipo de diversidad, se han incorporado nuevos mecanismos patogénicos en *P. aeruginosa*. Estas y otras transiciones, tales como la conversión al fenotipo mucoide, observado comúnmente en FQ, ilustran claramente la necesidad de una vigilancia continua.

Estas preocupaciones apuntan a la necesidad de herramientas diagnósticas y agentes terapéuticos dirigidos a una identificación adecuada de cepas resistentes a fármacos y a la erradicación de la virulencia.

55 Muchas bacterias producen bacteriocinas, que son sustancias bactericidas, durante el crecimiento. Las bacteriocinas están compuestas de polipéptidos y varían en cuanto a su peso molecular. Aunque se han usado bacteriocinas debido a sus propiedades antibacterianas, algunas tienen un espectro bactericida más limitado que muchos

antibióticos usados clínicamente. Por ejemplo, se ha descrito que las bacteriocinas reconocen y por lo tanto actúan solamente en miembros de una especie igual o estrechamente relacionada uniéndose a receptores en organismos sensibles, o susceptibles.

5 A modo de clasificación amplia, las bacteriocinas se han dividido en tres tipos. Las primeras son moléculas pequeñas que son estables térmicamente. Los ejemplos de este primer tipo incluyen colicina V (siendo las colicinas específicas para bacterias coliformes). El segundo tipo, las piocinas de tipo S producidas por *P. aeruginosa*, son moléculas proteicas de mayor peso molecular. El tercer tipo incluye bacteriocinas que se asemejan genéticamente y morfológicamente a las porciones de cola de los bacteriófagos. Los ejemplos de este último tipo incluyen las piocinas de tipo F y de tipo R de *P. aeruginosa* así como enterocolicina de *Yersinia*. Se ha descrito que estas piocinas se derivan de un bacteriófago ancestral y tienen similitudes con la familia del fago lambda y con la familia del fago P2, respectivamente.

10 Las piocinas de tipo R son similares a las porciones de cola no flexibles y contráctiles de bacteriófagos de la familia *myoviridae* y están codificadas en un solo conjunto de genes en el genoma de *Pseudomonas* (Shinomiya et al., 1983). Véase la Figura 1. Después de unirse específicamente a una bacteria diana, estas piocinas forman un poro en la célula bacteriana, comprometiendo la integridad de su membrana citoplasmática y provocando la despolarización de la membrana. Las piocinas de tipo F también son similares a una cola de bacteriófago pero tienen una estructura de tipo varilla flexible y no contráctil. Las piocinas se producen en la mayoría de cepas de *P. aeruginosa* y algunas cepas sintetizan más de una piocina.

15 Las piocinas de tipo R son bacteriocinas complejas de elevado peso molecular producidas por algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y tienen actividad bactericida contra otras cepas determinadas de *P. aeruginosa* (para una revisión véase Michel-Briand y Baysse, 2002). Hasta la fecha se han identificado cinco piocinas de tipo R y basándose en su espectro diana (véase más adelante), se denominan de R1 a R5. La cepa PAO1 produce piocina R2, que está codificada por un conjunto de genes que consiste en 16 fases abiertas de lectura (ORF), 12 de las cuales muestran una similitud de secuencia significativa con las ORF de los bacteriófagos P2, PS17,  $\Phi$ CTX y otros fagos similares a P2 (Nakayama et al., 2000). La producción de piocina se induce por daño en el ADN (Matsui et al., 1993) y está regulada por RecA, que degrada PrtR, el represor de PrtN, un regulador positivo de la transcripción del conjunto. La inducción de los genes de piocinas da como resultado la síntesis de aproximadamente 200 partículas de piocina por célula bacteriana seguida de la lisis de la célula mediante mecanismos similares a aquellos de la lisis por bacteriófagos. Las piocinas eliminan rápida y específicamente células diana uniéndose en primer lugar al lipopolisacárido (LPS) a través de sus fibras caudales, seguido de la contracción de la vaina y la penetración al núcleo a través de la membrana externa bacteriana, la pared celular y la membrana citoplásmica. Esta penetración compromete la integridad de la membrana citoplásmica y el potencial de despolarización de la membrana (Uratani y Hoshino, 1984). En muchos aspectos, las piocinas pueden verse como profagos defectuosos adaptados por el hospedador para producir partículas antibacterianas no infecciosas, resistentes a proteasas y ácidos que consisten únicamente en el aparato de cola adaptado, es decir, sin cápsidas o ADN. La replicación de los genes de piocina requiere de la replicación del genoma bacteriano en el que están incluidos.

20 Las cinco especificidades de receptor de la piocina están relacionadas linealmente entre sí con dos ramas. (Ito et al, 1970; Meadow y Wells, 1978; Kageyama, 1975). La piocina R5 tiene el espectro más amplio e incluye las especificidades de las otras cuatro. Los receptores para los otros cuatro tipos R forman dos ramas o familias de especificidades, que divergen de R5. Una rama incluye los receptores para R3, R4 y R2, en ese orden, donde la especificidad de receptor para la piocina R3 es la más distal de la superficie celular. La segunda rama contiene al receptor de R1, que parece tener una especificidad no relacionada determinante con aquellas para R2, R3 y R4. Las dos ramas parecen estar unidas al receptor para R5 ya que todas las cepas de *P. aeruginosa* que son sensibles a cualquier piocina R1-R4 son también sensibles a R5, mientras que algunas cepas son sensibles únicamente a piocina R5. Algunas cepas de *P. aeruginosa* son resistentes a las 5 piocinas de tipo R de origen natural.

25 Las piocinas de *P. aeruginosa* eliminan de manera específica cepas, principalmente de *P. aeruginosa*, pero también se ha demostrado que eliminan algunas cepas de especies de *Hemophilus*, *Neisseria* y *Campylobacter* (Filiatrault et al., 2001; Morse et al, 1976; Morse et al, 1980; Blackwell et al., 1981, 1982).

30 La especificidad de las piocinas de tipo R se confiere por la fibra caudal codificada por *prf15*. PRF15 está muy estrechamente relacionado con las fibras caudales de fagos de la familia *Myoviridae*, particularmente fagos similares a P2 (Nakayama et al., 2000). Estas fibras caudales son homotrimeros dispuestos simétricamente sobre una estructura de placa base con seis copias por partícula, tal como se muestra en la Figura 1. La región N-terminal de la fibra caudal se une a la placa base y la parte C-terminal, probablemente cerca del extremo, se une al receptor bacteriano y de este modo confiere especificidad de eliminación. Una chaperona afín, codificada por *prf16* (en el caso de piocinas de tipo R) se localiza inmediatamente cadena abajo de *prf15* y es necesaria para el plegamiento adecuado de la fibra caudal y/o el ensamblaje de las fibras caudales a la estructura de la piocina. Las partículas de piocinas de tipo R se han descrito como similares inmunológicamente y genéticamente a las colas de determinados bacteriófagos de *P. aeruginosa* (Kageyama 1975, Kageyama et al. 1979, Shinomiya et al. 1989 y Shinomiya et al. 1983b). Se ha propuesto que las piocinas de tipo R y los bacteriófagos de *Pseudomonas*, tales como PS-17 y  $\Phi$ CTX, están relacionados a través de un bacteriófago lisogénico ancestral común a partir del cual se perdieron los genes que codifican las proteínas de cabeza y las funciones de replicación y los genes residuales del

fago se adaptaron para su función como componentes de las piocinas de tipo R defensivas (Shinomiyama et al. 1989).

Se han descrito bacteriocinas de tipo R similares de elevado peso molecular en otras bacterias, incluyendo *Yersinia enterocolitica* (Strauch et al., 2001), *Listeria monocytogenes* (Zink et al, 1995), *Staphylococcus aureus* (Birmingham y Pattee, 1981) y *Erwinia amylovora* (Jabrane et al., 2002). La clasificación y nomenclatura de las bacteriocinas ha sufrido cambios a lo largo del tiempo, particularmente debido al aumento de pruebas de su origen, química y actividades. Típicamente, la denominación de las bacteriocinas se basa en la especie productora. Por ejemplo, *E. coli* produce bacteriocinas denominadas colicinas; *Pseudomonas aeruginosa* produce piocinas; *Listeria monocytogenes* produce monocinas; *Yersinia enterocolitica* produce enterocolitinas; y así sucesivamente. Históricamente, la clasificación comenzó con la identificación de aproximadamente 20 colicinas que se clasificaron como A-V. En la mayoría de los casos, cada bacteriocina parece ser específica en su acción para especies de organismos iguales o taxonómicamente relacionadas. Las cepas productoras de piocina son típicamente resistentes a su propia piocina. Se describe un ensayo general para la concentración de bacteriocina en la Patente de Estados Unidos 4.142.939.

La cita de los anteriores documentos no pretende ser una admisión de que cualquiera de los anteriores sea técnica anterior pertinente. Todas las afirmaciones en cuanto a la fecha o representación en cuanto a los contenidos de estos documentos están basadas en la información disponible al solicitante y no constituye ninguna admisión relacionada con la corrección de las fechas o contenidos de estos documentos.

### Sumario de la divulgación

La presente divulgación se refiere a formas diseñadas por ingeniería genética de la clase de bacteriocinas que se asemejan pero que son distintas de las colas de bacteriófagos. Estas bacteriocinas incluyen piocinas de tipo R.

La presente invención proporciona una proteína bacteriocina de fibra caudal de elevado peso molecular (epm) que comprende una región de anclaje a placa base (BPAR) y un dominio de unión a receptor heterólogo (RBD), en la que RBD procede de una fibra caudal de un bacteriófago o protofago o de una fibra caudal de otra bacteriocina que muestre características de unión diferentes de aquellas de la bacteriocina del BPAR y en la que BPAR comprende los aminoácidos 1-164 ó 1-240 de una piocina de tipo R.

Las bacteriocinas de EPM naturales son típicamente termolábiles, resistentes a tripsina y pueden inducirse mediante agentes que activan el sistema SOS. Por ejemplo, también se han identificado en muchas enterobacterias, especies de *Pseudomonas*, *Rhizobium lupini*, especies de *Bacillus*, especies de *Yersinia* y especies de *Flavobacterium*.

Una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética está compuesta de múltiples copias de una serie de diferentes subunidades de polipéptido y posee una o más fibras caudales compuesta de proteínas de fibra caudal. Cada fibra caudal contiene un dominio de unión a receptor (RBD) que se une a, o interactúa con, un receptor para formar un par de unión. El RBD es la porción de una fibra caudal que comprende la propiedad de unión a bacteria que la convierte en el primer miembro del par de unión. Un RBD tal como se divulga en el presente documento comprende la modificación de una proteína en la fibra caudal para formar una fibra caudal modificada. La fibra caudal modificada con las otras subunidades polipeptídicas forma una bacteriocina de epm diseñada (o modificada) por ingeniería genética. El receptor al que se une el RBD es el segundo miembro del par de unión y puede ser el mismo que, o diferente al, receptor para una bacteriocina sin la fibra caudal modificada. En algunas realizaciones de la divulgación, el segundo miembro de un par de unión es un factor de virulencia o aptitud de una bacteria patógena. En otras realizaciones, el segundo miembro es un componente de la capa más externa (o capas) de una célula bacteriana, tal como una membrana celular o en el caso de bacterias gram-positivas, un componente de la pared celular.

En comparación con una bacteriocina de epm que carece de la fibra caudal modificada, una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética puede diferir en el número, forma y fuerza de unión de sus interacciones con un receptor. Por lo tanto, una bacteriocina de epm puede tener propiedades de unión diferentes o adicionales (por ejemplo, especificidades, afinidades o avidéz de unión) en comparación con una bacteriocina sin la modificación. Una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética no es una molécula de origen natural pero puede ser una versión modificada de una molécula de origen natural. Como alternativa, una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética puede ser una versión modificada de otra bacteriocina de origen no natural. En la mayoría de realizaciones, una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética sigue siendo un agente letal para células bacterianas que expresan un receptor al que se une la bacteriocina.

En algunas realizaciones, la fibra caudal comprende una secuencia heteróloga, o no-bacteriocina, en uno o más de los monómeros de la proteína de cola que conforman una sola fibra caudal trimérica. Y mientras que las fibras caudales en una bacteriocina nativa, o de origen natural pueden ser homotriméricas para formar un RBD, la fibra caudal de una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética es bien heterotrimérica, donde uno o dos de los monómeros de proteína es o son diferentes de los demás, u homotriméricas, donde los tres monómeros de proteínas son igualmente no nativos (de origen no natural). La presencia de secuencia heteróloga (o no nativa) en uno o más monómeros de proteína permite que el trímero forme una fibra caudal con un RBD modificado.

Por lo tanto, la secuencia heteróloga es una parte del monómero (o los monómeros) de tal forma que al menos el

RBD de la fibra caudal está alterado en un trímero ensamblado. El RBD alterado cambia las características y propiedades de unión de la fibra caudal y por tanto de la actividad de unión de una bacteriocina de epm que contiene la fibra caudal. El RBD heterólogo se deriva de otra bacteriocina o de otra proteína de cola procedente de un bacteriófago o profago. En muchos casos, el RBD heterólogo es un polipéptido que incluye al menos parte de la porción C-terminal de una proteína de fibra caudal de una bacteriocina, de una proteína de fibra caudal de bacteriófago, o de una supuesta proteína de fibra caudal, cuya secuencia se ha derivado de un bacteriófago lisogénico viable o incluso defectuoso que se encuentra en el genoma de una bacteria. El RBD heterólogo se fusiona a un polipéptido que contiene una región de unión a placa base (BPAR) de una proteína de fibra caudal de bacteriocina. El polipéptido que contiene BPAR puede contener la totalidad o parte de la porción N-terminal de una fibra caudal de bacteriocina de epm, donde la porción N-terminal puede consistir en cualquier parte de la fibra caudal a excepción del extremo C-terminal en sí.

En otras realizaciones, el RBD heterólogo se deriva del determinante principal de tripsina (Mtd) de bacteriófago de *Bordetella*. Los ejemplos no limitantes incluyen un RBD heterólogo que comprende un Mtd modificado o diversificado, opcionalmente con la totalidad o parte del RBD de una fibra caudal de un bacteriófago. En algunas realizaciones, la fibra caudal de bacteriófago es la bacteriófago similar a miovirus de *Vibrio harveyi* miovirus (VHML) o sus derivados diversificados o aquellos de otro profago o bacteriófago que comprende una estructura de retroelemento generador de diversidad (DGR).

También se describe una porción de una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética donde la porción mantiene la actividad de la bacteriocina para unirse a un receptor sobre la superficie celular bacteriana y después promover la penetración de la membrana celular. Por lo tanto, la porción puede ser cualquiera que mantenga las actividades de unión (reconocimiento) y penetración de membrana de una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética. En algunas realizaciones, la porción comprende uno o más polipéptidos de bacteriocina que están truncados.

La divulgación incluye fibras caudales modificadas que pueden ser parte de una bacteriocina de epm de la divulgación. La fibra caudal trimérica puede comprender una o más proteínas de fibra caudal con un RBD modificado o un RBD heterólogo.

La divulgación también incluye secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de fibra caudal modificada, así como vectores y/o células (hospedadoras) que contienen las secuencias codificantes. Los vectores y/o células hospedadoras pueden usarse para expresar las secuencias codificantes para producir proteínas de fibras caudales modificadas que forman fibras caudales y se incorporan a una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética de la divulgación. También puede introducirse una secuencia que codifica una proteína de fibra caudal modificada en una célula bacteriana que produce, o es capaz de producir una bacteriocina de epm en presencia de la proteína de fibra caudal modificada. La expresión de la proteína de fibra caudal modificada da como resultado la producción de una bacteriocina de epm modificada por parte de la célula. Si se inactivan y eliminan secuencias naturales de proteína de fibra caudal de bacteriocinas, solo se producirán bacteriocinas de epm modificadas. Si se mantienen secuencias de proteína de fibra caudal naturales de bacteriocina, se producirán bacteriocinas epm modificadas junto con las fibras caudales naturales de bacteriocinas y las piocinas generadas pueden ser mezclas tanto de piocinas modificadas como de piocinas naturales. Además, las piocinas generadas a partir de dichas bacterias hospedadoras productoras pueden contener piocinas bivalentes (multivalentes), esto es, contienen partículas de piocina individuales con una mezcla de dos tipos de fibra caudal, cada una con sus propiedades de unión específicas. Dichas piocinas multivalentes tienen múltiples, es decir, dos o más, especificidades de unión y eliminación en la misma partícula o molécula de piocina. Las bacterias transfectadas pueden propagarse para producir bacteriocinas epm que previenen o inhiben el crecimiento de otras bacterias que expresan un receptor unido por la bacteriocina de epm modificada o por una de las bacteriocinas epm de la mezcla de bacteriocinas naturales más epm modificadas.

En algunas realizaciones, el receptor es un factor de virulencia o aptitud de una cepa bacteriana virulenta o patógena de tal forma que la exposición a la bacteriocina de epm modificada previene o inhibe el crecimiento de la cepa virulenta o patógena. Los ejemplos no limitantes de factores de virulencia usados como diana por una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética incluyen aquellos codificados por las secuencias divulgadas en la Patente de Estados Unidos 6.355.411 y la solicitud publicada de patente WO 99/27129 (Ausubel et al.).

La exposición es opcionalmente a través de contacto, o cultivo conjunto, con bacterias transfectadas que expresan la bacteriocina de epm. La divulgación incluye permitir la propagación de las bacterias transfectadas *in vivo*, sobre o en un sujeto animal o vegetal. La aplicación *in vivo* de la bacteria transfectada proporciona un estado de protección contra bacterias que expresan un receptor de superficie usado como diana por la bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética. El estado de protección es análogo a un estado de inmunidad, donde las bacterias transfectadas aumentan o complementan esencialmente el sistema inmunitario u otro sistema defensivo del animal o de la planta.

En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica un RBD de una proteína de fibra caudal monomérica es parte de un sistema genético que permite la identificación, aislamiento físico y/o selección de la secuencia codificante. Como ejemplos no limitantes, el sistema codificante puede comprender la secuencia codificante en un fago, fago lisogénico, partícula transductora, cósmido o genoma de fago que permita su identificación, aislamiento y/o selección. En algunas realizaciones, la secuencia se fusiona con una porción de un

gen de fibra y se expresa para producir un trómero de fibra caudal que provocará la unión de la bacteriocina de epm modificada a la superficie de de un organismo hospedador que porta el fago lisogénico a partir del cual se identificó o aisló la secuencia codificante de RBD y la eliminación de dicho organismo. La detección de un fenotipo en el trómero de fibra caudal modificado permite que se seleccione y/o examine, identifique y aisle la secuencia. En algunas realizaciones, el fenotipo puede ser una propiedad de unión a receptor deseada y posiblemente rara.

La divulgación incluye una biblioteca de fagos, partículas transductoras, cósmidos o genomas de fagos que contienen una diversidad de secuencias de ADN y/o ARN, cada una codificando una proteína de fibra caudal modificada. Este acoplamiento de fenotipo de unión del RBD permite la expresión de una diversidad de RBD modificados de tal forma que las secuencias que los codifican estén representadas en la biblioteca. En algunos ejemplos, los miembros de una biblioteca contienen cada uno una secuencia que codifica una proteína de fibra caudal modificada de tal forma que se expresan y están disponibles fibras caudales homotriméricas para su exploración o selección para determinar el fenotipo de unión respectivo de un miembro de la biblioteca. En otros ejemplos, los miembros de una biblioteca incluyen aquellos con más de una secuencia que codifica una proteína de fibra caudal modificada, de tal forma que las fibras caudales heterotriméricas divulgadas en el presente documento pueden expresarse y explorarse o seleccionarse en función de sus fenotipos de unión. El fenotipo de unión de un miembro de la biblioteca se empareja por lo tanto a las secuencias codificantes respectivas. Una vez que se ha identificado de este modo el genotipo que codifica el RBD deseado o ventajoso, puede usarse para crear la fibra caudal para una bacteriocina de epm modificada. Al desplegar la función de chaperona afín de una fibra caudal, tal como VHML, que de manera natural diversifica su RBD, se puede asegurar el plegado adecuado de una fibra caudal que contiene un RBD diversificado derivado de VHML.

Los vectores, células hospedadoras, fagos, partículas transductoras, cósmidos, genomas de fago y bibliotecas tal como se divulgan en el presente documento pueden considerarse composiciones que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fibra caudal.

Las composiciones adicionales de la divulgación comprenden una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética o una porción antibacteriana de la misma. Las composiciones son antibacterianas por virtud de la bacteriocina de epm y pueden comprender un vehículo o excipiente. Por supuesto, el vehículo o excipiente es uno que es adecuado para su uso en combinación con una proteína compleja de múltiples subunidades, tal como una bacteriocina de epm. En algunas realizaciones, el vehículo o excipiente es farmacéuticamente aceptable, de tal forma que la composición puede usarse clínicamente o agronómicamente. En otras realizaciones, el vehículo o excipiente es adecuado para administración tópica, pulmonar, gastrointestinal o sistémica, tal como a un ser humano o a un animal no humano. En realizaciones adicionales, el vehículo o excipiente es adecuado para su administración a un organismo no animal, tal como una planta o producto fresco de una planta, a modo de ejemplos no limitantes.

Una composición tal como se divulga en el presente documento puede comprender más de una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética y comprender uno o más agentes adicionales, incluyendo, pero sin limitación, una bacteriocina natural de epm deseada para su uso junto con la bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética. Los ejemplos no limitantes de un agente adicional incluyen una enzima, un antibiótico, un agente antifúngico, un bactericida, un analgésico y un agente antiinflamatorio.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona métodos para usar un producto relacionado con una bacteriocina de epm descrito en el presente documento. Las realizaciones de la invención incluyen métodos para inhibir el crecimiento celular bacteriano o para inducir la muerte celular bacteriana. Dichos métodos comprenden poner en contacto una célula o células bacterianas susceptibles con una cantidad eficaz de una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética, o con una porción antibacteriana de la misma. Como alternativa, puede usarse una composición que contiene la bacteriocina de epm, o una porción bactericida de la misma. En algunos casos, una cantidad eficaz puede ser equivalente a tan pocas como, de media, una bacteriocina de epm por célula bacteriana. Por supuesto, también pueden usarse cantidades mayores.

En otras realizaciones, se proporciona un método para comprometer la integridad de la membrana citoplasmática de una bacteria. El compromiso puede dar como resultado la pérdida del potencial de membrana y/o la pérdida de parte del contenido celular. Dichos métodos comprenden poner en contacto la membrana con una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética, o una porción antibacteriana de la misma. En muchos casos, la membrana será aquella de bacterias virulentas o patógenas.

En algunas realizaciones, los métodos de la divulgación pueden comprender la aplicación (o administración) *in vivo* de una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética, o una porción antibacteriana de la misma, en un sujeto. Como alternativa, los métodos pueden comprender el contacto *in vitro* o *ex vivo*.

En un aspecto adicional más, la divulgación proporciona un método para formar bacterias no virulentas a partir de bacterias virulentas progenitoras. El método comprende poner en contacto bacterias virulentas con una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética, o una porción antibacteriana de la misma, que se une a un factor de virulencia o aptitud de la bacteria virulenta. La puesta en contacto puede ser en condiciones en las que no todas las bacterias se eliminan, o se inhibe completamente su crecimiento celular, mediante la cantidad de bacteriocina de epm, o porción antibacteriana de la misma, que se usa. La puesta en contacto proporciona presión selectiva que

permite a la bacteria diana sobrevivir a la bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética o porción antibacteriana de la misma y propagarse solo si se ha convertido en un mutante no virulento o progenie bacteriana modificada que no es susceptible (y por lo tanto resistente) a la bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética o porción antibacteriana de la misma. En algunas realizaciones, la resistencia se debe a la ausencia de expresión del factor de virulencia o aptitud o receptor para la bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética, o porción antibacteriana de la misma, evitando de este modo el ataque por la bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética. En otra realización, la resistencia puede deberse a una alteración en el factor de virulencia o aptitud de tal forma que deja de servir como receptor eficaz para el RBD de la piocina modificada y en la forma alterada también compromete su función de virulencia o aptitud. La adquisición de resistencia por la progenie superviviente y el cambio en la virulencia o aptitud resultante de una bacteria que previamente era virulenta, puede determinarse *in vivo* o *in vitro* para demostrar su patogenicidad comprometida.

En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona un método para mantener una población de bacterias no virulentas mediante contacto con una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética, o una porción antibacteriana de la misma, que se une a, y media su efecto bactericida a través de, un factor de virulencia o aptitud de la bacteria virulenta. La presencia de la bacteriocina de epm evita el crecimiento (o la generación o programación) de bacterias virulentas y de este modo mantiene la población como no virulenta. En algunas realizaciones, la puesta en contacto puede ser mediante el uso de una célula bacteriana, tal como se describe en el presente documento, que expresa la bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética o porción antibacteriana de la misma.

Los detalles de una o más realizaciones de la divulgación se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la divulgación serán evidentes a partir de los dibujos y la descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona una micrografía electrónica de una partícula de piocina de tipo R que revela 4 de las 6 fibras caudales en el Panel A y un esquema de los componentes principales de una partícula de piocina de tipo R en el Panel B.

La Figura 2 proporciona ensayos de dilución en serie de puntos (5X) de piocinas de tipo silvestre (R2), partículas de piocina producidas a partir de la cepa de eliminación de la fibra caudal (PA01  $\Delta Prf15$ ) y piocinas complementadas con la fusión de fibra caudal R2-P2. Las bacterias diana son *P. aeruginosa* 13s y *E. coli* C. Las partículas de piocina R2 de tipo silvestre pueden eliminar *Pseudomonas* pero no *E. coli*. La cepa de eliminación de la fibra caudal no produce partículas de piocina activas, pero cuando se complementan *in trans* con la fusión de fibra caudal R2-P2, pueden eliminar a *E. coli* C.

La Figura 3 complementa la estructura de piocina R2 con una fusión de fibra caudal R2-P2. La porción C-terminal (RBD) del gen de fibra caudal P2 se fusionó a la porción N-terminal (BPAR) de la fibra caudal de R2, tal como se muestra en la parte A.

La parte B de la Figura 3 muestra un esquema de la piocina R2 de tipo silvestre (izquierda). La piocina R2 está complementada con la construcción de fusión de R2 (BPAR)-P2 (RBD) para producir (a la derecha) partículas que tienen las fibras caudales quiméricas incorporadas en la estructura. Las partículas R2-P2 tienen un espectro de eliminación alterado y ahora se dirigen a determinadas cepas de *E. coli*.

La Figura 4 proporciona múltiples fusiones de R2-P2 y sus actividades bactericidas. El extremo N-terminal, de 1-164 aminoácidos, de R2 (región de unión a placa base, "BPAR") se fusionó a varias porciones C-terminales de P2 (RBD). Los números representan los números de restos de aminoácidos de las proteínas respectivas. La actividad bactericida de las piocinas modificadas (contra *E. coli* C) que contienen cada una de las fibras caudales construidas están indicadas como presentes (+) o ausentes (-).

La Figura 5 muestra varias porciones del extremo N-terminal de la fibra caudal R2 (BPAR) fusionada a la porción C-terminal 158-669 (RBD) de la fibra caudal P2. Los números representan los números de restos de aminoácidos de las proteínas respectivas. La actividad bactericida de las piocinas modificadas (contra *E. coli* C) que contienen cada una de las fibras caudales construidas están indicadas como presentes (+) o ausentes (-).

La Figura 6 muestra múltiples fusiones de R2-P2 y sus actividades bactericidas. El extremo N-terminal, 1-240 aminoácidos, de R2 (BPAR) se fusionó a varias porciones C-terminales de P2 (RBD). Los números representan los números de restos de aminoácidos de las proteínas respectivas. La actividad bactericida de las piocinas modificadas (contra *E. coli* C) que contienen cada una de las fibras caudales construidas están indicadas como presentes (+) o ausentes (-).

La Figura 7 proporciona varias porciones del extremo N-terminal de la fibra caudal de R2 (BPAR) fusionada a la porción C-terminal 322-669 (RBD) de la fibra caudal P2. Los números representan los números de restos de aminoácidos de las proteínas respectivas. La actividad bactericida de las piocinas modificadas (contra *E. coli* C) que contienen cada una de las fibras caudales construidas están indicadas como presentes (+) o ausentes (-).

La Figura 8 muestra la complementación en *trans* de la estructura de piocina PA01  $\Delta$ prf15 R2 con diversas fibras caudales de piocina de tipo R, fusiones de fibra caudal y chaperonas. Las actividades de las piocinas R1 a R5 complementadas se evaluaron punteando sobre la cepa indicadora *Pseudomonas aeruginosa* 13s, que es sensible a todos los tipos de piocinas. Las piocinas R2-P2 complementadas se ensayaron con respecto a su actividad usando *E. coli* C como indicador y se ensayó la piocina R2-L-413c complementada en la cepa de *Yersinia pestis* KIM.

Las fibras caudales de R2, R3 y R4 Prf15 se pudieron complementar mediante el Prf16 endógeno de la piocina PA01  $\Delta$ prf15 R2. Las fibras caudales de R1 y R5 Prf15, que difieren en el extremo C-terminal en comparación con R2, requirieron, para su actividad máxima, su propio Prf16 afín (que a su vez difiere de su homólogo de R2). Las fusiones tanto R2-P2 como R2-L-413c, que contienen el extremo C-terminal (RBD) del fago P2 y fibras caudales de L-413c, respectivamente, requieren sus chaperonas de ensamblaje de la fibra caudal afines codificadas por el gen G del fago.

La Figura 9 muestra el vector de expresión de la fibra caudal de piocina y de la chaperona pUCP30T. Los genes, *prf5* y *prf16*, se expresan usando un vector lanzadera de *Pseudomonas/E. coli* (Schweitzer) con orígenes de replicación (ori pRO1600, rep y oriT) para ambas especies. Los sitios de clonación se muestran mediante los sitios de escisión de enzima de restricción indicados. El plásmido confiere resistencia a gentamicina (Gm R) y se mantiene añadiendo gentamicina al medio de cultivo. La transcripción de ambos genes se dirige por el promotor *tac* que está regulado negativamente por *lacIQ*. Cuando se transforma en la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1  $\Delta$ prf15, los genes, por ejemplo, *prf15* y *prf16*, incorporados en el plásmido se expresan *in trans* después de inducirse con IPTG simultáneamente con la inducción de mitomicina C de aquellos genes de piocina que permanecen en las bacterias hospedadoras de producción de PAO1  $\Delta$ prf15.

La Figura 10 proporciona la construcción de la fibra caudal de piocina específica de *Yersinia pestis*. De manera similar a la estrategia que se usó para construir R2-P2, la porción codificante C-terminal (RBD) del gen de fibra caudal L-413c se fusionó a una porción N-terminal (BPAR) de la fibra caudal de R2. Cuando se expresa *in trans* para complementar a la cepa de eliminación de fibra caudal de R2 PA01 $\Delta$ prf15, se producen partículas de piocina modificadas que contienen las fibras caudales quiméricas de R2-L-413c que pueden eliminar de manera eficaz a *Y. pestis* pero no a *Pseudomonas*.

La Figura 11 proporciona las secuencias de aminoácidos o las secuencias de ácidos nucleicos para las SEC ID N°: 1-59, proporcionadas en las páginas 11A-11J.

## DEFINICIONES

Tal como se usa en el presente documento, una bacteriocina de epm incluye una piocina de tipo R, bacteriocina similar a cola, bacteriocina de tipo R, piocinas de tipo F y de tipo R, monocinas, meningocinas u otras bacteriocinas de elevado peso molecular (epm). Una bacteriocina de epm incluye versiones modificadas de las piocinas de tipo R y de tipo F, enterocolitinas, monocinas y meningocinas (véase Kingsbury "Bacteriocin production by strains of *Neisseria meningitidis*." J. Bacteriol. 91 (5):1696-9, 1966). Una bacteriocina de epm modificada o diseñada por ingeniería genética puede ser una piocina de tipo R modificada seleccionada entre piocina R1, R2, R3, R4, o R5 de *P. aeruginosa*. Una bacteriocina de la divulgación puede ser termolábil, resistente a ácidos débiles, resistente a tripsina, sedimentable mediante centrifugación a aproximadamente 65.000 x g y resoluble mediante microscopía electrónica (véase Jabrane et al. Appl. Environ. Microbiol. 68:5704-5710, 2002; Daw et al. Micron 27:467-479, 1996; Bradley Bacteriol. Revs. 31:230-314, 1967; y Kageyama et al. Life Sciences 9:471-476, 1962. En muchos casos, una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética divulgada en el presente documento tiene una o más, en cualquier combinación, de estas propiedades. Una propiedad adicional común a las bacteriocinas y bacteriocinas epm diseñadas por ingeniería genética divulgadas en el presente documento es que no contienen ácido nucleico y por lo tanto son deficientes en replicación, de tal forma que no pueden reproducirse por sí mismas después o durante la eliminación de la bacteria diana, como sí pueden hacer muchos bacteriófagos.

Las piocinas y otras bacteriocinas epm divulgadas en el presente documento son moléculas complejas que comprenden múltiples subunidades de proteína, o polipéptido, y se asemejan a las estructuras de la cola de los bacteriófagos de la familia *myoviridae*. En las piocinas de origen natural, las estructuras de subunidad están codificadas por el genoma bacteriano, tal como aquel de *P. aeruginosa* y forman piocinas para que sirvan como defensas naturales contra otras bacterias (Kageyama, 1975). Una bacteria diana sensible puede eliminarse por una sola molécula de piocina (Kageyama, 1964; Shinomiya y Shiga, 1979; Morse et al., 1980; Strauch et al., 2001).

Una "bacteria diana" o "bacterias diana" se refieren a una bacteria o bacterias que están unidas mediante una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética de la divulgación y/o cuyo crecimiento, supervivencia o replicación se inhibe de este modo. La expresión "inhibición del crecimiento" o variaciones de la misma se refiere al freno o detención de la velocidad de división celular bacteriana o al cese de la división celular bacteriana, o a la muerte de las bacterias.

Tal como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico" se refiere típicamente a polímeros de desoxirribonucleótido o de ribonucleótido (puros o mixtos) en forma mono o bicatenaria. El término puede abarcar ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos o restos o enlaces estructurales modificados, que son

5 sintéticos, de origen natural y de origen no natural, que tienen propiedades de unión, estructurales o funcionales similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de un modo similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos no limitantes de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metil fosfonatos, metil fosfonatos quirales, 2-0-metil ribonucleótidos y ácidos peptidonucleicos (APN). La expresión ácido nucleico, en algunos contextos, puede usarse de manera intercambiable con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.

10 Una secuencia de ácido nucleico particular también abarca variantes de la misma modificadas de manera conservativa (tal como sustituciones de codones degradados) y secuencias complementarias, así como secuencias indicadas de manera explícita. Específicamente, las sustituciones de codones degradados pueden lograrse generando secuencias en las que la tercera posición ("oscilación") de uno o más (o todos) los codones seleccionados se sustituyen con restos de base mixta y/o desoxiinosina. Por lo tanto, una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de proteína divulgada en el presente documento también abarca variantes modificadas de la misma, tal como se describe en el presente documento.

15 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan típicamente de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los aminoácidos pueden citarse en el presente documento bien mediante sus símbolos de tres letras conocidos de manera común o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB.

20 Los factores de virulencia son aquellas moléculas que contribuyen a la patogenicidad de un organismo pero no a su viabilidad general. Tras la pérdida de un factor de virulencia, el organismo es menos patogénico pero no necesariamente menos viable. Los factores de virulencia pueden tener una cualquiera de diversas funciones, por ejemplo, regulación de la expresión génica, provisión de adhesión o movilidad, expulsión de agentes antibióticos, o formación de recubrimientos protectores, incluyendo películas biológicas.

25 Los factores de aptitud son aquellas moléculas que contribuyen a la viabilidad general del organismo, velocidad de crecimiento o competitividad en su ambiente. Tras la pérdida de un factor de aptitud, el organismo es menos viable o competitivo y debido a este compromiso, es de manera indirecta menos patogénico. Los factores de aptitud también pueden poseer una cualquiera de numerosas funciones, por ejemplo, adquisición de nutrientes, iones o agua, formación de componentes o protectores de las membranas celulares o paredes celulares, replicación, reparación o mutación de ácidos nucleicos, provisión de defensa o ataque hacia agresiones ambientales o competitivas.

30 Algunos factores de virulencia y aptitud están presentes en la superficie de la bacteria y por lo tanto están accesibles a una bacteriocina de epm divulgada en el presente documento. Al unirse a algunos factores de virulencia o aptitud superficiales, una bacteriocina de epm puede mediar la eliminación o perforación de las membranas celulares, comprometer la integridad de la membrana citoplásmica y/o disipar el potencial de membrana de la célula. Aquellas moléculas de superficie accesibles que soportan más probablemente la unión de y la eliminación por bacteriocina de epm, son proteínas, polisacáridos y lipopolisacáridos de la membrana externa. Por consiguiente, las dianas potenciales para bacteriocinas epm diseñadas por ingeniería genética son factores de virulencia y factores de aptitud que son proteínas, polisacáridos y lipopolisacáridos de la membrana externa. Algunos ejemplos no limitantes de dianas de factor de virulencia para piocinas diseñadas por ingeniería genética incluyen metaloproteasas de proteasa de escisión intramembrana (iCLIP); lectinas IL y IIL de unión a galactosa y fucosa; componentes de la superficie microbiana que reconocen proteínas de molécula de matriz adherentes (MSCRAMM); y adhesinas, tales como ACE.

40 El éxito final del direccionamiento de un factor de virulencia específico depende de su topografía sobre la superficie bacteriana, de su densidad en la superficie, quizá de su movilidad bidimensional en la membrana externa y de su prevalencia en aislados clínicos o de campo del patógeno. Por ejemplo, OprM es una proteína de membrana externa similar a porina implicadas en múltiples bombas de salida, por ejemplo, el sistema MexAB y son prevalentes en muchas bacterias gram-negativas (Wong y Hancock, 2000). TolC, similar a OprM, es una proteína accesoria necesaria para muchas bombas de salida de patógenos gram-negativos (Koronakis et al., 2004; Piddock, 2006). Además, varios miembros de la familia YcrC de secretina son proteínas de la membrana externa necesarias para la translocación de proteínas efectoras patógenas mediante el sistema de secreción de tipo tres ("T3SS"), del que muchos patógenos gram negativos, tales como *P. aeruginosa* y *Yersinia pestis* dependen para intoxicar a su hospedador mamífero (Galan y Collmer, 1999; Koster et al., 1997; Cornelis, 2006). Además, los miembros de la familia YscW son lipoproteínas ancladas también en la membrana externa para asistir en la inserción de las secretinas en la membrana (Burghout et al., 2004).

55 Los ejemplos no limitantes adicionales de factores de virulencia y aptitud incluyen una acuaporina, tal como la proteína canal de agua acuaporina-Z de *E. coli* (véase Calamita, 2000); RetS (véase Goodman et al., 2004; y Zolfaghar et al., 2005); miembros de la familia de 7TMR-DISM (véase Anantharaman et al., 2003); OprM (véase Wong et al., 2000; y SEC ID N°: 11); proteínas bacterianas, tales como OprJ (SEC ID N°: 12), OprN (SEC ID N°: 13), AprF (SEC ID N°: 14), OpmM (SEC ID N°:15), OpmA (SEC ID N°: 16), OpmD (SEC ID N°: 17), OpmE (SEC ID N°: 18), OpmQ (SEC ID N°: 35), OpmB (SEC ID N°: 36), OpmJ (SEC ID N°: 37), OpmG (SEC ID N°: 38), OpmI (SEC ID N°: 39), OpmH (SEC ID N°: 40), OpmK (SEC ID N°: 41), OpmN (SEC ID N°: 42), OpmF (SEC ID N°: 43) u OpmL (SEC ID N°: 44); familia OprD de porinas (véase Tamber et al., 2006); ACE, o el gen ACE codificado por OGIRF de *E. faecalis* (véase Sreedhar et al., 2000; y Rich, et al., 1999); lectinas PA-IL y PA-IIL de unión a galactosa y fucosa

(véase Mitchell et al., 2002); genes de virulencia animal y vegetal descritos por He et al., 2004; restos de pirofosfato extracelulares (véase Bonev et al., 2004); metaloproteasas (véase Rudner et al., 1999); y moléculas de superficie codificadas por transposón (véase Jacobs et al., 2003).

- 5 Otros ejemplos no limitantes de factores de virulencia usados como diana por una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética divulgada incluyen aquellos codificados por las fases abiertas de lectura (ORF) divulgadas en la Patente de Estados Unidos 6.355.411 y el documento WO 99/27129. En algunas realizaciones, un factor usado como diana por una bacteriocina divulgada en el presente documento es uno codificado por las siguientes ORF de la Patente de Estados Unidos:

Número de ORF	Codifica
5	Desconocido
9	Desconocido
21	Posiblemente un receptor
23	Posiblemente un transportador ABC
33	Desconocido
41	Posiblemente similar a mucina
43	Desconocido
51	Desconocido
53	Posiblemente similar a mucina
85	Desconocido
89	Posiblemente receptor de lipoproteína
91	Desconocido
95	Posiblemente proteofosfoglucono, superficie celular
107	Posiblemente ABC
110	Posiblemente glucosiltransferasa de membrana
113	Posiblemente la proteína de resistencia multifármaco MexA
132	Posiblemente muc d
134	Posiblemente 6-UDP manosa deshidrogenasa
149	Posiblemente diana potencial de transportador MDR
150	Posiblemente la proteína de resistencia multifármaco MexA
203	Posiblemente componente de ATPasa de transportador ABC
204	Posiblemente componente de ATPasa de transportador ABC
205	Posiblemente componente de ATPasa de transportador ABC
206	Posiblemente componente de ATPasa de transportador ABC
207	Posiblemente componente de ATPasa de transportador ABC
208	Posiblemente componente de ATPasa de transportador ABC
209	Posiblemente ABC; Posiblemente Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> de tipo NhaP
213	antiportadores
215	Desconocido
227	Posiblemente un receptor
239	Posiblemente desoxicitidina trifosfato desaminasa
241	Posiblemente UTPasa
249	Desconocido
255	Desconocido

Número de ORF	Codifica
261	Posiblemente 6-fosfogluconato deshidrogenasa
263	Posiblemente un transportador ABC
273	Desconocido
277	Posiblemente miembro de la familia PE-PGRS
289	Posiblemente 6-fosfogluconato deshidrogenasa
291	Posiblemente glucosil transferasa
297	Posiblemente igA
301	Posiblemente glucosil transferasa
309	Posiblemente bomba de salida de cationes/multifármaco
323	Desconocido
327	Desconocido
331	Posiblemente sensor con supuesta PiIR cinasa
333	Posiblemente transporte de proteína Tonb
341	Posiblemente Pil R
349	Posiblemente Pil A o R
363	Posiblemente orfz
365	Posiblemente un transportador ABC
375	Posiblemente mucina
377	Posiblemente fimT pilus
381	Posiblemente antígeno de inmovilización H1
383	Posiblemente fimU
387	Posiblemente PilV pilus
393	Posiblemente pilW et
401	Posiblemente pil X
403	Posiblemente antígeno cd3
411	Desconocido
413	Desconocido
419	Posiblemente pil E
421	Posiblemente pyl y2
427	Posiblemente antígeno de membrana externa PE-PGRS
437	Posiblemente ligA de ABC

### Descripción detallada de modos para poner en práctica la divulgación

#### General

5 Las bacteriocinas epm tienen la capacidad de eliminar rápidamente a las bacterias. Unos cuantos de los primeros informes de estudios *in vivo* han demostrado que pueden ser eficaces en ratones para esta aplicación (Haas et al., 1974; Merrikin y Terry, 1972). Los inventores han determinado recientemente que la piocina R2 de tipo silvestre puede rescatar a los ratones de una peritonitis aguda causada por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos cuando se administra bien intraperitonealmente o bien por vía intravenosa y que las piocinas R2 pueden actuar a dosis muy bajas, tales como  $10^9$  piocinas o menos de  $1 \mu\text{g}$  de proteína total en una sola dosis (datos no mostrados).

10

Para que las bacteriocinas epm sean clínicamente útiles como agentes antibacterianos, sin embargo, hay que abordar el problema de su estrecho espectro bactericida. Aunque esto puede verse como una ventaja en tanto que

es posible dirigirse específicamente a una especie o cepa particular sin afectar a la flora normal, los tipos de especies/cepas que son sensibles a bacteriocinas conocidas son limitados. Por ejemplo, actualmente se sabe que las piocinas se producen por algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y que tienen actividad frente a un estrecho intervalo de otras cepas de *Pseudomonas* y otras pocas especies gram-negativas. Se han descrito bacteriocinas de tipo R de otras especies (tales como *Erwinia*, véase Jabrane 2002 y *Yersinia enterocolitica*, véase Strauch) pero su aparición parece ser limitada. Los fagos de *Myoviridae*, por otra parte, están bastante extendidos y son comunes y se encuentran por toda la clase bacteriana.

Esta divulgación demuestra que es posible cambiar el espectro de una piocina de tipo R. Un determinante de espectro principal tanto entre piocinas como entre sus fagos relacionados se encuentra en que la fibra caudal, que se une a la superficie bacteriana específicamente, interactúa a través de su porción C-terminal (RBD) con un componente del LPS u otra estructura de la superficie celular. El LPS puede ser elevadamente variable entre especies y cepas de bacterias diferentes y las fibras caudales de bacteriófagos son en sí elevadamente variables, particularmente en esta región C-terminal que interactúa con la superficie celular (Tetart, Desplats,). Esta variabilidad aparentemente refleja las adaptaciones constantes de los fagos para cambiar las superficies del hospedador. Se ha observado que diferentes tipos de fagos que infectan al mismo hospedador (fagos P2, Mu y P1 de *E. coli*) tienen similitud de secuencia en la porción C-terminal de la fibra caudal (Haggard-Ljungquist E, Halling C, Calendar R.), lo que indica que la transferencia horizontal en estas regiones genéticas juega probablemente un papel en la especificidad de hospedador. Por ejemplo, la piocina R2 tiene un elevado grado de similitud de secuencia con el fago phiCTX de *Pseudomonas*, un fago que también está muy estrechamente relacionado con el fago P2 de *E. coli*. Al comparar las secuencias de fibra caudal de la piocina R2 y P2, se observa más similitud de secuencia en el extremo N-terminal (BPAR) que en el extremo C-terminal (RBD), lo que sugiere que el extremo C-terminal juega un papel en la especificidad de hospedador.

Tal como se divulga en el presente documento, es posible alterar el espectro diana de una piocina de tipo R modificando por ingeniería genética la porción C-terminal del gen de la fibra caudal. Es destacable que este cambio de espectro puede suceder a través de barreras de especie, lo que demuestra que las piocinas de tipo R naturales y otras bacteriocinas epm naturales pueden modificarse tal como se divulga en el presente documento y desarrollarse como antimicrobianos con un espectro más amplio.

#### **Bacteriocinas epm modificadas**

La divulgación proporciona bacteriocinas epm diseñadas por ingeniería genética, en particular, piocina de tipo R con especificidades y/o afinidades de unión alteradas. En algunas realizaciones, una bacteriocina de epm de la divulgación se une específicamente a moléculas superficiales expuestas que actúan como factores de virulencia o de aptitud de bacterias patógenas. La expresión "se une específicamente (o selectivamente)" se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia del ligando unido, a menudo en una población heterogénea de proteínas y otra materia biológica. Como resultado, la bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética una vez unida específicamente puede, de manera genérica, eliminar a la bacteria patógena. Además, para que se hagan resistentes a la bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética, las bacterias diana patógenas tienen que perder su sitio de unión o reconocimiento para la bacteriocina de epm. Dicho de otro modo, si la bacteriocina de epm modificada usa específicamente y exclusivamente el factor de virulencia o aptitud como receptor, la bacteria se vería forzada a perder su virulencia o aptitud para escapar de la eliminación mediante la bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética.

Una bacteriocina de epm modificada de la divulgación se asemeja a una cola de bacteriófago pero comprende una capacidad de unión, o dominio de unión a receptor (RBD), que se ha cambiado con relación a una bacteriocina no modificada, de origen natural o nativa. El RBD puede cambiarse en su secuencia de aminoácidos mediante el uso de técnicas de ADN recombinante tal como se describen en el presente documento. El término "recombinante", usado típicamente en referencia a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogo o por la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa, o que la célula se deriva de una célula modificada de este modo. Por lo tanto, una célula recombinante expresa genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresa genes nativos que están expresados de manera anormal, subexpresados o no expresados.

En muchas realizaciones, el RBD puede modificarse para que sea el de una fibra caudal de otra bacteriocina o de un bacteriófago. Como ejemplo no limitante divulgado en el presente documento, el RBD de la piocina R2 se modifica fusionando la porción C-terminal de la proteína de fibra caudal (RBD) de un fago (que infecta a un hospedador diferente) a la porción N-terminal (BPAR) de la proteína de fibra caudal R2. Al fusionar el extremo C-terminal de la fibra caudal de P2 a *PRF15* de R2 y expresar conjuntamente la chaperona afín de P2, se cambia el espectro de bacterias diana de R2 para que elimine a *E. coli* C. Véase la Figura 2.

En realizaciones adicionales, las bacteriocinas epm se modifican de otro modo. La divulgación incluye una bacteriocina de epm diseñada o seleccionada para que reconozca, o se dirija, a una molécula de superficie de una bacteria (tal como una bacteria patógena). La molécula de superficie puede considerarse un receptor en una bacteria reconocida, o unida, por la bacteriocina de epm.

La divulgación se basa en las propiedades de una fibra caudal de bacteriocina de epm para que se una a, o interactúe con, un receptor para formar un par de unión. La unión o interacción sucede mediante el RBD de la fibra caudal, que es el primer miembro del par de unión, siendo el receptor el segundo miembro del par. En muchas realizaciones, el receptor es una molécula de la superficie de una célula bacteriana o una porción de la misma. En otras realizaciones, el receptor es una molécula con propiedades de un factor de virulencia o aptitud de una bacteria patógena.

Una bacteriocina de epm modificada o diseñada por ingeniería genética divulgada en el presente documento comprende una fibra caudal que tiene tanto una región de unión a una placa base (BPAR) y un RBD modificado o heterólogo. Tal como se describe en el presente documento, la fibra caudal es una estructura trimérica de tres subunidades de proteína de fibra caudal, cada una de las cuales comprende también un primer dominio correspondiente a, y que forma, el BPAR en una fibra caudal y un segundo dominio que corresponde a, y forma, un RBD modificado o heterólogo en una fibra caudal.

Típicamente, "heterólogo" cuando se usa en referencia a porciones de una proteína o de una secuencia de ácido nucleico indica que la secuencia comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran normalmente en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. "Heterólogo" también significa que la secuencia de aminoácidos no se encuentra normalmente en conjunción con las otras secuencias o normalmente no está contenido en el plásmido, vector u hospedador seleccionado. En otras palabras, no es nativo para el sistema en el que ahora se utiliza. Por ejemplo, proteínas producidas por un organismo que no es la fuente de tipo silvestre para esas proteínas.

La divulgación incluye una proteína de fibra caudal de bacteriocina de epm que comprende un BPAR de la proteína y un RBD modificado o heterólogo. El BPAR está en la región N-terminal de una proteína de fibra caudal, mientras que el RBD está en la región C-terminal. En vez del RBD modificado o heterólogo, la proteína de fibra caudal puede ser la de cualquier bacteriocina de epm de origen natural, siendo ejemplos no limitantes una piocina, monocina, enterocolitina o meningocina. En algunas realizaciones, la proteína de fibra caudal de piocina R1, piocina R2, piocina R3, piocina R4 y piocina R5, tal como se representa por las SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, respectivamente, pueden usarse tal como se describe en el presente documento. En realizaciones adicionales, la proteína de fibra caudal puede ser aquella o aquellas de SEC ID N°: 45 del fago  $\Phi$ CTX, o aquella del fago PS 17 de SEC ID N°: 19 o aquella del bacteriófago VHML de SEC ID N°: 21 y 22.

Las realizaciones de la divulgación incluyen combinaciones de un BPAR de una proteína de fibra caudal de bacteriocina de epm y un RBD de una proteína de fibra caudal de bacteriófago, tal como se muestra en la Figura 3. En algunos casos, una combinación puede incluir los aminoácidos N-terminales desde la posición 1 hasta aproximadamente la posición 164 o la posición 240 de una proteína de fibra caudal de bacteriocina. Este fragmento polipeptídico puede fusionarse a una región de una proteína de fibra caudal de bacteriófago que incluye su porción C-terminal que contiene un RBD. La región puede ser un fragmento polipeptídico que carece de la región N-terminal desde la posición 1 hasta aproximadamente la posición 150, aproximadamente la posición 170, aproximadamente la posición 190, aproximadamente la posición 290, aproximadamente la posición 300, o aproximadamente la posición 320.

Usando la piocina R2 y la proteína de fibra caudal del fago P2 como ejemplos no limitantes, el fragmento que contiene BPAR puede incluir los aminoácidos N-terminales desde la posición 1 hasta la posición 164 o 240. Véanse las Figuras 4-7. El fragmento que contiene RBD puede incluir el extremo C-terminal y desde aproximadamente 347 hasta aproximadamente 755 aminoácidos de longitud de proteínas de fibra caudal del fago P2 o relacionadas. La fusión puede prepararse fácilmente mediante técnicas de ADN recombinante con secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína de fibra caudal de R2, tales como *prf15* y el gen *H* de fago P2 que codifica su proteína de fibra caudal. La chaperona afín del RBD necesita expresarse conjuntamente con los genes de fibra caudal de fusión para asegurar el ensamblaje de las fibras caudales modificadas en una estructura de piocina funcional. Véase la Figura 8.

#### **RBD de bacteriófagos**

Otras fuentes de RBD incluyen, pero sin limitación, fagos T-4 y otros fagos T-par o pseudoT-par, fagos T-3 y T-7, supergrupo de fagos T-7, fago Mu, fago P22, fago L-413c y fagos lamboides.

#### **RED de diversificación**

En realizaciones adicionales, una proteína de fibra caudal comprende una sustitución con, o una inserción de, un RBD derivado de un organismo que diversifica la estructura desplegando un retroelemento generador de diversidad (DGR), tal como se ilustra en la Solicitud de Patente publicada US 2006-0121450, publicada el 8 de junio de 2006. El determinante principal de tropismo (Mtd) de bacteriófago de *Bordetella* BPP-1 es una de dichas estructuras. La secuencia de Mtd está representada por SEC ID N°: 24, tal como se divulga en el presente documento. En otras realizaciones, la sustitución es con parte de la secuencia Mtd, tal como, pero sin limitación, la región desde el resto 49 al 381, del resto 171 al 381, o desde los restos 306 a 381, de SEC ID N°: 24. La inserción de la secuencia Mtd, o cualquier fragmento de la misma (tal como aquellos listados anteriormente), al extremo de una proteína de fibra

caudal, tal como después de la posición 691 de SEC ID N°: 3, se encuentra dentro de las realizaciones divulgadas en el presente documento. La sustitución de la secuencia Mtd, o cualquier fragmento de la misma (tales como aquellos listados anteriormente), puede ser para cualquier región no-BPAR de una proteína de fibra caudal. Los ejemplos no limitantes incluyen la región de las SEC ID N°: 1, 3, 5, 7 o 9 que comienzan aproximadamente en la posición 643, 625, 562, 448, 428, 231 y 163 hasta el extremo C-terminal de la secuencia (véanse las Figuras 4-7 para una ejemplificación de estas sustituciones).

Tal como se describe en el presente documento, la secuencia Mtd en la fibra caudal puede diversificarse para producir una diversidad de RBD modificados o heterólogos. La secuencia de ácido nucleico que codifica Mtd comprende una región variable (VR) que puede unirse operativamente, en *cis* o en *trans*, a una región molde (TR) de tal forma que la TR sea una secuencia molde que dirija la mutagénesis de sitio específico de la VR. La unión operativa entre las regiones VR y TR también incluye un enlace operativo a secuencias que codifican una actividad de transcriptasa inversa (RT), que puede estar presente en *trans* en relación a la VR. Los sitios de variabilidad en la VR de Mtd corresponden a restos de adenina en la región molde generalmente homóloga, TR, que en sí es invariable y esencial para alteraciones de secuencia en la VR. Por lo tanto, aunque una molécula inicial pueda contener una TR que sea idéntica a la VR, los restos de adenina presentes en la TR darán como resultado la mutagénesis o diversificación de las posiciones correspondientes en la secuencia VR. Por lo tanto, si la secuencia de TR es una repetición directa perfecta de la secuencia en la VR, la diversificación en la VR da como resultado uno o más restos de adenina en la VR, también encontrados en la TR, mutándose a otro nucleótido, que es citosina, timina o guanina, sin cambios en la secuencia de TR. Este sistema puede usarse para alterar la región VR y por lo tanto el RBD, de una proteína de fibra caudal tal como se describe en el presente documento.

Tras la diversificación, la proteína de fibra caudal puede variarse de tal forma que el RBD resultante tenga al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, o al menos un 95% de homología con el determinante principal de tropismo (Mtd) del bacteriófago BPP-1 de *Bordetella*, tal como se representa por la SEC ID N°: 24. Tal como se describe en el presente documento, la combinación de proteína de fibra caudal y Mtd puede ser una sustitución o una inserción de una secuencia Mtd o una porción de la misma en la secuencia de proteína de fibra caudal. Por lo tanto, puede verse que la proteína de fibra caudal comprende una sustitución o inserción con un dominio de unión con al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, o al menos un 95% de homología, tal como se ha indicado anteriormente.

Una molécula de ácido nucleico que codifica una combinación de fibra caudal y Mtd puede usarse para diversificación y variación de secuencia. Por lo tanto, las combinaciones de ácidos nucleicos que secuencias que codifican la totalidad o parte de una proteína de fibra caudal y la totalidad o parte de un Mtd, se encuentran dentro de las realizaciones divulgadas. Otras realizaciones incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican cualquier proteína de fibra caudal con un RBD modificado o heterólogo, tal como se divulga en el presente documento. En algunas realizaciones, el RBD modificado o heterólogo codificado comprende un cambio en la secuencia de aminoácidos del RBD en relación a un RBD de origen natural o en relación al BPAR presente en la proteína de fibra caudal tal como se ha descrito anteriormente.

En realizaciones adicionales, una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fibra caudal puede hacerse disponible para diversificación para formar una proteína de fibra caudal modificada divulgada en el presente documento. La molécula de ácido nucleico, bajo el control de un promotor adecuado, está situada de manera operativamente en 5' de una región atd-TR-brt. La secuencia TR puede citarse como TR' y prepararse basándose en la secuencia VR tal como se ha discutido anteriormente. La construcción de ácido nucleico resultante puede portar una eliminación de la estructura de terminador de la transcripción cadena arriba del atd.

Una región de la molécula de ácido nucleico que codifica el extremo C-terminal de la proteína de fibra caudal tal como se ha descrito anteriormente, se selecciona para que sea la VR y después se une operativamente a una secuencia TR' que contiene restos de adenina en posiciones que cuando se cambian, dirigen cambios de aminoácidos en la secuencia codificada por la VR. Dichos restos de adenina pueden diseñarse deliberadamente para que sean la primera o la segunda posición de los codones en la VR. La secuencia TR' puede ser inicialmente idéntica a la VR seleccionado seguido de mutagénesis de sitio dirigido o síntesis de ácidos nucleicos *de novo* para preparar una secuencia TR' que contenga restos de adenina en las posiciones correspondientes para dirigir la mutagénesis y la diversificación en la proteína de cola codificada.

### **Preparación y uso de bacteriocinas epm**

Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden usarse para expresar y preparar proteínas de fibra caudal, incluyendo proteínas modificadas o diseñadas por ingeniería genética, por cualquier medio conocido para el experto en la materia. En algunas realizaciones, la expresión es mediante el uso de un vector que contiene la molécula de ácido nucleico unida operativamente a un promotor que puede dirigir la expresión de la proteína de cola codificada.

En muchas realizaciones, la expresión puede suceder con la expresión de un gen opcional, tal como una secuencia codificante de una "chaperona" comunicada para varias bacteriocinas y bacteriófagos. La presencia de una chaperona facilita el montaje de una bacteriocina de epm de la divulgación sin convertirse necesariamente en una

parte de la bacteriocina. La chaperona puede ser la proteína afín o correspondiente para el RBD usado en una bacteriocina de epm de la divulgación, tal como se muestra en la Figura 8. Un ejemplo no limitante de una chaperona se codifica por *prf16* de R2 (SEC ID N°: 4) y corresponde a (o es la chaperona afín para) la proteína de fibra caudal de plocina R2 codificada por *prf15* (SEC ID N°: 3). Otros ejemplos incluyen el gen *G* en P2 (SEC ID N°: 26), el gen *G* en L-413c (SEC ID N°: 29), la chaperona afín, SEC ID N°: 20, para la fibra caudal de PS17 y el *Orf 38* (SEC ID N°: 23) en bacteriófagos VHML que son chaperonas afines a los genes de fibra caudal en cada fago. Estos genes son homólogos a gp38 de fago T4 (SEC ID N°: 32), que se sabe que es responsable del plegado adecuado de la fibra caudal de T4 (SEC ID N°: 31) en trimeros (Burda, Qu, Hash emolhossen).

El uso de una chaperona afín es ventajoso debido a que una chaperona no afín puede ser insuficiente para plegar adecuadamente una proteína de fibra caudal y/o ensamblarla en una bacteriocina de epm, tal como se muestra en la Figura 8. Como ejemplo no limitante, se ha observado que el producto génico *prf16* de R2 es insuficiente para complementar el plegado de una fibra caudal modificada que compromete un BPAR de R2 a una porción BRD de P2 de una fibra caudal. Sin quedar ligados a la teoría y ofrecida para mejorar la comprensión de la presente divulgación, se cree que una chaperona puede actuar específicamente en la porción C-terminal de su proteína de fibra caudal afín y que las fibras caudales y sus chaperonas han evolucionado de manera conjunta. Sin embargo, Qu et al. aislaron un mutante de fibra caudal gp37 de T4 que suprime la necesidad de gp38, su chaperona afín. Este mutante tenía una duplicación en gp37 de un motivo de bucle superenrollado, que puede en sí mismo jugar un papel en el plegamiento. Por lo tanto, se cree que puede diseñarse una proteína de fibra caudal para que contenga dicho cambio, de tal forma que se pliega de manera adecuada sin necesidad de expresar conjuntamente una chaperona afín.

Por lo tanto, las realizaciones de la divulgación incluyen una célula bacteriana transfectada con una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fibra caudal modificada o diseñada por ingeniería genética, expresada conjuntamente de manera opcional con una chaperona, tal como se describe en el presente documento. La expresión de la molécula de ácido nucleico, opcionalmente con una proteína accesoria (chaperona), da como resultado la producción de fibras caudales modificadas o diseñadas por ingeniería genética de la divulgación. La divulgación también incluye la expresión de más de una proteína de fibra caudal modificada o diseñada por ingeniería genética mediante el uso de más de una molécula de ácido nucleico para dar como resultado fibras caudales homotriméricas mixtas o incluso fibras caudales heterotriméricas. Además, las secuencias que codifican la proteína de fibra caudal la chaperona pueden estar contenidas en una sola molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido u otro vector, o en moléculas separadas. En los casos donde se usa una sola molécula de ácido nucleico, las secuencias pueden estar opcionalmente bajo el control de las mismas secuencias reguladoras. Como alternativa, las secuencias codificantes pueden estar bajo un control regulador separado.

En algunas realizaciones, la célula bacteriana también es capaz de expresar las subunidades adicionales para formar una bacteriocina de epm que comprende una fibra caudal modificada o diseñada por ingeniería genética. En un grupo de realizaciones, la secuencia codificante de la proteína de fibra caudal de la célula bacteriana se inactiva o elimina. Opcionalmente, las otras subunidades pueden estar codificadas por secuencias en una molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido u otro vector, separado del que contiene una secuencia que codifica una proteína de fibra caudal y/o una chaperona. Por lo tanto, la proteína de fibra caudal y/o chaperona puede proporcionarse en una o más moléculas de ácido nucleico *in trans* con relación a las otras subunidades.

Los ácidos nucleicos, vectores y células bacterianas pueden usarse en un método para producir una bacteriocina de epm modificada o diseñada por ingeniería genética tal como se divulga en el presente documento. Dicho método puede comprender cultivar células bacterianas que contienen moléculas de ácido nucleico tal como se han descrito anteriormente en condiciones que den como resultado la expresión y producción de la fibra caudal y bacteriocina de epm. En algunas realizaciones de la divulgación las condiciones son *in vivo* en un animal.

En un grupo de realizaciones, un método para preparar una bacteriocina de epm comprende expresar subunidades de bacteriocina, incluyendo la proteína de fibra caudal modificada o diseñada por ingeniería genética, en una bacteria hospedadora y recoger la bacteriocina de epm del cultivo bacteriano. La bacteria hospedadora es una bacteria de producción hospedadora complementaria que codifica y expresa las otras subunidades necesarias para la producción de la bacteriocina. La expresión "bacteria hospedadora" o "bacterias hospedadoras" se refiere a una bacteria o bacterias usadas para producir una bacteriocina de epm divulgada en el presente documento. La bacteria o bacterias hospedadoras también pueden citarse como "bacteria de producción hospedadora" o "bacterias de producción hospedadora". La "recogida de una bacteriocina de epm de un cultivo bacteriano" comprende generalmente retirar a la bacteriocina del cultivo hospedador bacteriano.

En un grupo de realizaciones alternativo, se proporciona un método para preparar una bacteriocina de epm con una fibra caudal modificada tal como se describe en el presente documento. El método puede comprender preparar una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fibra caudal modificada mediante cualquier medio divulgado en el presente documento y expresar la molécula de ácido nucleico en una célula en condiciones en las que se produce una bacteriocina de epm.

Las realizaciones de la divulgación incluyen una bacteriocina de epm que comprende una proteína de fibra caudal tal como se describe en el presente documento. En un grupo de realizaciones, la bacteriocina comprende una proteína

de fibra caudal compuesta en parte de la secuencia de aminoácidos representada por las SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9. En otras realizaciones, la bacteriocina es una piocina, monocina, enterocolicina o meningocina modificada o diseñada por ingeniería genética que comprende una fibra caudal con un RBD modificado heterólogo. En muchas realizaciones, el RBD modificado heterólogo se une a un factor de virulencia o aptitud bacteriano.

5 En realizaciones adicionales, se divulgan bacteriocinas epm diseñadas por ingeniería genética con fibras caudales multivalentes. Se ha descubierto mediante análisis cristalográfico de rayos X que Mtd de bacteriófago de *Bordetella bronchiseptica* BPP-1 es un homotrímero piramidal elevadamente entrecruzado con los tres conjuntos de doce restos de aminoácidos variables que forman tres sitios de unión bastante planos en la base de la pirámide y localizados en un dominio de lectina de tipo C ("CTL") evolucionado de manera convergente. La comparación de las  
10 estructuras de cinco variantes de Mtd a una resolución de 1,5 Å demostró que la conformación principal de cadena de los restos variables es estructuralmente invariable, con inserciones en el CTL y conjunto trimérico, ambas contribuyendo a la formación de un andamio estático para una presentación combinatoria de restos variables, de este modo minimizando la incidencia de mal plegamiento de la proteína (McMahon et al., 2005). Por lo tanto puede generarse una única fibra caudal para que contenga tres monómeros mixtos plegados adecuadamente ya que las  
15 estructuras de las fibras de Mtd variantes son idénticas excepto en los doce restos de aminoácidos expuestos a disolvente que no interactúan.

La estructura de la variante dominante Mtd-P1 unida a su receptor, el factor de virulencia pertactina de *Bordetella*, también se ha resuelto mediante cristalografía y se ha caracterizado. Uno de los monómeros de Mtd se une a un dominio estructural en pertactina; un segundo monómero idéntico del mismo Mtd se une a un dominio estructural  
20 diferente no simétrico de la misma molécula de pertactina (monomérica); un tercer monómero de Mtd permanece no unido.

Las estructuras variantes de Mtd y la interacción de unión entre Mtd y su diana, pertactina, pueden aplicarse al diseño y selección de fibras caudales multivalentes. Por ejemplo, es evidente que un monómero de Mtd puede mostrar afinidades para dos dominios estructurales diferentes y aún en formato multimérico posee suficiente avidéz  
25 para efectuar la unión funcional e infección del fago. Además, no todos los monómeros de una fibra necesitan estar unidos a un receptor para proporcionar la avidéz adecuada por la unión e infección del fago. Estos datos y conclusiones, junto con el conocimiento que para al menos los bacteriófagos T4, también *myoviridae*, solo necesitan unirse tres fibras caudales (homotriméricas) a receptores para activar la contracción de la vaina de cola y la penetración al núcleo de las membranas bacterianas, indica varios medios para generar una bacteriocina de epm multivalente. Dichas bacteriocinas epm multivalentes diseñadas por ingeniería genética tienen rangos de  
30 hospedador más amplios y son capaces de unirse a más de un solo factor de virulencia o aptitud incluso en el mismo organismo bacteriano, haciendo de este modo más difícil que las bacterias usadas como diana desarrollen resistencia mediante pérdida mutacional de la expresión de todos los receptores diana relevantes. Puede diseñarse por ingeniería genética una bacteriocina de tipo R para que contenga dos conjuntos independientes de tres fibras caudales idénticas, comprendiendo las fibras de un conjunto los mismos tres monómeros no idénticos y comprendiendo las fibras del otro conjunto tres monómeros diferentes no idénticos. Cada monómero puede poseer afinidades de unión para dos epítomos diferentes (por ejemplo, dos receptores diferentes), del mismo modo que hace Mtd. De este modo, cualquier bacteria que expresa una cualquiera o más de las 12 moléculas de receptor diferentes  
35 usadas como diana (2 "epítomos"/monómero *por* 3 monómeros/fibra caudal *por* 2 conjuntos de diferentes fibras caudales/bacteriocina de tipo R es igual a 12 receptores usados como diana) podrían unirse a la bacteriocina de epm multivalente diseñada por ingeniería genética y activar su penetración de membrana. Dichas bacteriocinas epm diseñadas por ingeniería genética tienen un intervalo de hospedador innaturalmente elevado, además, hacen elevadamente improbable que una bacteria que expresa más de un solo receptor usado como diana pueda hacerse resistente a las bacteriocinas epm diseñadas por ingeniería genética.

45 En otros aspectos, se proporcionan métodos para el uso de una bacteriocina de epm de la divulgación. En algunas realizaciones, se divulga un método para comprometer la integridad de la membrana citoplasmática de una bacteria. El método puede comprender poner en contacto una bacteria diana con una bacteriocina de epm, o una porción de la misma, tal como se divulga en el presente documento. Como alternativa, el contacto puede ser con una composición que contiene la bacteriocina de epm divulgada en el presente documento.

50 En un grupo de realizaciones, el contacto sucede *in vivo* en un sujeto. Por lo tanto, se divulga un método para comprometer la integridad de membrana de una bacteria en un sujeto. El método puede comprender administrar una bacteriocina de epm o una porción de la misma tal como se describe en el presente documento al sujeto. En otro grupo de realizaciones, el contacto sucede *in vitro*.

55 En otras realizaciones adicionales más, se proporciona un método para formar progenie de bacteria no virulenta o no apta a partir de bacterias progenitoras virulentas. El método puede comprender poner en contacto bacterias virulentas con una bacteriocina epm que se une a un factor de virulencia o aptitud de dicha bacteria progenitora virulenta tal como se divulga en el presente documento. El método puede entonces continuar permitiendo la selección de progenie de bacterias no virulentas que ya no expresan el factor de virulencia o aptitud.

60 En una realización alternativa, se proporciona un método para mantener una población de bacterias no virulenta. El método puede comprender poner en contacto a la población con una bacteriocina de epm que se une a un factor de

virulencia o aptitud de bacterias virulentas. El método continúa después y evita la propagación de bacterias virulentas. Sin quedar ligados a la teoría y ofrecida para mejorar la comprensión de la divulgación, una emergencia de resistencia bacteriana a una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética estará acompañada de una virulencia o aptitud comprometidas de la bacteria patógena.

- 5 Los métodos de la divulgación también pueden aplicarse en un ambiente donde no se desea el crecimiento bacteriano o se considera que es perjudicial. Los ejemplos no limitantes incluyen la esterilización de ambientes, incluyendo zonas médicas e instalaciones para operaciones; así como zonas de elaboración de alimentos, incluyendo zonas donde se manipulan carne o pescado crudos. Los métodos también pueden usarse para esterilizar objetos sensibles al calor, dispositivos médicos e implantes de tejido, incluyendo órganos para trasplantes.
- 10 Los métodos pueden usarse como terapia única o como terapia adyuvante, tal como para el tratamiento de poblaciones bacterianas. Se conocen numerosos agentes antimicrobianos (incluyendo antibióticos y agentes quimioterapéuticos) que podrían ser útiles en combinación con estos métodos para tratar afecciones causadas por bacterias.

### **Bacterias diana**

- 15 Las bacteriocinas epm diseñadas por ingeniería genética de la divulgación pueden modificarse para que se dirijan a un receptor en una diversidad de cepas y especies bacterianas, incluyendo bacterias patógenas, tales como bacterias nosocomiales o piogénicas, como ejemplos no limitantes. Además de usar como diana los factores de virulencia de bacterias seleccionadas tal como se describe en el presente documento, las bacterias que ya son susceptibles a los bacteriófagos son un grupo no limitante de bacterias que pueden inhibirse mediante una bacteriocina de epm, tal como una piocina modificada, de la divulgación. Estas bacterias incluyen las bacterias gram-negativas que son susceptibles, así como no sensibles a piocinas de origen natural. Los ejemplos no limitantes adicionales incluyen bacterias gram-negativas como grupo así como bacterias gram positivas. Hay informes de entidades similares a bacteriocinas en bacterias gram-positivas (Thompson y Pattee, 1981; Birmingham y Pattee, 1981; Zink et al., 1995). En algunas realizaciones, se identifica o diagnostica la bacteria diana. Los ejemplos no limitantes de dichas bacterias incluyen aquellas de los géneros *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* o *Streptococcus*.

- Como ejemplo no limitante de usar como diana un factor de virulencia, la divulgación incluye el uso de un RBD de proteína de fibra caudal de fago como aquel de la proteína gp37 de un fago similar a T-par o RB-69 denominado AV 17 que infecta a *E. coli* O157:H7 pero que no infecta a una cepa mutante derivada de esta que haya perdido el antígeno O157. (Véase Yoichi et al., 2005). La unión de este fago parece requerir la presencia del antígeno O157, un factor de virulencia, implicado en la adhesión al intestino del organismo patógeno *E. coli* O157:H7. Por lo tanto, una bacteriocina de epm de la divulgación puede contener una proteína de fibra caudal modificada que contiene el RBD de la proteína gp37 (SEC ID N°: 33) del fago AV17 anteriormente descrito de tal modo que la bacteriocina de epm modificada se dirige a un factor de virulencia, el antígeno O157, de *E. coli* O157:H7. La chaperona aún para la fibra caudal de AV17 tiene la SEC ID N°: 34.

- Otras bacterias diana incluyen aquellas responsables de infecciones tóxicas o localizadas por *P. aeruginosa* en seres humanos. Una "infección" se refiere al crecimiento de bacterias, tal como en un sujeto o tejido o célula no bacteriana, en el que la bacteria de hecho o potencialmente puede causar enfermedad o un síntoma en el sujeto, tejido o célula no bacteriana. El tratamiento de una infección puede incluir tratamiento profiláctico de sustancias o materiales. Los ejemplos no limitantes incluyen órganos donados, tejidos y células; equipamiento médico, como una máquina de respiración artificial o de diálisis; o heridas, tales como aquellas durante o después de una cirugía. Otros usos incluyen la eliminación de bacterias diana que pueden causar problemas tras un crecimiento adicional. En realizaciones adicionales, se usa una bacteriocina de epm para tratar plantas o partes de plantas recogidas con infecciones o contaminaciones bacterianas, o para tratar apariciones ambientales de las bacterias diana, tal como en una instalación hospitalaria o comercial.

- La divulgación proporciona el tratamiento, mediante administración o contacto con una bacteriocina de epm divulgada en el presente documento para dirigirse a la bacteria, de dichas infecciones en tejidos y sujetos, del modo siguiente. Las infecciones incluyen las infecciones comunes de la córnea ("queratitis" y úlceras corneales), al menos dos tercios de estas están causadas por *P. aeruginosa*. Se ha demostrado que aproximadamente un 30% de estos patógenos son resistentes a múltiples antibióticos (Mah-Sadorra et al., 2005). La infección bacteriana de la córnea se considera una afección relativamente infrecuente pero grave que requiere de atención médica urgente debido al potencial de visión reducida o incluso de pérdida de visión en el ojo afectado. Otras infecciones comunes que pueden tratarse y que están causadas por *P. aeruginosa* resistente a antibióticos, incluyen infecciones óticas, por ejemplo, "oído de nadador" (Roland y Stroman, 2002), aquellas secundarias a quemaduras y heridas graves (Holder, 1993) y fibrosis quística. La fibrosis quística que se agrava de manera consistente por infecciones crónicas resistentes a antibióticos causadas por *P. aeruginosa* y su familiar cercano, *Burkholderia cepacia* (Govan y Deretic, 1996) y estos patógenos en la fibrosis quística pueden tratarse mediante el uso de una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética. Debido a que las bacteriocinas, tales como las piocinas, tolerarán la liofilización (Higerd et al., 1969), la divulgación incluye una formulación liofilizada de una bacteriocina para su administración para mejorar la probabilidad de una administración satisfactoria a la vía aérea superior y/o inferior del tracto

respiratorio.

Tal como se describe en el presente documento, el tratamiento de un sujeto es típicamente el tratamiento de "un sujeto que necesite tratamiento". La determinación, o diagnóstico, de la necesidad de tratamiento puede efectuarse por un experto en la materia, tal como un clínico, usando medios reconocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el sujeto es un animal o una planta con una infección bacteriana que tiene potencialmente riesgo de muerte o que deteriora la salud o acorta la esperanza de vida del organismo.

En realizaciones adicionales, se proporciona un método para eliminar o inhibir el crecimiento de bacterias en una película biológica. Dicho método puede comprender poner en contacto una película biológica con una bacteriocina de epm divulgada en el presente documento que usa las bacterias en la película biológica como diana.

Tal como se describe en el presente documento, una bacteriocina de epm antibacteriana se usa para inhibir el crecimiento, supervivencia, o replicación de una bacteria particular. La bacteria puede ser una cepa patógena o ambientalmente perjudicial, o puede tratarse de manera profiláctica. Un microorganismo patógeno causa generalmente enfermedades, en ocasiones solo en circunstancias particulares.

Las bacterias pueden ser las de una infección nosocomial (hospitalaria), bacterias ambientales y bacterias piogénicas (formadoras de pus). Los métodos y composiciones de la divulgación pueden usarse para inhibir el crecimiento de bacterias nosocomiales, incluyendo bacterias que pueblan un ambiente hospitalario típico, o bacterias que están presentes en la piel humana o en el tracto gastrointestinal humano, o bacterias que infectan y forman pus en heridas. Las infecciones nosocomiales son infecciones que se hacen evidentes durante un ingreso hospitalario o están relacionadas con un procedimiento llevado a cabo en un hospital. Estas infecciones relacionadas con el procedimiento a menudo se hacen evidente después de que los pacientes hayan sido dados de alta del hospital. Las infecciones bacterianas nosocomiales más comunes son infecciones del tracto urinario, infecciones de la zona quirúrgica, neumonía, diarrea asociada con *C. difficile* y colitis pseudomembranosa, e infecciones sistémicas graves en las que las bacterias crecen en la sangre.

Los métodos y composiciones de la divulgación pueden usarse para inhibir el crecimiento de bacterias gram negativas o gram positivas. Los ejemplos no limitantes de bacterias gram positivas incluyen *Staphylococcus* (piogénica), *Enterococcus* (oportunista), *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* y *Clostridium*. Los ejemplos no limitantes de bacterias gram negativas incluyen *Pseudomonas* (piogénica), *E. coli* (oportunista), *Salmonella* (oportunista), *Campylobacter* (oportunista), *Proteus* (piogénica), *Klebsiella* (oportunista), *Enterobacter* (piogénica), *Citrobacter* (piogénica), bacilos gram negativos no fermentadores (tales como *Acinetobacter*) y *Shigella*. Los cocos piogénicos son bacterias esféricas que causan diversas infecciones supurantes (productoras de pus) en animales. Se incluyen los cocos gram positivos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*, y los cocos gram negativos, *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis*.

En realizaciones adicionales, los métodos y composiciones divulgados de la divulgación se usan para inhibir el crecimiento, particularmente de bacterias resistentes a antibióticos. Los ejemplos no limitantes incluyen numerosos patógenos bacterianos que se han hecho resistentes a diversos fármacos (MDR).

#### **Diseño de piocinas por ingeniería genética como ejemplo representativo no limitante**

Francois Jacob descubrió y describió por primera vez las piocinas como bacteriocinas de elevado peso molecular (Jacob, 1954). Se han descrito entidades similares a bacteriocinas en otras muchas bacterias gram negativas (Coetzee et al., 1968) así como en *Listeria monocytogenes* (Zink et al. 1995) y *Staphylococcus aureus* (Thompson y Pattee, 1981), los cuales son ambos organismos gram positivos. Aunque las piocinas se asemejan morfológicamente a las colas de bacteriófagos contráctiles (*myoviridae*), estas no son simplemente fagos defectuosos; hay diferencias significativas. Por ejemplo, existen diferencias en la estabilidad física y química entre piocinas y colas de fago (Kageyama y Egami, 1962; Nakayama et al., 2000).

Aunque los abanicos de hospedador de las piocinas son relativamente estrechos y normalmente restringidos a cepas de la misma especie, hay excepciones (Morse et al, 1976; Blackwell et al., 1982). Por otro lado, los bacteriófagos de *myoviridae* pueden mostrar amplios intervalos de hospedador y sus intervalos de hospedador, al igual que los de las piocinas, están determinados por las especificidades de unión de las puntas de sus fibras caudales (Tetart et al., 2001).

Para numerosas fibras caudales de fago, el tercio distal (3'-terminal) del gen varía en mutantes o variantes con intervalo de hospedador de fago alterado, o "tropismos" (Ackermann, 2003). Como ejemplo no limitante, el determinante principal de tropismo (Mtd), la proteína de unión a receptor del bacteriófago de *Bordetella* BPP-1, varía en secuencia ampliamente (Liu et al., 2004; Doulatov et al. 2004). La variación en Mtd depende de un retroelemento codificado por fago (retroelemento generador de diversidad, o DGR) que pertenece a una familia de DGR implicada en la generación de variación de secuencia en diversos genomas de fago y bacterianos. El DGR de *Bordetella* puede producir más de  $10^{13}$  variantes de secuencia diferentes de Mtd, que rivalizan con las  $10^{14}$ - $10^{16}$  posibles secuencias de los anticuerpos. Las variantes de Mtd se producen por un proceso único de mutagénesis específica de adenina que implica una transcriptasa inversa codificada por el DGR (bRT) y una región molde estable (TR). La

variabilidad en el Mtd se centra en 12 aminoácidos codificados por adenina que están dispersos a lo largo de su región variable C-terminal (VR) (Doulatov et al. 2004). Las estructuras cristalinas tridimensionales de numerosas variantes de Mtd de *Bordetella* Mtd se han resuelto y confirman, tal como se describe más adelante, que la punta de la estructura determina la especificidad de unión y por lo tanto el tropismo principal (intervalo de hospedador) del fago (McMahon et al., 2005). Por lo tanto, tal como se describe adicionalmente a continuación, Mtd y su sistema DGR relacionado puede usarse en la práctica de la divulgación.

Muchas especies de *Pseudomonas* poseen los genes para las piocinas de tipo R (Takeya et al., 1969; Kageyama, 1975). El locus de piocina de tipo R consiste en aproximadamente 16 grupos de complementación que incluyen aproximadamente 10 genes estructurales además de genes reguladores y de chaperona (Shinomiya et al. 1983a; Shinomiya et al., 1983b). Las piocinas de tipo R se asemejan morfológicamente y genéticamente a las colas de los bacteriófagos de *myoviridae* pero no tienen estructura de cabeza y por lo tanto no tienen contenido de ácido nucleico (Kageyama, 1964; Ishii et al., 1965; Shimizu et al., 1982). Se cree que han evolucionado a partir de la estructura de la cola de fago de un ancestro relacionado con P2, pero no son simplemente fagos defectuosos, habiendo adaptado su papel adicionalmente como agentes bactericidas defensivos (Nakayama et al, 2000). De manera similar a los bacteriófagos, sin embargo, las piocinas se unen a "receptores" moleculares específicos en bacterias diana y penetran sus membranas con una estructura de "núcleo" o acicular (Uratani y Hoshino, 1984). Como consecuencia inmediata de la penetración del núcleo de las membranas, la bacteria se elimina comprometiendo la integridad de su membrana citoplasmática y disipando su potencial de membrana, un suceso bactericida que puede ser el resultado del ataque por una sola piocina (Iijima, 1978; Uratani y Hoshino, 1984; Strauch et al., 2001).

El RBD, o determinante de unión a receptor de la unión a piocina R, de una piocina de tipo R típica se une a una molécula de la superficie bacteriana. En el caso de un aislado de piocina R2, el RBD se encuentra en la parte carboxilo terminal de su fibra caudal. La fibra caudal es un homotrímero del producto del gen *prf15* (Nakayama et al., 2000). La modificación del RBD en el gen *prf15* y la recombinación del gen *prf15* modificado en un sistema que produce piocinas de tipo R permiten la producción de una piocina modificada con especificidad de unión modificada.

El determinante principal de tropismo (Mtd) de bacteriófago de *Bordetella* posee varias propiedades únicas y útiles como dominio de unión. La forma funcional de Mtd en bacteriófago de *Bordetella* es un homotrímero que se une a la proteína de factor de virulencia, pertactina, en *Bordetella*. Por lo tanto, el gen *mtd* puede fusionarse al extremo distal del gen *prf15* para beneficiarse de las propiedades del Mtd. Por lo tanto, tal como se describe en el presente documento, un aspecto de la divulgación incluye la construcción de una proteína de fusión entre la proteína de fibra caudal de piocina de tipo R de *P. aeruginosa* (Prf15) y el determinante principal de tropismo (Mtd) de fago de *Bordetella*, BPP-1. Puede usarse una fusión Prf15-Mtd para complementar *in trans* a una eliminación de *prf15* de piocina de *P. aeruginosa* PA01 para que se una a y elimine a *Bordetella bronchiseptica* que expresa pertactina o *E. coli* que expresa pertactina.

Adicionalmente, el bacteriófago P2 o P4 puede usarse como subrogado para que porte el gen de fusión de fibra caudal *prf15-mtd* de tal forma que el genotipo se acopla al fenotipo de unión de la fibra caudal. Esto permite una transducción, selección y aislamiento eficaz del gen de fibra caudal que codifica el RBD deseado.

### **Modos de administración**

Una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética de la divulgación puede administrarse por cualquier medio adecuado. Los ejemplos no limitantes incluyen administración tópica o localizada así como administración pulmonar (inhalación), gastrointestinal, mediante catéter o tubo de goteo, o administración sistémica a un sujeto. Los ejemplos representativos y no limitantes de administración sistémica incluyen la administración intraperitoneal e intravenosa. Los efectos protectores de las piocinas administradas por vía intraperitoneal e intravenosa se han demostrado en ratones infectados de manera sistémica con dosis letales de cepas de *P. aeruginosa* sensibles *in vitro* a las piocinas administradas (Merrikin y Terry, 1972; Haas et al., 1974). En algunas realizaciones, el contacto entre una bacteriocina de epm divulgada en el presente documento y una población bacteriana diana da como resultado una disminución en la población de al menos 10, al menos 100, al menos 1000, o al menos 10.000, o más veces con relación a la ausencia de la bacteriocina. En otras realizaciones, el contacto puede dar como resultado una disminución en la detectabilidad de la bacteria en al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, o al menos 50, o más veces con relación a la ausencia de la bacteriocina.

Una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética de la divulgación puede administrarse a cualquier sujeto afectado con, diagnosticado como afectado con, o que se sospecha que está afectado con, una infección o contaminación por bacterias susceptibles a la bacteriocina de epm. Los ejemplos no limitantes de dicho sujeto incluyen especies de animales (mamíferos, reptiles, anfibios, aves y peces) así como insectos, plantas y hongos. Los ejemplos representativos y no limitantes de especies de mamíferos incluyen seres humanos; primates no humanos; especies agrónomicamente importantes, tales como ganado, cerdos, cabras y ovejas; roedores, tales como ratones y ratas; mamíferos de compañía, exposición, o espectáculo, tales como perros, gatos, cobayas, conejos y caballos; y mamíferos para trabajo, tales como perros y caballos. Los ejemplos representativos y no limitantes de especies de aves incluyen pollos, patos, ocas y pájaros de compañía o espectáculo, tales como loros y periquitos. Un sujeto animal tratado con una bacteriocina diseñada por ingeniería genética de la divulgación también puede ser un cuadrúpedo, un bípedo, un animal acuático, un vertebrado, o un invertebrado, incluyendo insectos.

En algunas realizaciones, el sujeto que va a tratarse es un niño humano u otro animal joven que aún no ha alcanzado la madurez. Por lo tanto, la divulgación incluye el tratamiento de afecciones pediátricas que comprenden la infección con bacterias u otros microorganismos susceptibles a una bacteriocina de epm de la divulgación.

5 La divulgación también proporciona el tratamiento o prevención de una infección oportunista, tal como aquella resultante del crecimiento no deseado de bacterias que están presentes en la flora microbiana de un sujeto humano o un animal no humano. Una infección oportunista puede ser el resultado de una afección inmunosuprimida en un sujeto o el resultado de un tratamiento antibiótico que altera la flora comensal del tracto genitourinario (GU) o gastrointestinal (GI). Por lo tanto, la divulgación también proporciona el tratamiento o profilaxis de sujetos inmunosuprimidos y sujetos expuestos a otros agentes farmacéuticos. Una bacteriocina de epm con su actividad antibacteriana puede usarse en combinación con otro agente antibacteriano o antimicrobiano, tal como un agente antibiótico o antifúngico como ejemplos no limitantes. Un "agente antimicrobiano" es un agente o compuesto que puede usarse para inhibir el crecimiento de, o para eliminar, organismos unicelulares. Los agentes antimicrobianos incluyen antibióticos, agentes quimioterapéuticos, anticuerpos (con o sin complemento), inhibidores químicos de la síntesis o funciones de ADN, ARN, proteínas, lípidos o pared celular.

15 En algunas realizaciones, una bacteriocina de epm se formula con un excipiente o vehículo "farmacéuticamente aceptable". Dicho componente es uno que es adecuado para su uso con seres humanos, animales y/o plantas sin efectos secundarios adversos indebidos. Los ejemplos no limitantes de efectos secundarios adversos incluyen toxicidad, irritación y/o respuesta alérgica. El excipiente o vehículo es uno típicamente que está compensado con una relación beneficio/riesgo razonable. En muchas realizaciones, el vehículo o excipiente es adecuado para administración tópica o sistémica. Los vehículos no limitantes farmacéuticos incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas y no acuosas. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, excipientes farmacéuticos convencionales, tales como solución de suero salino tamponado con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo medios salinos y tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, aceite de Ringer lactado o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen refuerzos de nutrientes y fluidos, refuerzos de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares.

30 Las formulaciones y composiciones farmacéuticas adicionales divulgadas en el presente documento comprenden una bacteriocina de epm aislada específica para un hospedador bacteriano; una mezcla de dos, tres, cinco, diez, o veinte o más bacteriocinas que se dirigen a los mismos hospedadores bacterianos; y una mezcla de dos, tres, cinco, diez, o veinte o más bacteriocinas que se dirigen a diferentes hospedadores bacterianos o a diferentes cepas del mismo hospedador bacteriano.

35 Opcionalmente, también puede liofilizarse una composición que comprende una bacteriocina de epm de la divulgación usando medios bien conocidos en la técnica. La reconstitución y uso posterior puede ponerse en práctica tal como se conoce en la técnica.

También se proporcionan formulaciones que comprenden bacteriocinas epm microencapsuladas. En algunas realizaciones, estas pueden proporcionar una cinética de liberación sostenida o permitir la ingestión oral para que pasen a través del estómago y al intestino delgado o grueso. En general, las composiciones farmacéuticas pueden prepararse en diversas formas, tales como gránulos, comprimidos, píldoras, supositorios, cápsulas (por ejemplo, adaptadas para administración oral), microgránulos, microesferas, liposomas, suspensiones, salvas, pastas, lociones y similares. Pueden usarse vehículos y/o diluyentes orgánicos o inorgánicos de grado farmacéutico para uso oral y tópico para preparar composiciones que comprenden a los compuestos terapéuticamente activos. También pueden incluirse agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la presión osmótica, o tampones para asegurar un valor de pH adecuado.

50 Una bacteriocina de epm se usa típicamente en una cantidad o concentración que es "segura y eficaz", que se refiere a una cantidad que es suficiente para producir una respuesta terapéutica deseada sin efectos secundarios adversos indebidos, tales como aquellos descritos anteriormente. Una bacteriocina de epm también puede usarse en una cantidad o concentración que sea "terapéuticamente eficaz", que se refiere a una cantidad eficaz para proporcionar una respuesta terapéutica deseada, tal como, pero sin limitación, una cantidad eficaz para frenar la velocidad de división celular bacteriana, o para provocar el cese de la división celular bacteriana, o para provocar la muerte o disminuir la velocidad de crecimiento de población de las bacterias. La cantidad segura y eficaz o la cantidad terapéuticamente eficaz variarán con diversos factores, pero puede determinarse fácilmente por el practicante experto sin experimentación indebida. Los ejemplos no limitantes de factores incluyen la afección particular que se esté tratando, el estado físico del paciente, el tipo de sujeto que se esté tratando, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (en caso de haberla) y las formulaciones específicas empleadas.

60 Además y anticipándose a la aparición de resistencia bacteriana a una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética, puede haber un compromiso de la virulencia o aptitud del organismo donde la bacteriocina se dirige al factor de virulencia o aptitud de la bacteria usada como diana. Debido al mecanismo principal pero no limitante

mediante el cual una bacteria puede hacerse resistente a una bacteriocina de epm es la pérdida de su receptor para la bacteriocina, el uso de un factor de virulencia o aptitud tal como se divulga en el presente documento como diana proporciona muchas ventajas frente a los antibióticos y bacteriófagos tradicionales. La resistencia a los antibióticos y bacteriófagos tradicionales puede ser el resultado de muchos mecanismos distintos de la pérdida del receptor o molécula diana para el agente antibacteriano. Como ejemplos no limitantes, una bacteriocina de epm de la divulgación no sería objeto de una bomba de salida bacteriana para eliminar la bacteriocina del ambiente celular y no sería objeto de un mecanismo de desactivación de ácido nucleico bacteriano.

Habiendo descrito de manera general la materia objeto de la invención, esta se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la divulgación, a menos que se especifique.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar, pero no para limitar la materia objeto reivindicada.

#### Ejemplo 1: Bacteriocinas epm modificadas que contienen una proteína de fusión

##### a) Sistema de complementación

Para facilitar la preparación de una bacteriocina de epm modificada tal como se describe en el presente documento, se estableció la construcción de un sistema para complementar las fibras caudales *in trans*. Usando la piocina R2 como modelo representativo, se usó la creación de una eliminación de la secuencia codificante *prf15* de R2 en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1 para crear una plataforma en la que se expresó una proteína de fibra caudal complementaria, tal como un producto génico de *prf15* modificado, *in trans*.

Generalmente, la eliminación se efectuó mediante el método de Hoang et al. para crear la cepa  $\Delta prf15$  de *P. aeruginosa* PAO1. La región codificante de *prf16*, SEC ID N°: 4, para la chaperona de R2 se superpone al gen *prf15* de R2 en 8 nucleótidos y el sitio de unión a ribosoma se encuentra dentro de la región codificante de *prf15*, SEC ID N°: 3. La proteína Prf16, que no se incorpora necesariamente en la estructura de la piocina, se comunicó como necesaria para actividad máxima, para el ensamblaje de la fibra caudal trimérica (Figura 8 y Nakayama et al., 2000). Por lo tanto, se dejaron intactos tanto el sitio de inicio de la transcripción para *prf16* como su sitio de unión a ribosoma de tal forma que la chaperona se produciría tras la inducción de la construcción de piocina modificada que codifica una piocina defectuosa "sin cola".

En resumen, se efectuó una eliminación de los codones 11-301 en fase de PRF15 en PAO1 del modo siguiente. Se amplificó un fragmento de KpnI-AgeI de 1,1 kb cadena arriba de la eliminación mediante PCR a partir de ADN genómico de PAO1 usando los cebadores AV085 (5'-GCTTCAATGTGCAGCGTTTGC) (SEC ID N°: 46) y AV088 (5'-GCCACACCGGTAGCGGAAAGGCCACCGTATTTCCGGAGTAT) (SEC ID N°: 47) y se amplificó un fragmento de AgeI-EcoRI de 2,2 kb usando los cebadores AV087 (5'-ATACTCCGAAATACGGTGGCCTTTCCGCTACCGGTGTGGC) (SEC ID N°: 48) y AV086 (5'-TCCTTGAATTCCGCTTGCTGCCGAAGTTCTT) (SEC ID N°: 49). Los fragmentos de restricción resultantes se clonaron en los sitios de KpnI y EcoRI de pEX18Gm (Hoang et al) para producir pEXGm- $\Delta prf15$ . La construcción terminada se transformó en una cepa de PAO1 mediante electroporación (Chuanchuen et al). Se seleccionaron los integrantes con gentamicina 100  $\mu$ g/ml y los segregados se seleccionaron posteriormente en medios que contenían sacarosa 5  $\mu$ g/ml y que carecían de NaCl y gentamicina. Los candidatos de eliminación se confirmaron mediante análisis PCR, inducción de piocinas y secuenciación de un fragmento amplificado mediante PCR.

La cepa PAO1  $\Delta prf15$  crece de manera similar a la de su cepa parental, PAO1 y los genes codificantes de piocina permanecen inducibles a través de la respuesta SOS, que da lugar a la lisis de la célula. Aunque parece haber algo de producción de los productos génicos de piocina, no pareció haber producción de partículas de piocina "sin cola" a partir de PAO1  $\Delta prf15$ .

La piocina R2 *Prf15* se expresó *in trans* clonando en primer lugar la secuencia codificante en el vector lanzadera de *Pseudomonas/E. coli* de amplio intervalo de hospedador, pUCP30T. Véase la Figura 9. En algunas construcciones iniciales, la transcripción se dirigió de manera constitutiva o bajo el control de *lacI* a partir del promotor *tac*. Pero en otras construcciones, se modificó la transcripción para que estuviese regulada con un promotor endógeno de *prf15* de tal forma que la expresión estuviese regulada a través de la respuesta SOS. Esto permitió la expresión del gen *prf15* modificado para que se indujese de manera sincronizada con la expresión de los otros genes de piocina residentes en el genoma de PAO1  $\Delta prf15$ .

En resumen, se modificó el vector de amplio intervalo de hospedador pUCP30T (Schweizer, H.P et al) rellenando el sitio único para BspHI para formar pUCP30T $\Delta$ Bsp. Se amplificó un promotor *tac* mediante PCR a partir de un vector de expresión de Mtd (un presente de Jeffery F. Miller, UCLA) usando los cebadores AV110 (5'-TTTATTAGCGGAAGGCCGACTGCACGGTGCACCAATG) (SEC ID N°: 50) y AV114 (5'-CCCTCGAATTCATGAACTGTTTCTGTGTGAAATTG) (SEC ID N°: 51) y después se clonó en pUCP30T $\Delta$ Bsp para crear pUCP-tac.

La región codificante de PRF15 de R2 se amplificó a partir de un subclon usando los cebadores AV118 (5'-CTTCCTTTCATGACGACCAATACTCCGAA) (SEC ID N°: 52) y AV 116 (5'-ACCACGAATTCTTCATCGTCCAAATGCCTC) (SEC ID N°: 53), mientras que los *prf15* y *prf16* de R2 se amplificaron usando los cebadores AV118 y AV086 (5'-TCCTTGAATTCCGCTTGCTGCCGAAGTTCTT) (SEC ID N°: 49). Los fragmentos amplificados de *prf15* y *prf15/16* se clonaron en pUCPtac digerido con BspHI y EcoRI para producir pUCP-tac-*prf15* y PUCP-tac-*prf15/16*.

Para la expresión usando el promotor endógeno de *prf15*, se amplificaron *prf15* y *prf16* junto con la secuencia de 1088 pb cadena arriba de *prf15* a partir de un subclon usando los cebadores AV107 (5'-CACCATCTAGACAATACGAGAGCGACAAGTC) (SEC ID N°: 54) y AV091 (5'-TCCTCAAGCTTACGTTGGTTACCGTAACGCCGTG) (SEC ID N°: 55) y se clonaron en pUCP30T digerido con XbaI y HindIII para crear pUCP-R2p-*prf15/16*.

Las bacterias en crecimiento en suspensión en fase logarítmica y que contenían los plásmidos de expresión se trataron con 3 µg de mitomicina C/ml para inducir la producción de piocina. Se produjeron piocinas estables tras la inducción con rendimientos similares a los de PAO1 de tipo silvestre. Las piocinas tenían el mismo espectro bactericida y nivel de actividad que la piocina de R2 producida a partir de PAO1. Parece que la producción de una piocina estable compleja requiere la expresión de una proteína de fibra caudal además de la expresión de los otros genes codificantes de piocina y es suficiente la expresión de los genes de fibra caudal *in trans*.

Cuando se expresó *prf15* de manera constitutiva a partir del promotor *tac*, el crecimiento celular fue destacadamente más lento que cuando se reguló mediante *lacI* o el promotor endógeno. Aunque parece que la producción de PRF15 solo en la célula es perjudicial, los rendimientos de piocinas generadas a partir de ambos promotores son comparables.

Se preparó una construcción de plásmido a partir de la cual se expresó conjuntamente *prf16* de R2 con *prf15* de R2 para asegurar la expresión temporal adecuada de *prf16* para el plegamiento de PRF15 expresada *in trans*.

#### b) Bacteriocinas epm recombinantes

Tal como se describe en el presente documento, se han reconocido cinco piocinas de tipo R diferentes, basándose en sus espectros y se han denominado R1-5. Debido a que las secuencias génicas que codifican las proteínas de fibra caudal solo se conocían para R1 (SEC ID N°: 1) y R2 (SEC ID N°: 3), se usó PCR para aislar y secuenciar genes de fibra caudal de piocina de R3 (SEC ID N°: 5), R4 (SEC ID N°: 7) y R5 (SEC ID N°: 9) junto con su chaperona afín presente en sus cepas productoras, SEC ID N°: 6, 8 y 10, respectivamente. Los genes de chaperona de las piocinas R1 y R2 también se clonaron y secuenciaron, SEC ID N°: 2 y 4, respectivamente. Para confirmar la hipótesis de que la fibra caudal dicta el espectro, se obtuvieron y expresaron las proteínas de fibra caudal de piocina R1, R3, R4 y R5 *in trans* en PAO1  $\Delta$ *prf15* de tal forma que se incorporarían en la estructura de piocina R2. Cada una de las cepas recombinantes resultantes se indujeron para producir piocinas y se determinó el espectro de cada una mediante ensayos de puntos, tal como se muestra en las Figuras 2 y 8.

#### c) Proteínas de fusión como proteínas de fibra caudal

Se creó una fusión del gen de fibra caudal de R2, *prf15*, y de secuencias de gen *H* de P2, se expresó y se usó para producir bacteriocinas epm adicionales de la divulgación. El bacteriófago P2, que infecta a muchas cepas de *E. coli*, tiene un gen *H* codificante de fibra caudal, (SEC ID N°: 25) que tiene una similitud de secuencia significativa con *prf15* de R2 (SEC ID N°: 3), particularmente en la región codificante en el extremo N-terminal. La porción del gen *H* que codifica los 551 restos de aminoácidos C-terminales de la proteína de fibra caudal de P2, que es la región supuesta que confiere especificidad de diana (RBD), se fusionó a la porción de *prf15* que codifica la región de placa base de unión (BPAR) de 164 aminoácidos N-terminales de R2 PRF15 para codificar una proteína de fibra caudal modificada (SEC ID N°: 27).

El bacteriófago P2 también codifica una supuesta chaperona de fibra caudal, codificada por el gen *G* (SEC ID N°: 26), similar a la codificada por *prf16* de piocina R2 (SEC ID N°: 4) y las chaperonas de muchos de los otros fagos de *myoviridae*. Debido a que es probable que la chaperona codificada por el gen *G* sea importante para el plegamiento de la porción C-terminal de la proteína de fibra caudal de P2 en la fusión, se produjeron construcciones para expresar conjuntamente el gen *G* de P2.

Se amplificó la porción de aminoácidos 1-164 codificantes de *prf15* de R-2 a partir de un subclon usando los cebadores AV 118 y AV 127 (5'-TTCTTTAAGCTTTTCCTTCACCCAGTCCTG) (SEC ID N°: 56) y se digirió con BspHI y HindIII. La porción del gen *H* de P2 que codifica los aminoácidos desde la posición 158-669 se amplificó a partir de una reserva de fago P2 (Richard Calendar) usando los cebadores AV124 (5'-CCTCCTGAATTCTTATTGCGGCATTTCGG) (SEC ID N°: 57) y AV126 (5'-TCCTTGAATTCTTACACCTGCGCAACGT) (SEC ID N°: 58). El gen *H* de P2 158-669 más el gen *G* se amplificaron usando los cebadores AV124 y AV125 (5'-CCTCCTGAATTCTTATTGCGGCATTTCGG) (SEC ID N°: 59). Cada uno de los productos de PCR de P2 se digirió con HindIII y EcoRI. Se creó pUCP-tac-R2-P2H clonando el fragmento de *prf15* que codifica el fragmento de 1-164 aminoácidos junto con el fragmento del gen *H* de P2 que codifica el fragmento de 158-669 aminoácidos en pUCP-tac digerido con BspHI y EcoRI. pUCP-tac-R2-P2HG se generó

clonando el fragmento de *prf15* que codifica el fragmento de 1-164 aminoácidos junto con el fragmento de gen *H* de P2 que codifica el fragmento de 158-669 aminoácidos más el gen *G* en pUCP-tac digerido con BspHI y EcoRI.

En resumen, se transformó PAO1  $\Delta prf15$  con las construcciones de *prf15-gen H de P2* y se indujo la producción de piocina con mitomicina C. Las partículas de piocina se purificaron y ensayaron respecto de su actividad mediante pruebas puntuales y mediante el ensayo de supervivencia bacteriana (véase la Figura 2). Las partículas de piocina purificadas que contenían la fibra caudal de fusión de R2-P2 tenían actividad bactericida frente a la cepa de *E. coli* Cla pero fueron incapaces de eliminar a la cepa de *P. aeruginosa* 13s. Además, se necesitó la expresión del gen *G* de P2 para producir piocina activa. Esto apoya a la hipótesis de que la chaperona es necesaria para un plegamiento adecuado de la porción C-terminal de la fibra caudal, tal como se muestra en la Figura 8.

- 10 Las capacidades de un rango de diferentes proteínas de fusión de fibra caudal de R2-P2 para formar piocinas que eliminasen a *E. coli* C1a se exploraron mediante una serie de diferentes fusiones de R2-P2. Los ejemplos representativos de estas fusiones se muestran en las Figuras 4-7, junto con la indicación de sus actividades bactericidas frente a *E. coli* C1a.

#### d) Fusiones adicionales

- 15 Se ha producido una bacteriocina de epm modificada adicional para que se dirija a *Y. pestis*. L-413c es un yersiniófago que infecta a la mayoría de cepas de *Y. pestis* (Richard Calendar, comunicación personal). La mayoría del genoma de L-413c es altamente similar a P2 con la excepción destacable del gen de fibra caudal *H*, SEC ID N°: 28, que ha divergido considerablemente. Sin quedar ligados a la teoría y ofrecidos para mejorar la comprensión de la divulgación, la variación del gen de fibra caudal *H* y por lo tanto de la proteína codificada, es la característica que con más probabilidad explica su gama de hospedador diferente.

- 20 El extremo N-terminal del gen *H* de L-413c (SEC ID N°: 28), sin embargo, comparte una similitud de secuencia considerable con su homólogo de P2 (SEC ID N°: 25), probablemente debido a su función de unión a placa base. Se construyó una fusión para crear una proteína de fusión de fibra caudal con los aminoácidos 1-164 N-terminales de PRF15 de R2 fusionados a la porción C-terminal (posiciones 158-913) de la fibra caudal de L-413c para crear una fibra caudal modificada, tal como se muestra en la Figura 10 (SEC ID N°: 30). La fusión se expresó en PAO1  $\Delta prf15$  junto con la chaperona afín de fibra caudal de L-413c, gen *G* (SEC ID N°: 29), tal como se describe anteriormente. Después de la inducción, las partículas de piocina producidas eliminaron a *Y. pestis* KIM así como a *E. coli* C y por lo tanto tienen un espectro de eliminación análogo a la gama de hospedador del yersiniófago L-413c. Las piocinas modificadas no eliminaron a ninguna de las cepas de *Pseudomonas*.

- 30 Se ha producido una partícula de piocina epm adicional con una nueva fibra caudal de fusión creada entre el BPAR de piocina de tipo R de *P. aeruginosa* (codificado por *prf15*) y el gen de fibra caudal *orf34* y/o el RBD del gen de fibra caudal *orf35* de VHML (SEC ID N°: 21 Y 22, respectivamente). Para crear las partículas de piocina, el gen de chaperona afín de VHML (SEC ID N°: 23) se expresó de manera conjunta con los genes de fusión de fibra caudal modificados. Se formaron y analizaron piocinas con las fibras caudales modificadas. La bacteriocina de epm modificada resultante con el RBD derivado de VHML puede someterse a diversificación mediante el DGR natural de VHML.

- 40 El determinante principal de tropismo (Mtd) del bacteriófago BPP-1 de *Bordetella* tiene un dominio de lectina de tipo C (CTL), que sirve como determinante de unión para muchos tipos diferentes de moléculas y en muchos contextos biológicos diferentes (Drickamer, 1999; McMahon et al., 2005). En BPP-1, Mtd se incorpora como un dominio globular homotrimérico localizado en el extremo de la cola del fago, donde puede unirse a la proteína de superficie, pertactina, un factor de virulencia expresado sobre la superficie externa de *Bordetella bronchiseptica* y *Bordetella pertussis* (Liu et al., 2004). En este contexto, Mtd también es la diana de la mutagénesis de hospedador mediada por fago, que puede dar como resultado que el bacteriófago adquiera un nuevo determinante de unión para infectar a su hospedador continuamente cambiante.

- 45 Estudios estructurales recientes del dominio Mtd y de varias de sus variantes diversificadas, han demostrado cómo la punta de la fibra trimérica forma un andamio rígido que puede contener más de 10 trillones de ligandos de variantes (McMahon et al. 2005). Al fusionar el dominio Mtd a la proteína de fibra caudal de la piocina y después diversificar el dominio Mtd usando el sistema de DGR descrito por Miller y colaboradores (Liu et al., 2004; Doulatov et al., 2004), se crea una gran biblioteca de variantes, a partir de la cual se seleccionan y obtienen los genes que codifican colas de piocina con especificidad de unión alterada.

### Ejemplo 2: Ensayos de proteínas de fusión

#### a) Purificación de piocina y ensayos

- 55 Se cultivaron PAO1 y derivados agitando a 200 rpm a 37°C en medio G suplementado con gentamicina 50 µg/ml cuando se necesitó para mantener los plásmidos. Cuando los cultivos alcanzaron una DO600 de 0,250, se añadió mitomicina C a una concentración final de 3 µg/ml. Los cultivos se incubaron durante 2,5 horas adicionales hasta que se produjo la lisis. Se añadieron cinco µl de DNasa1 y se dejó incubar el cultivo durante 30 minutos adicionales. Los restos se retiraron mediante centrifugación a 12.000 rpm en un rotor Beckman JLA-16.250 durante 1 hora. Se

añadió lentamente sulfato de amonio saturado, a una velocidad de 1 ml/min, al sobrenadante agitado sobre hielo, hasta un volumen final añadido de 65 ml por 100 ml de sobrenadante del lisado. Esto se almacenó a 4 °C durante toda la noche. El precipitado de sulfato de amonio se recogió mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 1 hora y se resuspendió el precipitado en 10 ml de tampón TN50 (tris 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5). Las partículas de piocina en la solución resuspendida se sedimentaron entonces a alta velocidad, 20.000 rpm (65.000 x g) en un rotor Beckman JA-25.50 durante 1 hora y se resuspendieron en 3-5 ml de tampón TN50. Las preparaciones de piocina se consideraron como >90% puras mediante electroforesis en gel de SDS poliacrilamida.

Se llevaron a cabo ensayos cuantitativos de piocina contando la supervivencia bacteriana en un método ligeramente modificado, tal como se describe por Kagayama et al., 1964. Las muestras de piocina se incubaron con bacterias diana (aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC/ml) durante 40 minutos a 37°C. Después se diluyeron las muestras y se emplacaron para contar a los supervivientes. El número de partículas de piocina están relacionados con la fracción de supervivientes bacterianos en una distribución de Poisson,  $m = -\ln S$ , donde  $m$  = el número medio de sucesos letales/célula y  $S$  es la fracción de supervivientes. El número total de partículas de piocina activa/ml =  $m \times$  células/ml. La cepa 13s fue la *Pseudomonas aeruginosa* usada en estos ensayos y es un aislado clínico resistente a muchos antibióticos, pero sensible a todas las 5 piocinas de tipo R. La diana de *E. coli* fue C1a, amablemente proporcionada por Richard Calendar.

Se llevaron a cabo también ensayos semicuantitativos mediante un método puntual donde las muestras de piocina se diluyeron en serie en tampón TN50 y se puntearon sobre tiras de bacterias diana. Después de una incubación durante toda una noche a 37°C, se pudo observar la actividad de la piocina mediante una zona clara de eliminación en la tira. La Figura 2 muestra resultados representativos de este formato de ensayo.

### Ejemplo 3: Bacteriófago recombinante para explorar fibras caudales diseñadas por ingeniería genética

El bacteriófago P4 se usa como subrogado para portar el gen de fusión de fibra caudal basado en Prf15 de tal forma que el genotipo está acoplado al fenotipo de unión de la fibra caudal. Esto permite una selección y transducción eficaz del gen de fibra caudal deseado.

El bacteriófago P2 es un colifago de temperatura que puede infectar a otras especies entéricas y puede replicarse en, pero no infectar a, *P. aeruginosa* (Bertani y Six, 1988; Kahn et al., 1991). Las piocinas de tipo R están estrechamente relacionadas genéticamente y estructuralmente a P2 y la proteína de fibra caudal de P2, codificada por el gen *H*, muestra homología con *prf15* en la porción N-terminal, donde sucede la unión de la placa base (Haggard-Ljungquist et al., 1992; Nakayama et al., 2000). Al desplegar el bacteriófago P2 o P4 como fago subrogado, en el que se incorporan fibras caudales codificadas por plásmido en lugar de las fibras codificadas por fago P2, se permite la presentación y selección de fibras de fusión en un contexto que se asemeja estrechamente a su contexto funcional previsto en la piocina.

El genotipo de fibra caudal puede acoplarse físicamente al fenotipo de unión en una partícula de fago transductor para selección genética, similar a la tecnología de presentación en fagos. Cuando un fago P2 con una mutación ámbar en su gen de proteína de fibra (*H*) infecta a una *E. coli* que porta un plásmido con un sitio de empaquetado *cos*, que normalmente actúa como una señal para empaquetar el ADN genómico del bacteriófago (Ziermann y Calendar, 1991; Kahn et al., 1991), ésta empaquetará al plásmido que contiene *cos* en las cabezas de fagos P2 nuevamente sintetizados. El plásmido codifica y expresa gen de fusión de cola basado en *prf15* y confiere resistencia a gentamicina. La fibra caudal de fusión expresada a partir del plásmido en la *E. coli* infectada por P2 se incorpora en el bacteriófago P2 en lugar del producto génico de *H* defectuoso (truncado ámbar) (proteína de fibra caudal de P2). Tras la lisis de la bacteria, las partículas transductoras basadas en P2 liberadas portan el plásmido que contiene *cos* que contiene el gen de fusión de cola basado en *prf15* en vez del genoma de P2 y posee fibras caudales de fusión de Prf15 en vez de fibras caudales de P2.

La transducción de partículas de fago con la capacidad para unirse a células y activar el mecanismo de inyección del bacteriófago confiere entonces resistencia a gentamicina a las bacterias usadas con éxito como diana, a partir de las cuales se aísla el gen de fusión de fibra seleccionado a partir del plásmido después de la replicación de las bacterias con selección de gentamicina. El gen de fibra caudal en los plásmidos se manipula además fácilmente para crear uniones de fusión y para diversificar el RBD para rediseñar y optimizar la función del RBD de fibra caudal.

Esta estrategia también supera muchas de las dificultades impuestas por la presentación C-terminal de una proteína trimérica cuando se usan sistemas de presentación en fago convencionales (Held y Sidhu, 2004). El bacteriófago P2 tiene fibras caudales que se asemejan genética y morfológicamente a las de las piocinas (Nakayama et al., 2000). Las fibras caudales se unen a las placas base de P2 y piocinas a través de sus extremos N-terminales y hay una similitud de secuencia significativa de los extremos N-terminales de las fibras caudales de P2 y piocina R2 (Nakayama et al., 2000; Haggard-Ljungquist et al., 1992). Además, el gen de la fibra caudal del fago relacionado con P2, PS17, puede complementar al gen de fibra caudal de piocina R2, *prf15* (Shinomiya, 1984; Shinomiya e Ina, 1989).

Como alternativa, el RBD se fusiona directamente al dominio N-terminal del gen *H* de la fibra caudal, o a los genes de fibra caudal de fago VHML de *Vibrio harveyi* (que al igual que BPP-1 también contienen un DGR funcional) se

fusiona al dominio N-terminal del gen H de P2.

#### Ejemplo 4: Métodos para recuperar el gen de fibra caudal deseado

Un bacteriófago P2, P4 o  $\Phi$ CTX que porta un gen de fibra caudal modificado por ingeniería genética actúa como subrogado para acoplar el genotipo de fibra caudal de piocina al fenotipo de unión. Al seleccionar o explorar fenotipos de unión específicos a partir de las bibliotecas diversificadas o mutadas de los genes de fibra caudal portados en bacteriófagos subrogados, se pueden aislar los genes de fibra caudal que codifican una especificidad de unión deseada. La selección puede llevarse a cabo mediante ciclos únicos o múltiples de enriquecimiento adsorbiendo los bacteriófagos subrogados o transduciendo partículas en moléculas diana en fase sólida, bien eliminado primero los de unión no deseados y después aislando, de entre los subrogados restantes, aquellos que se unen a las moléculas diana previstas, o *vice versa*. Como alternativa, la selección puede suceder aplicando cualquier etapa de unión individualmente. En último lugar, el subrogado que muestra el fenotipo de unión deseado puede someterse a extracción y aislamiento de ADN del gen de fibra caudal portado clonando fragmentos de enzimas de restricción o mediante reacciones PCR usando cebadores oligonucleotídicos que se unen a secuencias de ADN específicas periféricas a la porción diversificada del gen de fibra caudal.

El bacteriófago subrogado deseado puede purificarse en placa o en una tira de bacterias que expresan la diana molecular de interés, por ejemplo, un factor de virulencia o aptitud mediante el cual los bacteriófagos subrogados infectan al hospedador. Las bacterias que expresan el factor pueden ser el patógeno de interés, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, o un no patógeno, por ejemplo, *E coli* diseñada por ingeniería genética para que exprese el factor diana de virulencia o aptitud. Las técnicas de emplacado en replicado o de emplacado en serie pueden desplegarse para asegurar que el bacteriófago subrogado no forma placas en cepas bacterianas estrechamente relacionadas que no expresan el factor diana. Por ejemplo, pueden usarse mutantes de inserción de *Pseudomonas aeruginosa* que han perdido la expresión de factores de virulencia específicos para explorar o para eliminar por adsorción bacteriófagos subrogados antes o después de que formen placas sobre, o se paneen sobre, las bacterias (isogénicas) homólogas que expresan su factor de virulencia o aptitud.

Aunque los fagos subrogados o partículas de transducción no formarán placas sobre las bacterias que expresan diana, las bacterias infectadas o transducidas seguirán adquiriendo resistencia a antibióticos junto con el plásmido o fagémido portado y por lo tanto pueden crecerse de manera selectiva y posteriormente extraerse para aislar el plásmido multi-copia y su gen de fibra caudal deseado.

Estas técnicas permiten la identificación y aislamiento de bacteriófagos subrogados o partículas transductoras que muestran los fenotipos de unión específica deseados a partir de los cuales se extraen los genes específicos, no naturales deseados de fibra caudal de bacteriocina de epm. Además, la unión de subrogados a moléculas células o tejidos de mamífero puede desplegarse para eliminar de las bibliotecas cualquier gen que codifique fibras caudales que puedan causar efectos adversos si se incorporan a las bacteriocinas epm terapéuticas.

Hay disponible una biblioteca de cepas bacterianas insercionales mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* que difieren de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 elevadamente patógena solo por la ausencia de expresión de una serie de factores de virulencia específicos, uno ausente a partir de cada mutante isogénico no redundante (véase el sitio web en [ausubellab.mgh.harvard.edu/cgi-bin/pa14/home.cgi](http://ausubellab.mgh.harvard.edu/cgi-bin/pa14/home.cgi)). Estas cepas mutantes isogénicas proporcionan herramientas para asegurar la especificidad de los bacteriófagos subrogados para los factores de virulencia usados como diana y no para otras moléculas de superficie prevalentes. Por ejemplo, puede incubarse la población de bacteriófagos P4 subrogados con un cultivo de alta densidad de un mutante de *Pseudomonas aeruginosa* que carece de un factor de virulencia diana particular, para adsorber y eliminar de una población de bacteriófagos subrogados aquellos que se unen a moléculas de superficie presentes tanto en el mutante isogénico como en la cepa parental. La población eliminada se enriquecerá en subrogados que se unen al factor de virulencia deseado. Una vez que los bacteriófagos subrogados que se unen e infectan a las bacterias que expresan el factor de virulencia o aptitud diana, pueden explorarse cada uno directamente respecto a su incapacidad para infectar la cepa mutante isogénica que carece del factor usado como diana. El plásmido seleccionado puede volver a empaquetarse en partículas transductoras subrogadas y reciclarse cualquier número de veces mediante el proceso de adsorción-eliminación e infección para enriquecer adicionalmente y eventualmente purificar el plásmido basado en pUC que codifica las fibras caudales deseadas para dirigirse al factor de virulencia o aptitud.

#### Ejemplo 5: Métodos para producir bacteriocinas epm diseñadas por ingeniería genética

El gen de fibra caudal se recombina bien (i) en un plásmido bajo un promotor regulado para su expresión en bacterias de producción que también portan, por ejemplo en un cromosoma bacteriano artificial (BAC), el conjunto de genes de piocina R (incluyendo los genes de endosilina) a partir de los cuales los genes residentes prtR, prtN, prf15 y holin (prf9 o PA0614) se han eliminado o de otro modo deshabilitado, o (ii) en el conjunto de piocina que contiene el vector BAC en sí, usando una reacción de intercambio alélico mediada por plásmido.

Tras la inducción de los genes de piocina y del gen de fibra caudal diseñado por ingeniería genética, tal como induciendo prtN directamente a través de un promotor regulable tal como *lac* o *tac*, las células hospedadoras sintetizan las piocinas hasta que sus nutrientes naturales se agotan y dejan de crecer (Young, Ry, 2006). Las

bacterias productoras no se lisan en ausencia de cloroformo, debido a que la inactivación del gen holin evita el acceso de endolisina citoplasmática a la pared de la célula bacteriana, lo que es necesario para la lisis celular. Las células agotadas se recogen mediante centrifugación o filtración y después se congelan hasta que se desee recoger las piocinas solubles que han rellenado el citoplasma celular. Tras descongelar, se rompe la membrana celular interna, liberando endolisina para lisar las bacterias y de este modo liberar la recolección de piocinas modificadas. La rotura de las membranas celulares puede acelerarse o completarse en caso necesario mediante la adición de pequeñas cantidades de cloroformo al disolvente acuoso en el que se descongela la pasta bacteriana.

### Referencias

- Ackermann HW. 2003. Bacteriophage observations and evolution. *Res Microbiol.* 154:245-251
- 10 Aiache JM, S Meski, E Beyssac, G Serpin. 1997. The formulation of drug for ocular administration. *J Biomater Appl.* 11:329-48
- Anantharaman et al. "Application of comparative genomics in the identification and analysis of novel families of membrane-associated receptors in bacteria." *BMC Genomics*, 4:34, 2003
- 15 Bad Bugs, No Drugs: As Antibiotic Discovery Stagnates A Public Health Crisis Brews, July 2004. *Infectious Diseases Society of America*
- Beisel KW, LD Hazlett, RS Berk. 1983. Dominant susceptibility effect on the murine corneal response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Soc Exp Biol Med.* 172:488-491
- Bertani LE, y EW Six. 1988. The P2-like phages and their parasite, P4. In R. Calendar (ed.), *The Bacteriophages*, vol. 2. Plenum Publishing Corp., New York. pp 73-143
- 20 Birmingham VA, PA Pattee. 1981. Genetic Transformation in *Staphylococcus aureus*: Isolation and Characterization of a Competence-Confering Factor from Bacteriophage 80 $\alpha$  Lysates. *Journal of Bacteriology* 148:301-307
- Blackwell CC, y Law JA. 1981. Typing of non-serogroupable *Neisseria meningitidis* by means of sensitivity to R-type pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect.* 3(4):370-8.
- 25 Blackwell CC, FP Winstanley, WA Telfer-Brunton. 1982. Sensitivity of thermophilic campylobacters to R-type pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med Microbiology.* 15:247-51
- Bonev et al. "Targeting extracellular pyrophosphates underpins the high selectivity of nisin." *The FASEB Journal.* 18:1862-1869, 2004
- Burda MR, Miller S. Folding of coliphage T4 short tail fiber in vitro. Analysing the role of a bacteriophage-encoded chaperone. *Eur J Biochem.* 1999 Oct;265(2):771-8.
- 30 Burns RP. 1969. *Pseudomonas aeruginosa* keratitis: mixed infections of the eye. *Am J Ophthalmol.* 67:257-262
- Calamita, "The *Escherichia coli* aquaporin-Z water channel." *Molecular Microbiology* 37(2):254-262, 2000
- Chappell JD, AE Prota, TS Dermody, T Stehle. 2002. The crystal structure of reovirus attachment protein  $\sigma$ 1 reveals evolutionary relationship to adenovirus fiber. *The EMBO Journal* 21:1-11
- 35 Cheng KH, SL Leung, HW Hoekman. 1999. Incidence of contact lens-associated microbial keratitis and its related morbidity. *Lancet.* 354:181-185
- Choi HK, JB Gaynor, KG White, C Lopez, CM Bosio, RR Karkhoff-Schweizer, HP Schweizer. 2005. A T-7 based broad-range bacterial cloning and expression vector. *Nature Methods.* 2:443-448
- Chuanchuen, R, Narasaki, C.T. y Schweizer, H.P., Benchtop and microcentrifuge preparation of *Pseudomonas aeruginosa* competent cells, *BioTechniques* 33:760-763 (October 2002).
- 40 Coetzee HL, HC De Klerk, JN Coetzee, JA Smit. 1968. Bacteriophage-tail-like particles associated with intra-species killing of *Proteus vulgaris*. *J Gen Virol.* 2:29-36.
- Cole N, MDP Willcox, SMJ Fleiszig. 1998. Different Strains Of *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated From Ocular Infections Or Inflammation Display Distinct Corneal Pathologies In An Animal Model. *Curr Eye Res.* 17:730-735
- Cooper RL, IJ Constable. 1977. Infective keratitis in soft contact lens wearers. *Br J Ophthalmol.* 61:250-254
- 45 Cowell BA, C Wu, SMJ Fleiszig. 1999, Use of an Animal Model in Studies of Bacterial Corneal Infection. *Inst Lab Animal Res J.* 40:43-50
- Desplats C, Krisch HM. The diversity and evolution of the T4-type bacteriophages. *Res Microbiol.* 2003 May; 1

- 54(4):259-67.
- Doulatov S, A Hodes, L Dai, N Mandhana, M Liu, R Deora, RWSimons, S Zimmerly, JF Miller. 2004. Tropism switching in Bordetella bacteriophage defines a family of diversity-generating retroelements. *Nature*. 431:476-481
- 5 Drickamer K. 1999. C-type lectin-like domains. *Current Opinion in Structural Biology*. 9:585-590 Farmer JJ, LG Herman. 1969.
- Dyke J, Berk R S. Growth inhibition and pyocin receptor properties of endotoxin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1974;145:1405-1408.
- Epidemiologic Fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* by the Production of and Sensitivity to Pyocin and Bacteriophage. *Applied Microbiol*. 18:760-765
- 10 Filiatrault MJ, Munson RS Jr, y Campagnari AA. 2001. Genetic analysis of a pyocin-resistant lipooligosaccharide (LOS) mutant of *Haemophilus ducreyi*: restoration of full-length LOS restores pyocin sensitivity. *J Bacteriol*. 183(19):5756-61.
- Fleiszig SMJ, DJ Evans. 2002. The pathogenesis of bacterial keratitis: studies with *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Exp Optom*. 85.5:271-278
- 15 Gerke JR, MV Magliocco. 1971. Experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection of the mouse cornea. *Infect Immun*. 3:209-216
- Gillor, O, LM Nigro, A. Riley. 2005. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. *Curr. Pharm. Des*. 11:1067-1075
- 20 Goodman et al. "A Signaling Network Reciprocally Regulates Genes Associated with Acute Infection and Chronic Persistence in *Pseudomonas aeruginosa*." *Developmental Cell* 7:745-754, 2004
- Govan, JRW & V Deretic. 1996. Microbial Pathogenesis in Cystic Fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*, *Microbiological Reviews*. 60:539-574
- Haas H, Sacks T, Saltz N. Protective effect of pyocin against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. *J Infect Dis*. 1974 Apr;129(4):470-2.
- 25 Haggard-Ljungquist E, Halling C, Calendar R. NA sequences of the tail fiber genes of bacteriophage P2: evidence for horizontal transfer of tail fiber genes among unrelated bacteriophages. *J Bacteriol*. 1992 Mar; 174(5): 1462-77.
- Hashemolhosseini S, Montag D, Kramer L, Henning U. Determinants of receptor specificity of coliphages of the T4 family. A chaperone alters the host range. *J Mol Biol*. 1994 Aug 26;241(4):524-33.
- 30 Hazlett LD, D Rosen, RS Berk. 1976. Experimental eye infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Ophthalmic Res*. 8:311-318
- He et al. "The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes." *PNAS* 101:2530-2535, 2004
- Held H, SS Sidhu. 2004. Comprehensive Mutational Analysis of the M13 Major Coat Protein, *J Mol Biol*. 340:587-97
- 35 Hensley S, B Wysocki. As Industry Profits Elsewhere, U.S. Lacks Vaccines, Antibiotics, *The Wall Street Journal* November 8, 2005: p A1
- Higerd TB, CA Baechler, RS Berk. 1969. Morphological Studies On Relaxed and Contracted Forms of Purified Pyocin Particles. *J. Bacteriology*. 98:1378-89
- 40 Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J. y Schweizer, H.P., A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants *Gene* 212 (1), 77-86 (1998)
- Hobden JA, DS Rootman, RJ O'Callaghan, JM Hill. 1988. Iontophoretic application of tobramycin to uninfected and *Pseudomonas aeruginosa*-infected rabbit corneas. *Antimicrob Agents Chemother*. 32:978-981
- 45 Holder IA. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* Burn Infections: Pathogenesis and Treatment,. In M Campa, M Bendinelli, y H Friedman (ed.) *Pseudomonas aeruginosa* as an Opportunistic Pathogen. Plenum Press, New York, N.Y. pp. 275-295
- Iijima M. 1978. Mode of Action of Pyocin R1. *J. Biochem (Tokyo)* 83:395-402
- Ishii S, Y Nishi, y F Egami. 1965. The fine structure of a pyocin. *J. Mol. Biol*. 13:428-431

- Ito, S., Kagayama, M. y F. Egami. Isolation and characterization of pyocins from several strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 16 205-214 (1970).
- Jabrane A, Sabri A, Compere P, Jacques P, Vandenberghe I, Van Beeumen J, Thonart P Characterization of serracin P, a phage-tail-like bacteriocin, and its activity against *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Nov;68(11):5704-10.
- Jacob F. 1954. Biosynthèse induite et mode d'action d'une pyocin, antibiotique de *Pseudomonas pyocyanea*. *Annals Inst. Pasteur.* 86:149-60
- Jacobs et al. "Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*." *PNAS* 100(24):14339-14344,2003
- Kageyama M, F Egami. 1962. On the purification and some properties of a pyocin, a bacteriocin produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Life Sciences* 9: 471-6
- Kageyama M, K Ikeda, y F Egami. 1964. Studies of a pyocin. III. Biological properties of the pyocin. *J. Biochem.* 55:59-64.
- Kageyama M, Shimomiya T, Aihara Y, Kobayashi M. 1979. Characterization of a bacteriophage related to R-type pyocins. *J Virol.* 32:951-957.
- Kageyama M. 1964. Studies of a pyocin I. Physical and chemical properties. *J. Biochem.* 55:49-53
- Kageyama, M. Bacteriocins and bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa*, in: *Microbial Drug Resistance*, University Park Press, Baltimore. pp 291-305 1975.
- Kahn ML, RG Ziermann, DW Deho, M Ow, G Sunshine, R Calendar. 1991. Bacteriophage P2 and P4. *Methods Enzymol.* 204:264-280
- Kumazaki T, Y Shimizu, SI Ishii. 1982. Isolation and Characterization of Pyocin R1 Fibers. *J. Biochemistry.* 91:825-35
- Lee EJ, DJ Evans y SMJ Fleiszig. 2003. Role of *Pseudomonas aeruginosa* ExsA in Penetration through Corneal Epithelium in a Novel in vivo Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 44:5220-5227
- Lee FK, Dudas KC, Hanson JA, Nelson MB, LoVerde PT, Apicella MA. 1999 The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* C is a bacteriophage tail-like particle that contains single-stranded DNA. *Infect Immun.* 67(2):717-25.
- Liu M, M Gingery, SR Doulatov, Y Liu, A Hodes, S Baker, P Davis, M Simmonds, C Churcher, K Mungall, MA Quail, A Preston, ET Harvill, DJ Maskell, FA Eiserling, J Parkhill, y JF Miller. 2004. Genomic and Genetic Analysis of *Bordetella* Bacteriophages Encoding Reverse Transcriptase-Mediated Tropism-Switching Cassettes. *J. Bacteriology.* 186 476-481
- Mah-Sadorra JH, SG Yavuz, D M Najjar, PR Laibson, CJ Rapuano, EJ Cohen. 2005. Trends in contact lens-related corneal ulcers. *Cornea.* 24:51-58
- Matsui H, Sano Y, Ishihara H, Shinomiya T. Regulation of pyocin genes in *Pseudomonas aeruginosa* by positive (prtN) and negative (prtR) regulatory genes. *J Bacteriol.* 1993 Mar;175(5):1257-63.
- McMahon SA, JL Miller, JA Lawton, DE Kerkow, A Hodes, MA Marti-Renom, S Doulatov, E Narayanan, A Sali, JF Miller, P Ghosh. 2005. The C-type Lectin Fold as an Evolutionary Solution for Massive Sequence Variation. *Nature Struct. & Molecular Biol.* 12:886 - 892
- McNamara NA, KA Polse, SA Fukunaga, JS Maebori, RM Suzuki. 1998. Soft lens extended wear affects epithelial barrier function. *Ophthalmology.* 105:2330-2335
- Meadow, P.M., y Wells P.L. Receptor sites for R-type pyocins and bacteriophage E79 in the core part of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* PAC1. *J. Gen. Microbiol.* 108:339-343. 1978
- Merrickin DJ, Terry CS. Use of pyocin 78-C2 in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Appl Microbiol.* 1972 Jan;23(1):164-5.
- Michel-Briand, Y., y Baysse, C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie.* 2002 May-Jun;84(5-6):499-510.
- Microbial Threats To Health: Emergence, Detection, And Response, March 2003 Institute of Medicine, Washington, DC
- Mitchell et al. "Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients." *Nature Structural Biology* 9:918-921, 2002

- Morse SA, Jones BV, y Lysko PG. 1980. Pyocin inhibition of *Neisseria gonorrhoeae*: mechanism of action. *Antimicrob Agents Chemother.* 18(3):416-23.
- Morse SA, Vaughan P, Johnson D, y Iglewski BH. 1976. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by a bacteriocin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 10(2):354-62.
- 5 Mosig G y F Eiserling. 2006. T4 and Related Phages: Structure and Development, en *The Bacteriophages*. Calendar, R. ed. Second edition, Oxford University Press, NY, NY. pp225-267
- Nakayama K, Kanaya S, Ohnishi M, Terawaki Y, Hayashi T. The complete nucleotide sequence of phi CTX, a cytotoxin-converting phage of *Pseudomonas aeruginosa*: implications for phage evolution and horizontal gene transfer via bacteriophages. *Mol Microbiol.* 1999 Jan;31(2):399-419.
- 10 Nakayama K, Takashima K, Ishihara H, Shinomiya T, Kageyama M, Kanaya S, Ohnishi M, Murata T, Mori H, Hayashi T. The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Mol Microbiol.* 2000 Oct;38(2):213-31.
- Papanikolopoulou K, V Forge, P Goeltz, y A Mitraki. 2004. Formation of Highly Stable Chimeric Trimers by Fusion of an Adenovirus Fiber Shaft Fragment with the Foldon Domain of Bacteriophage T4 Fibrin. *Journal of Biological Chemistry.* 279: 8991-8998
- 15 Preston MI, SML Fleiszig, TS Zaidi, JB Goldberg, VD Shortridge, MI Vasil, GB Pier. 1995. Rapid and Sensitive Method for Evaluating *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors during Corneal Infections in Mice. *Infection and Immunity.* 63:3497-3501
- Qu Y, Hyman P, Harrah T, Goldberg E. In vivo bypass of chaperone by extended coiled-coil motif in T4 tail fiber. *J Bacteriol.* 2004 Dec;186(24):8363-9.
- 20 Ramphal R, MT McNiece, FM Polack. 1981. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to the injured cornea: a step in the pathogenesis of corneal infections. *Ann. Ophthalmol.* 13:421-425
- Rich, et al. "ACE is a collagen binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*." *J. Biol. Chem.* 274:26939-26945, 1999
- 25 Riley MA, JE Wertz. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:117-137
- Roland PS, DW Stroman. 2002. Microbiology of Acute Otitis Externa. *Laryngoscope.* 112:1166-1177
- Rudner et al. "A family of membrane-embedded metalloproteases involved in regulated proteolysis of membrane-associated transcription factors." *PNAS* 96(26):14765-14770, 1999
- 30 Schweizer HP. 2001. Vectors to express foreign genes and techniques to monitor gene expression in *Pseudomonads*. *Current Opinion in Biotechnology.* 12:439-445
- Schweizer, H.P., Klassen,T. y Hoang,T., Improved methods for gene analysis and expression in *Pseudomonas*, Unpublished
- Shimizu Y, T Kamazaki, SI Ishii. 1982. Specific Cleavage at Fibers of a Bacteriophage-Tail-Like Bacteriocin, Pyocin R1 by Successive Treatment with Organomercurial Compounds and Trypsin. *J Virology* 44:692-695
- 35 Shinomiya T & S Ina. 1989. Genetic Comparison of Bacteriophage PS17 and *Pseudomonas aeruginosa* R-Type Pyocin. *J. Bacteriology* 171:2287-2292
- Shinomiya T, S Shiga, A Kikuchi, M Kageyama. 1983b. Genetic determinant of pyocin R2 in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. II. Physical characterization of pyocin R2 genes using R-prime plasmids constructed from R68.45. *Mol Gen Genet.* 189:382-389
- 40 Shinomiya T, S Shiga, M Kageyama. 1983a. Genetic determinant of pyocin R2 in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. I. Localization of the pyocin R2 gene cluster between the trpCD and trpE genes. *Mol Gen Genet.* 189:375-38
- Shinomiya T, S Shiga. 1979. Bactericidal Activity of the Tail of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophage PS17. *J of Virology* 32:958-967
- 45 Shinomiya T. 1984. Phenotypic Mixing of Pyocin R2 and Bacteriophage PS17 in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Virology.* 49:310-314
- Sreedhar et al. "*Enterococcus faecalis* Adhesin, ACE, Mediates Attachment to Extracellular Matrix Proteins Collagen Type IV and Laminin as well as Collagen Type I." *Infect. Immun.* 68(9):5218-5224, 2000
- Strauch E, Kaspar H, Schaudinn C, Dersch P, Madela K, Gewinner C, Hertwig S, Wecke J, Appel B. Characterization

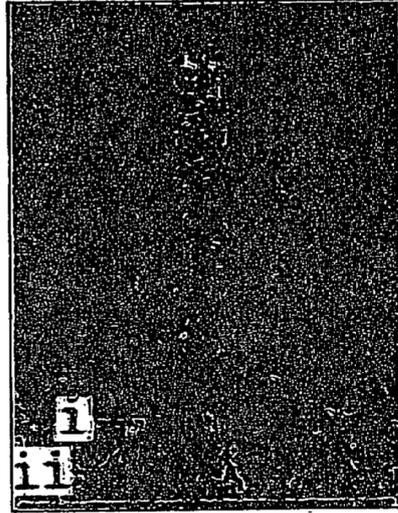
- of enterocolitacin, a phage tail-like bacteriocin, and its effect on pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Dec;67(12):5634-42.
- Takeya K, Y Minamishima, Y Ohnishi, K Amako. 1969. Rod-shaped pyocin28, *J. Gen. Virol.* 4:145-149
- 5 Talbot GH, J Bradley, JE Edwards, D Gilbert, M Scheld, JG Bartlett. 2006. Bad Bugs Need Drugs: An Update on the Development Pipeline from the Antimicrobial Availability. *Clin Infect. Dis.* 42:657-668
- Tamber et al. *J. Bact.* 188(1):45-54,2006
- Tetart F, C Desplats, M Kutateladze, C Monod, H-W Ackermann, HM Kirsch. 2001. Phylogeny of the Major Head and tail genes of the Wide-Ranging T4-Type Bacteriophages. *J Bacteriology* 183:358-366
- 10 Tetart F, Desplats C, Kirsch HM. Genome plasticity in the distal tail fiber locus of the T-even bacteriophage: recombination between conserved motifs swaps adhesin specificity. *J Mol Biol.* 1998 Sep 25;282(3):543-56.
- Thompson NE, PA Pattee. 1981. Genetic transformation in *Staphylococcus aureus*: demonstration of a competence-conferring factor of bacteriophage origin in bacteriophage 80a lysates. *J. Bacteriol.* 148:294-300
- Twining SS, X Zhou, DP Shulte, PM Wilson, B Fish, J Moulder. 1996. Effect of vitamin A deficiency on the early response to experimental *Pseudomonas* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37:511-522
- 15 Uratani, Y., y Hoshino, T. Pyocin R1 inhibits active transport in *Pseudomonas aeruginosa* and depolarizes membrane potential. *J Bacteriol.* 1984 Feb;157(2):632-6.
- van Horn DL, SD Davis, RA Hyndiuk, TVP Alpren. 1978. Pathogenesis of experimental *Pseudomonas* keratitis in the guinea pig: bacteriologic, clinical, and microscopic observations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 17:1076-1086
- 20 van Raaij MJ, A Mitraki, G Lavigne, S Cusack. 1999. A triple  $\beta$ -spiral in the adenovirus fibre shaft reveals a new structural motif for a fibrous protein. *Nature.* 401:935-38.
- van Raaij MJ, G Schoehn, MR Burda, S Miller. 2001. Crystal Structure of a Heat and Protease-stable Part of the Bacteriophage T4 Short Tail Fibre. *J. Mol. Biol.* 314:1137-1146
- Weigele PR, E Scanlon, y J King. 2003. Homotrimeric,  $\beta$ -Stranded Viral Adhesins and Tail Proteins. *J of Bacteriology.* 185:4022-4030.
- 25 Wenzel RP. 2004. The Antibiotic Pipeline - Challenges, Costs, and Values *New Engl J Med.* 351 :523-526
- West SHE, HP Schweizer, AK Sample, LJ Runyen-Janecky. 1994. Construction of Improved *Escherichia-Pseudomonas* Shuttle Vectors Derived from pUC18/19 and Sequence of the Region Required for Their Replication in *Pseudomonas aeruginosa* Gene 128:81-86
- 30 Wong et al. "Insertion Mutagenesis and Membrane Topology Model of the *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Protein OprM." *J. Bacteriol.* 182(9):2402-2410,2000
- Yoichi M, M Abe, K Miyanaga, H Unno, Y Tanji. 2005. Alteration of tail fiber protein gp38 enables T2 phage to infect *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biotech.* 115:101-107
- Young, Ry, "Phage Lysis" in *Phages*, Waldor, Friedman y Adhya, eds. ASM Press, Washington, DC, p95, 2006
- Ziermann R, R Calendar. 1991. Characterization of the cos site of bacteriophages P2 and P4. *Gene.* 96:9-15
- 35 Zink R, MJ Loessner y S Scherer. 1995. Characterization of cryptic prophages (monocins) in *Listeria* and sequence analysis of a holin/endolysin gene. *Microbiology.* 141:2577-2584
- Zolfaghar et al. "Mutation of retS, encoding a putative hybrid two-component regulatory protein in *Pseudomonas aeruginosa*, attenuates multiple virulence mechanisms." *Microbes Infect.* Jul 15, 2005 Epub antes de imprimir

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína bacteriocina de fibra caudal de elevado peso molecular (epm) que comprende una región de anclaje a placa base (BPAR) y un dominio de unión a receptor heterólogo (RBD), en la que RBD es de una fibra caudal de un bacteriófago o profago o una fibra caudal de otra bacteriocina que muestre características de unión diferentes de aquellas de la bacteriocina del BPAR y en la que BPAR comprende los aminoácidos 1-164 o 1-240 de una piocina de tipo R.
2. La proteína de fibra caudal de la reivindicación 1 en la que dicho RBD es de una proteína de fibra caudal de bacteriófago.
- 10 3. La proteína de fibra caudal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en la que dicho RBD de un bacteriófago o una bacteriocina comprende de 347 a 755 aminoácidos de longitud incluyendo el extremo C-terminal de dicha proteína.
4. La proteína de fibra caudal de la reivindicación 1 que comprende parte de la secuencia de aminoácidos representada por las SEC ID N°: 1, 3, 5, 7 o 9, o que comprende la secuencia de aminoácidos representada por las SEC ID N°: 27 o 30, o en el que el RBD se une a un factor de virulencia o aptitud bacteriano.
- 15 5. La proteína de fibra caudal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el RBD es de un fago T-4, un fago T-par, un fago pseudoT-par, un fago T3, un fago T7, un fago del supergrupo de T7, fago Mu, fago P22, fago L-413c o un fago lamboide.
6. Una bacteriocina de epm que comprende una proteína de fibra caudal de la reivindicación 5.
- 20 7. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fibra caudal de bacteriocina de elevado peso molecular (epm) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la expresión de la molécula de ácido nucleico está bajo el control de un promotor para su expresión en bacterias de producción.
8. Una célula bacteriana transfectada o transformada con, o que contiene, un vector de acuerdo con la reivindicación 7.
- 25 9. La célula bacteriana de la reivindicación 8, en la que la célula contiene una molécula de ácido nucleico que codifica y es capaz de expresar un conjunto de genes de piocina de tipo R a partir del cual se han inactivado o eliminado los genes prtR, prtN, prf15 y holin.
- 30 10. La célula bacteriana de la reivindicación 8, en la que la célula comprende además más de una molécula de ácido nucleico para la expresión de más de una proteína de fibra caudal modificada o diseñada por ingeniería genética para producir fibras caudales homotriméricas mixtas o fibras caudales heterotriméricas en la bacteriocina.
11. Una composición antibacteriana que comprende la bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética de la reivindicación 6 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado para administración tópica, pulmonar, gastrointestinal o sistémica.
- 35 12. La composición de la reivindicación 11 que además comprende otra bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética o una bacteriocina de origen natural.
13. La composición de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en la que la bacteriocina está microencapsulada.
14. Un método para producir una bacteriocina de epm diseñada por ingeniería genética, comprendiendo dicho método cultivar la célula bacteriana de las reivindicaciones 8 a 10 en condiciones que den como resultado la producción de la bacteriocina de epm.
- 40 15. Un bacteriófago P2, P4 o  $\Phi$ CTX que comprende la molécula de ácido nucleico definida en la reivindicación 7.
16. Un método *in vitro* o *ex vivo* para comprometer la integridad de una membrana citoplasmática de una célula bacteriana, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha bacteria con la bacteriocina de la reivindicación 6.
17. Una bacteriocina de la reivindicación 6 para su uso en un método para comprometer la integridad de una membrana citoplasmática de una célula bacteriana en un sujeto.

Piocina de tipo R

A)



B)

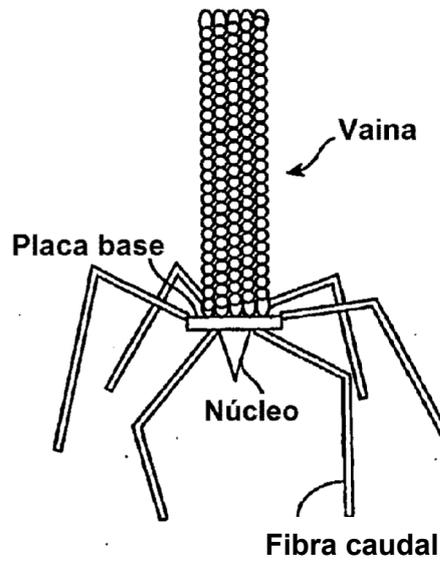


FIG. 1

Ensayos de dilución en serie puntual

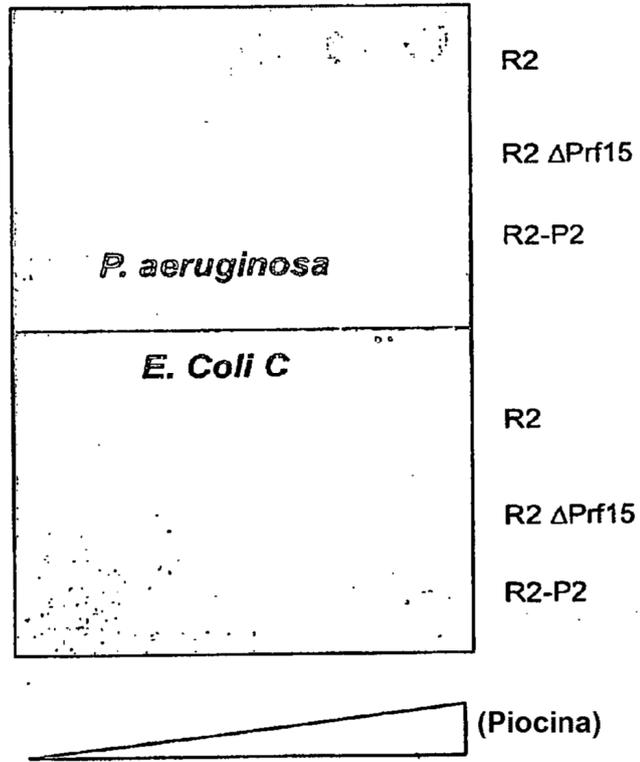
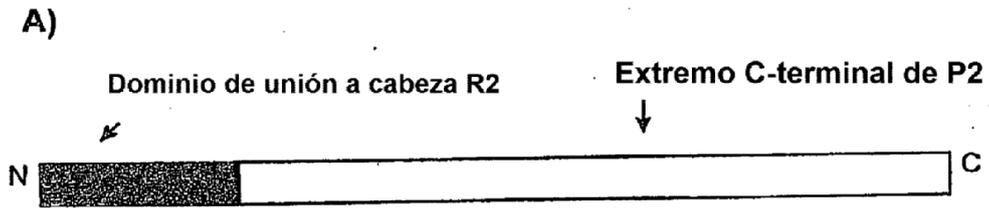


FIG. 2

Complementación de la estructura de piocina R2 con una  
fusión de fibra caudal R2-P2



B)

R2 de tipo silvestre

R2 complementada una fusión  
de fibra caudal R2-P2

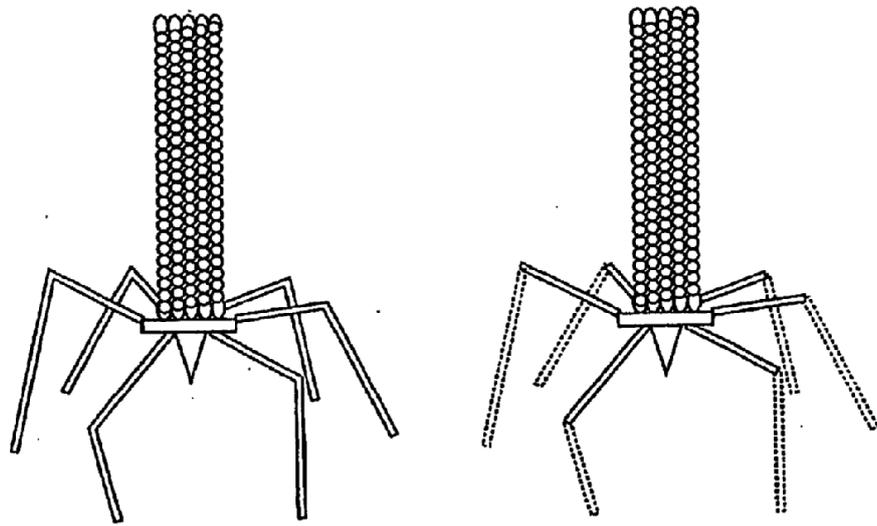
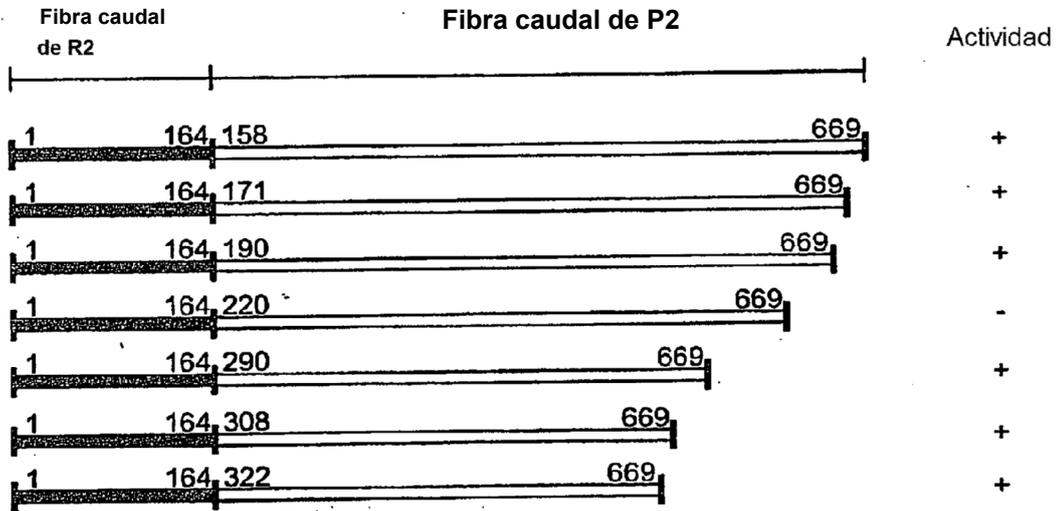


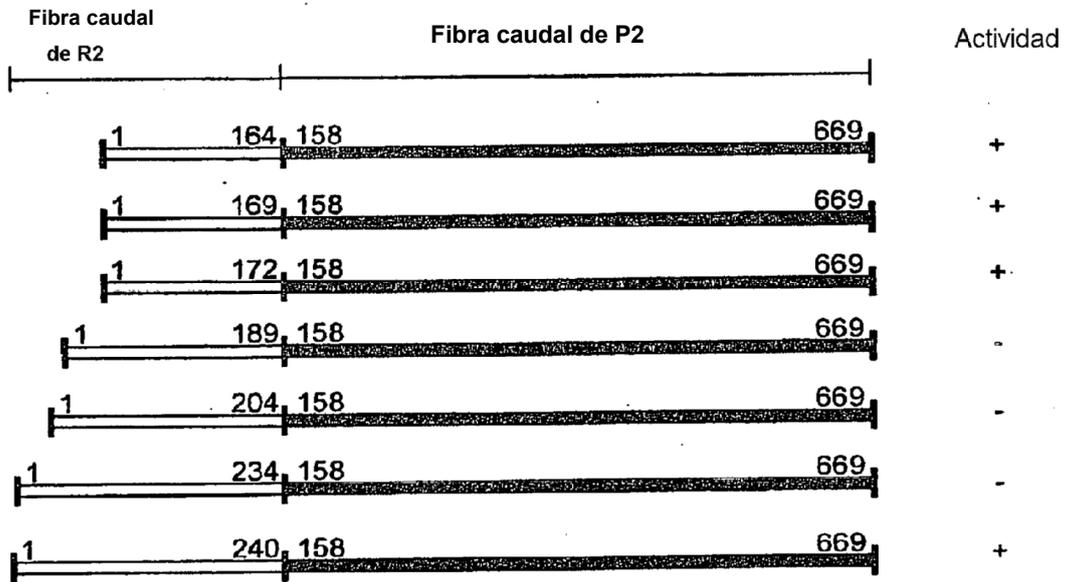
FIG. 3

**Múltiples fusiones de R2-P2 y sus actividades bactericidas**



**FIG. 4**

**Varias porciones del extremo N-terminal de la fibra caudal de R2 (BPAR) fusionadas a la porción C-terminal 158-669 (RBD) de la fibra caudal de P2**



**FIG. 5**

Múltiples fusiones de R2-P2 y sus actividades bactericidas

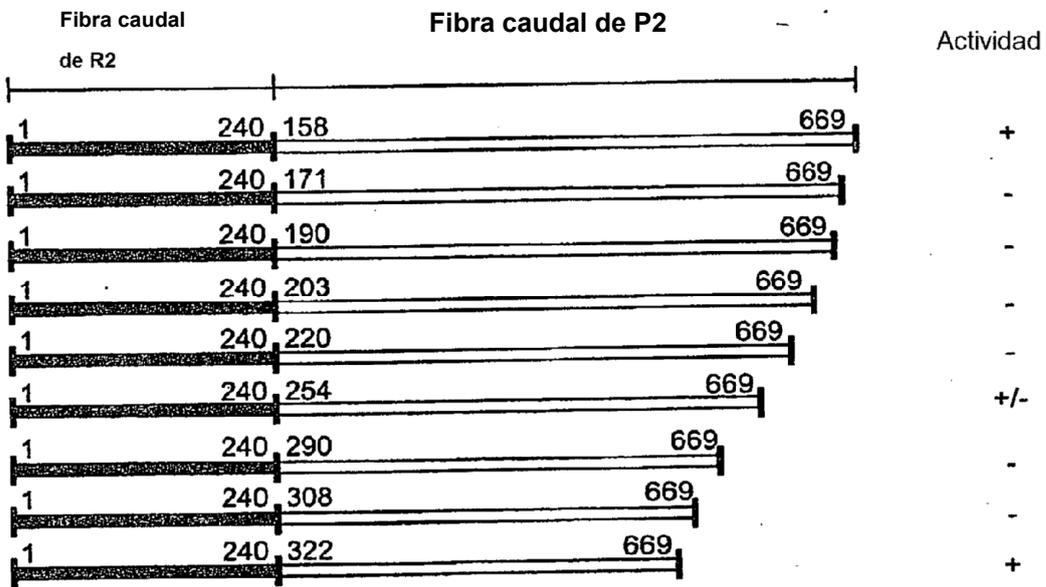


FIG. 6

Varias porciones del extremo N-terminal de la fibra caudal de R2 (BPAR) fusionadas a la porción C-terminal 322-669 (RBD) de la fibra caudal de P2

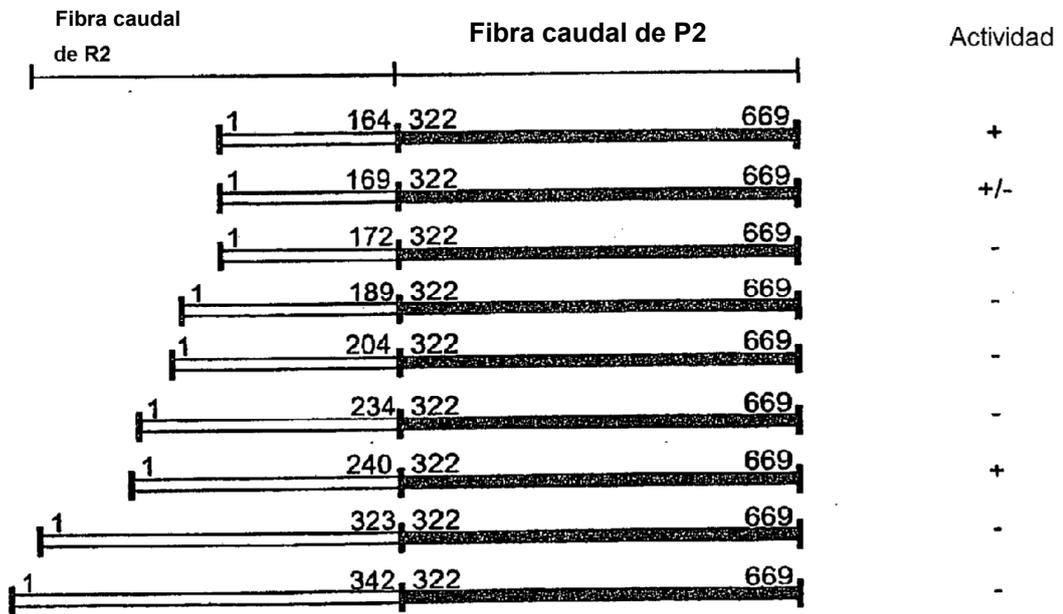


FIG. 7

**Complementación de *trans* de la estructura de piocina R2  
PAO1 Δprf15 con varias fibras caudal de piocina de tipo R,  
fusiones de fibra caudal y chaperonas**

Fibra Caudal (prf 15)	Actividad bactericida prf15 expresado solo	Actividad bactericida prf15 y chaperona afin	% de identidad de secuencia de PRF15 con PRF15 de R2	% de identidad de secuencia de los aa 1-429	% de identidad de secuencia de los aa 430-fin	% de identidad de secuencia de Prf16 con Prf16 de R2
R1	+	+++	82	99	52	32
R2	++	+++	100	100	100	100
R3	++	+++	99	99	98	98
R4	++	+++	98	99	99	99
R5	-	+++	83	97	58	35
R2-P2	-	+++ (P2)	14	na	na	6
R2-L413c	-	+++ (413)	19	na	na	6

**FIG. 8**

Vector de expresión de fibra caudal de piocina y chaperona

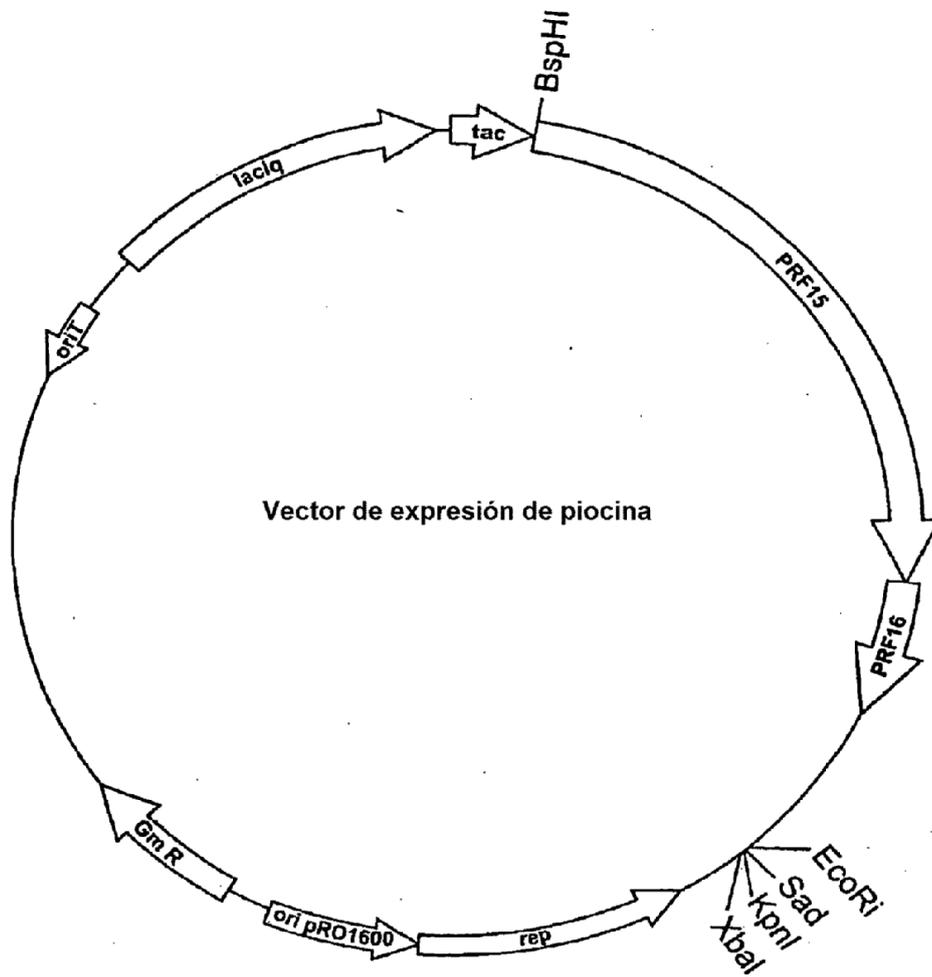
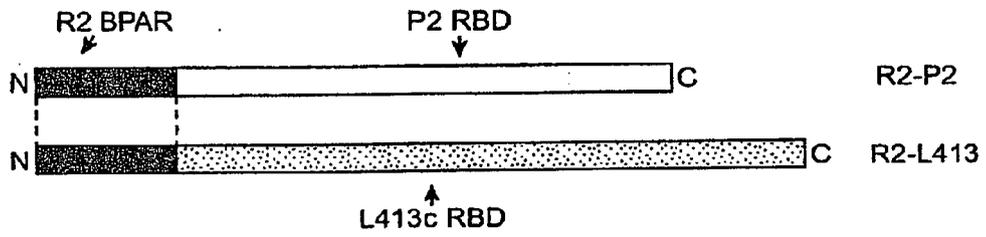


FIG. 9

**Construcción de fibra caudal de piocina  
especifica de *Yersinia pestis***



**FIG. 10**

LISTADO DE SECUENCIAS

SEC ID N°:1 >R1 prf15  
 MTTNTPKYGGLLTDIGAAALAAASAAGKKWQPTHMLIGDAGGAPGDTDPDPLPSAAQKSLI  
 NQRHRAQLNRLFVSDKNANTLVAEVVLPVEVGGFWIREIGLQDADGKFFAVSNCPPSYKA  
 AMESGSARTQTIRVNIALSGLENVQLLIDNGIIYATQDWWKEKVAADFKGRKILAGNGLV  
 GGGDLSADRSIGLAPSGVTAGSYRSVTVNANGVVTQGSNPTTLAGYAIIGDAYTKADTDGK  
 LAQKANKATTLAGYGITDALRVDGNAVSSSRLAAPRSLAASGDASWSVTFDGSANVSAPL  
 SLSATGVAAGSYPKVTVDTKGRVTAGMALAATDIPGLDASKLVSGVLAEQRLPVFARGLA  
 TAVSNSSDPNTATVPLMLTNHANGPVAGRYFYIQSMFYPDQNGNASQIATSYNATSEMYV  
 RVSYAANPSIREWLPWQRCDIGGSFTKTTDGSIGNGVNINSFVNSGWWLQSTSEWAAGGA  
 NYPVGLAGLLIVYRAHADHIYQTYVTLNGSTYSRCCYAGSWRPWRQNWDDGNFDPASYP  
 KAGFTWAALPGKPATFPFSGHNHDTSQITSGILPLARGGLGANTAGARNNIGAGVPATA  
 SRALNGWVKDNDTGLIVQWQVNVGDHPGGIIDRTLTFPIAFPSACLHVVPVKEVGRPA  
 TSASTVTVADVSVSNTGCVIVSSEYYGLAQNYGIRVMAIGY

SEC ID N°:2 >R1 prf16  
 MIFFHAATGGFYSKEIHGSRMPLEDEMHPLEDAEYQALLRAQSEGKRIIVTDHTGRPICVD  
 PPAPAKDILVQRERIWDRQLQLTDGPLARHRDEQDLGKTTTLSQEQLRELTLYRAVLRD  
 WPIAAEFDDLNRPEPPAWLQSLITP

SEC ID N°:3 >R2 prf15  
 MATNTPKYGGLLTDIGAAALATASAAGKKWQPTHMLIGDAGCAPGDTDPDPLPSAAQKSLI  
 NQRHRAQLNRLFVSDKNANTLVAEVVLPVEVGGFWIREIGLQDADGKFFAVSNCPPSYKA  
 AMESGSARTQTIRVNIALSGLENVQLLIDNGIIYATQDWWKEKVAADFKGRKILAGNGLL  
 GGGDLSADRSIGLAPSGVTAGSYRSVTVNANGVVTQGSNPTTLAGYAIIGDAYTKADTDGK  
 LAQKANKATTLAGYGITDALRVDGNAVSSSRLAAPRSLAASGDASWSVTFDGSANVSAPL  
 SLSATGVAAGSYPKVTVDTKGRVTAGMALAATDIPGLDASKLVSGVLAEQRLPVFARGLA  
 TAVSNSSDPNTATVPLMLTNHANGPVAGRYFYIQSMFYPDQNGNASQIATSYNATSEMYV  
 RVSYAANPSIREWLPWQRCDIGGSFTKEADGELPGGVNLDMSVTSGWWSQSFTAQAASGA  
 NYPIVRAGLLHVYAASSNFYQTYQAYDGESFYFRCHRHSNTWFPWRRMWHGGDFNPSDYL  
 LKSGFYWNALPGKPATFPFSAHNHDVGQLTSGILPLARGGVGSNTAAGARSTIGAGVPAT  
 ASLGASGWWRDNDTGLIRQWQVTCPADADASITFPIPFPTLCLGGYANQTSAFHPGTDA  
 STGFRGATTTTAVIRNGYFAQAVLSWEAFGR

SEC ID N°:4 >R2 PRF16  
 MKGEYFSPSQVAFYPASLREVVEYAGCWPVDGEWVSaelHEOLMNEQAAGRAISSDVNG  
 NPVAIERPPLSRQQRSTHERRWRDSQLLATDGLVVRHRDQLETGKETTLLPVQYHELMSY  
 RASLRDWPEEPLFPDSGGRPSVPDWLRRYVTP

SEC ID N°:5 >R3 prf15  
 MTTNTPKYGGLLTDIGAAALAAASAAGKKWQPTHMLIGDAGGAPGDTLDPLPSAAQKSLI  
 NQRHRAQLNRLFVSDKNANTLVAEVVLPVEVGGFWIREIGLQDADGKFFAVSNCPPSYKA  
 AMESGSARTQTIRVNIALSGLENVQLLIDNGIIYATQDWWKEKVAADFKGRKILAGNGLL  
 GGGDLSADRSIGLAPSGVTAGSYRSVTVNANGVVTQGSNPTTLAGYAIIGDAYTKADTDGK  
 LAQKANKATTLAGYGITDALRVDGNAVSSSRLAAPRSLAASGDASWSVTFDGSANVSAPL  
 SLSATGVAAGSYPKVTVDTKGRVXAGMALAATDIPGLDASKLVSGVLAEQRLPVFARGLA  
 TAVSNSDPNTATVPLMLTNHANGPVAGRYFYIQSMFYPDQNGNASQIATSYNATSEMYV  
 RVSYAANPSIREWLPWQRCDIGGSFTKEADGELPGGVNLDMSVTSGWWSQSFTAQAASGA  
 NYPIARAGLLHVYAASSNFYQTYQAYDGESFYFRCRYNSNTWLPWRRMWHGGDFNPSDYL  
 LKSGFYWNALPGKPATFPFSAHNHDVGQLTSGILPLARGGVGSNTAAGARSTIGAGVPAT  
 ASLGASGWWRDNDTGLIRQWQVTCPADADASITFPIPFPTLCLGGYANQTSAFQPGTDA  
 STGFRGATTTTAVIRNGYFAQAVLSWEAFGR

FIG. 11A

SEC ID N°:6 >R3 prf16  
 MKGEYFSPSQVAFYPASLREVYEHAGCWPVDGEWVSAELHEQLMNEQAAGRAISSDVNG  
 NPVAIERPPLSRQQRSTHERRWRDSQLLATDGLVVRHRDQLETGKETTLFPVQYHELMSY  
 RASLRDWPEEPLFPDSGGRPSVPDWLRRYVTP

SEC ID N°:7 >R4 prf15  
 MTTNTPKYGGLLTDIGAAALAAASAAGKKWQPTHMLIGDAGGAPGDTDPDPLPSAAQKSLI  
 NQRHRAQLNRLFVSDKNANTLVAEVVLPVEVGGFWIREIGLQDADGKFVAVSNCPPSYKA  
 AMESGSARTQTIRVNIALSGLENVQLLDNGI IYATQDWVKEKVAADFGRKILAGNGLV  
 GGGDLSADRSIGLAPSGVTAGSYRSVTVNANGVVTQGSNPTTLAGYAIGDAYTKADTDGK  
 LAQKANKATTLAGYGITDALRVDGNAVSSSRLAAPRSLAASGDASWSVTFDGSANVSAPL  
 SLSATGVAAGSYPKVTVDTKGRVTAGMALAATDI PGLDASKLVSGVLAEQRLPVFARGLA  
 TAVSNSSDPNTATVPLMLTNHANGPVAGRYFYIQSMFYPDQNGNASQIATSYNATSEMYV  
 RVSYAANPSIREWLPWQRCDIGGSFTKEADGELRGGVNLDSMVTSGWWSQSFPAQAATGA  
 NYPFVIRAGLLHVYAASSNFYQTYQAYDGESFYFRCHRHSNTWFPWRRMWHGGDFNPSDYL  
 LKSGFYWNALPGKPFATFPPSAHNHDVGQLTSGILPLARGGVSNTAAGARSTIGAGVPAT  
 ASLGASGWWRDNDTGLIRQWQVTCPADADASITFPPIFPPTLCLGGYANQTSAFHPGTD  
 A STGFRGATTTTAVIRNGYFAQAVLSWEAFGR

SEC ID N°:8 >R4 prf16  
 MKGEYFSPSQVAFYPXSLREVYEYAGCWPVDGEWVSAELHEQLMNEQAAGRAISSDVNG  
 NPVAIERPPLSRQQRSAHERRWRDSQLLATDGLVVRHRDQLETGKETTLFPVQYHELMSY  
 RASLRDWPEEPLFPDSGGRPSVPDWLRRYVTP

SEC ID N°:9 >R5 prf15  
 MTTNTPKYGGLLTDIGAAALAAASAAGKKWQPTHMLIGDAGGAPGATPDPIPAATQTKLI  
 NQRYRAQLNRLFVSDKNINTLVAEVVLPVEVGGFWIREIGLQDADGKFVAVSNCPPSYKA  
 AMESGSARTQTIRVNIALSGLENVQLLDNGI IYATQDWVKEKVAADFGRKILAGNGLV  
 GGGDLSADRSIGLAPSGVTAGSYRSVTVNANGVVTQGSNPTTLAGYAIGDAYTKADTDGK  
 LAQKANKATTLAGYGITDALRVDGNAVSSSRLAAPRSLAASGDASWSVTFDGSANVSAPL  
 SLSATGVAAGSYPKVTVDTKGRVTAGMALAATDI PGLDASKLVSGVLAEQRLPVFARGLA  
 TAVSTSDPNTATVPLMLTNHANGPVAGRYFYIQSMFYPDQNGNASQIATSYNATSEMYV  
 RVSYAANPSARDWLPWKRCIDIGGSFSKEADGALGGAVNLNSLITSGWVYQANQAESGA  
 NYPVPRAGLLQVHNAGTNFIYQTYQVYDGEQFYFRCRYTNTWYFWRRVWHGADFNPNNDYL  
 LKSGFTWAALPGKPFATFPPTGHNDAAQITSGILPLARGGLGSNTAAGARNNIGAGVPAT  
 ANRSLNGWVKDNDTGLIVQWMTVSVGDHPGGIVNRSITPPIAFPTTCLHVVPVSKELGRP  
 ATASASTVTLADSVSTTGCVIVATEYHGAVQNYAIRLVAIGC

SEC ID N°:10 >R5 prf16  
 MIFPHAATGGFYSKDVHGDRMPI DARMYPLEEAEYLALLVAQSEGKQIVADAAGRPFPCID  
 PPAPAEVLAHRERIWRDRQLTLDGPIARHRDELDLGGKITTLNQAQLLELTLYRASLRD  
 WPASAAFPDLGARPEPPLWLEPLITP

SEC ID N°:11 > OprM  
 MKRSFSLAVAAVVLSGC SLIPDYQRPEAPVAAAYPQGOAYGQNTGAAA VPAADIGWREF  
 FRDPQLQQLIGVALENNRDLRVAALNVEAFRAQYRIQRADLFPRIGVDGSGTRQLPGDL  
 STTGSPAISSQYGVTLGTTAWELDLFGRLRSLRDAQALEQYLA TEQAORSAQTTLVASVAT  
 AYLTLLKADQAQLQTKDTLGTQYKSFDLTQRSYDVGVASALDLRQAQTAVEGARATLAQY  
 TRLVAQDQNALVLLGSGIPANLPQGLGLDQTLLEVPAGLPSDLLQRRPDILEAEHQLM  
 AANASIGAARAAFFPSISLTANAGTMSRQLSGLFDAGSGSWLFQPSINLPIFTAGSLRAS  
 LDYAKIQKDINVAQYKAIQTA FQEVADGLAARGTFTEQLQAQRDLVKASDEYYQLADKR  
 YRTGVDNYLTLDAQRS LFTAQQQLITDRLNQLTSEVNLYKALGGGWNQQTVTQQQTAKK  
 EDPQA

FIG. 11B

SEC ID N°:12 > OprJ

MRKPAFGVSAALLIALTLGACSMAPTYERPAAPVADSWSGAAAQRQGAIDTLDWKSFIVD  
 AELRRLVDMALDNNRSLRQTLLDIEAARAQYRIQRADRVPLNAAAATGNRQRQPADLSAG  
 NRSEVASSYQVGLALPEYELDLFGRVKSLTDAALQQYLASEEAAAARIALVAEVSQAYL  
 SYDGALRRLALTRQTLVSREYSFALIDQRRAGAATLDYQEBALGLVEQARAEQERNLRQ  
 KQQAFNALVLLGSDDAQAIPRSPGQRFKLLQDIAPGTPSELIERPDI LAEHLRLRAR  
 NADIGAARAAFFPRISLTGSGFTSSAEMSGLFDGGSRSWSFLPTLTLPIFDGGRNRANLS  
 LAEARKDSAVAAEYEGTIQTA FREVADALAASDTLRREKALRALANS SNEALKLAKARYE  
 SGVDNHLRYLDAQRSSFLNEIAFIDGSTQRQIALVDLFRALGGGWDEGRSLVVHRGGRS

SEC ID N°:13 > OprN

MIHAQSIRSGIASALGLFSLALLSACTVGPDYRTPDTAAKIDATASKPYDRSRFESLWW  
 KQFDDPTLNQVQSLSGNRLDRVAFARLRAARALRDDVANDRFPVVTSRASADIGKGOQ  
 PGVTEDRVNSERYDLGLDSAWELDLFGRI RRQLESSDALSEAAEADLQQLQVSLIAELVD  
 AYQQLRGAQLREKIALSNLENQKESRQLTEQLRDAGVGAELDVLRADARLAATAASVPOL  
 QAEAERARHRIATLLGQRPEELTVDLSPRDLPAITKALPIGDPGELLRRRPNIRAAERV  
 AASTADVGVATADLFPAGQPQLRPLRHRRAGSQIGSSAARAWSVGPSISWAAFDLGSVRA  
 RLRGAKADADAALASYEQVLLALEESANAFSDYGKRQERLVSLVRQSEASRAAAQAAI  
 RYREGTTDFVLDDAEREQLSAEDAQAQAEVELYRGI VAIYRSLGGGWQPSA

SEC ID N°:14 > AprF

MRRLMTWLFAGFLLLLREDAFALGLLDGYHLAENDPQFQAAIQEHEAGRQYRALGRAAL  
 LPRLVSYNRRGRSWSVDVTQTTTRGDFKEDRDYDSYVSTLSLQQLPFDYEFBSRYRKGVAQ  
 ALLSDERFRSQSQELLVVRVLEAYTGALLAQDQIELARAQKRSYREQFQLNQRQFERGNGT  
 RTDTLETQARFNLAQAQEI EARDSQDAALRELERLVGAPLEIADLAPLGERFQVRPLSPA  
 SYTAWRDLALAEENPELASLRHAVDVARYEVEQNRADFLPRGLYASTGKSKSGSENTYNO  
 RYETDSVGIQLSVPLFSGGETLAATRQATHRMEKSHYDLDKVRRETLNQRKMYNQSSSS  
 AAKIRAYEMTVDSARTLVMATRKSIAAGVRVNLDDLNAEQALYSAMNELSKAKYDYLTAW  
 ARLRFYAGVLDADLELVAANFVSGETPARRRDCATTDCPAPLHTLSKTDTEENRSALN

SEC ID N°:15 > OpmM

MNRLRACLLSSALLSASSAQAALGLLDAYQLAVRHDPTFQAALHERRAGSENRAIGRAGLL  
 PSLRYDYNKARNDSTVSQGDARVERDYRSYASTLSLEQPLFDYEAAYARYRQGEAALFAD  
 EQFRGRSQELAVRLFAAYSETLFAREQVVLAEARRALETQLAFNQRAFEEGEGTRTDLL  
 ETRARLSLTRAEEIAASDRAAAARRTLEAMLGOALEDRELAAPIERFPALRLQPATFEGW  
 RQVALRQSAELGAQRHALEAAAYEVERNRAGHLPRLSLYASSSKTHSASESTYEQKYDTD  
 SVGLRLSLPLFEGGRVSAATRQAGDKYAQAQAELEDAQVASVINDLHSQFDLTASSLAKVR  
 AYEMAVAAAREQVTATRRSVAGGERVNRDVLDAEQQFYGARRDLAEARYAYLNAWLRLRQ  
 LAGVLEDRDLAVLAAAYFGAGEGRAQVTAAIR

SEC ID N°:16 > OpmA

MKGTPLLLIASLALGACSLGPDFTRPDRPAPGEWSLQAAAAGNPSHLAAAPLAAQWTLFD  
 DAQLNALLQVRQANLDLRSAAARLQSSRAIRRS LGGDALPSVDASGNVQRQRTTSAGLF  
 DPGKAGKGNYNHALAGFDASWELDFWGRVRRLEAADATVEASENELRDVQVSVLAEAA  
 RDYIQLRGEQNRAAI IRDNLETARRSLELTRRLANGVATDLEVAQALAQVASMEARLPE  
 VEKNQAHLVNALGYLVGASPGSLLAELGPARAI PRPPGSPVVGLPSELAQRRPDIRRAEA  
 RLHAATASIGVAKADFYPRITLNGNFGFESLQLSSLDGDWDRQFAIGPAPSLPIFEGGRL  
 RGRLELREACQOEAAIDYQRTVLRWQEVDDAMHDYANQRRQERLGEAVAQNRRLQSA  
 REQYRAGAVDFLSVLDQRQLLDNQEQVQVQASDEAVSILTLVNLKALGGGWSPTS DPASG

SEC ID N°:17 > OpmD

MKRSYPNLSRLALALAVGTGLAACSVGPDYQRPQSPPPRVASEHLGEPFGERREAPWNSF  
 FDDPQLVRLVDQALARNHDIREARANLRSARALFDDRWLQQLPQVTSQAGYSRSIEQLD  
 YDGEPRRRLAESYRAGFDAQWEIDLFGRLGRLSDAALARAEEAADLRLVRLSIAADTAR  
 AYFETIOGYQRRLDVARAQVRSWRDTLELTRSSLQLGSGLPEDVENAQANLLRSEAAI PPL  
 TTALESARYRLDVLRGEAPGSGAPILDGCAAAPLAKNPLPGDVRLLIQRPDVVSARQL  
 AASTEDVGAATAELYPRDLGGFIGFFALRSGDLGSASRAFELAPSVSWPAFRLGNVRAR  
 LRAVEAQSDAALARYQRSLLLAQEDVGNALNQLAEHQRRRLVALFQSATHGANALEIANER  
 YRAGAGSYLAVLENQRALYQIREELAQAETASFVNVI ALYKALGWGSGDLAPGAGQLAAG  
 ETAGANR

FIG. 11C

SEC ID N°:18 > OpmE  
 MKPYLRSSLSALILLGGCAAVGPDYAPPSASAPASFGAMPAGIDGSGVEIEWWRGFDEPA  
 LESLTIQRALANLDIALAGARLDEAKALLRENREEFLPRGGPAFDYQARRRGEVETPAGQ  
 QRDIEYRGALDASWEIDLFGVRVRSVEAAEAQAGSREALLRNVQASVAATVAMSWFQLO  
 GIEAELAVVHDIAGNQRDSLEMVERLVSAGSAHEFDRLRAEALLHNVEAAVPLERRRAA  
 TRNALAVLLAEAPQAFSPVARASGERLTLRLTGVGDPAGLLARRADIAAERNLAAATA  
 RIGVETAGLYPQVEVRGSIQVAGNLDALDESGTSFNVLNPVIRWALLDRGRVWARIAAS  
 EARAQEALILYDRTVLRALQETDDAFNGYGAAADRLRLRLEATANREAAARLARERFVQG  
 DGEYLDVLEARSYDLSRRALS IARTEQRLAVVGIYKALGGGWEACAGARRCGVATDDTS  
 PGVARQRDSRS

SEC ID N°:19 >gen H de PS17  
 MSTNQYGGFLTDKGAQKVEAASGGLRNITHMLIGDAGGAPGQTPDPVPSPLQTKLVRO  
 RYRVKLNRLVAADNSPSVLIABAILPQDVGGWWMRELGLESDGDMIAVANCAPSYKPLV  
 NEGSGRTQTVRLHIAFSHAETVDLLIDPNVVTATVADLQNALLEV RATNDATGQMTGRGT  
 GKLLALPLSLSLTGIAAGTYRSLTVDAKGRATSGSNPTTLGGYGITDALAKSDAVDVPAPN  
 KLLRLNAASQLPASITGNAATATKLVPRMLSFTGDATGGASFDSANAAVALTLANSV  
 TAGTYAKVTVNGKGLVTTGGAQLTAADI PALDAGKVVSGVLP IARGGTGNAIGQAATAVKL  
 ASPRTLAIAGDATGSAAFDGSANASISVTLANTGVAVGTYTKVRVNAKGLVTSAASTAD  
 DVPWLDASKVTSGMFADARLPWYAQGLCTSAPNTTDPNTTNIPLILTNHENGPIPGTFFY  
 IQTMYNQRNGNAAQIAVRYAANAEMYVRYMYDVGNKRGVWSAWKRCVDGGSFAKEADGE  
 LGGVNLDTMIASGWWHPFSANAKNGTNYPVGEAGLLTVHAPTSTMIYQTYRGAAGGL  
 YWRCRYNGTWSAWYRAWDSGNFNPNANYVARSEYSWASLPGKATFPFSGHNHDATQITSG  
 ILPLARGGLGANNAVTARSNIGAGTIATASLGSSGWRDNDTGYIRQWGRVTVPGDGSAA  
 ITFPIAFPSVCLGGFAGQTANFHPGTDASTSFYNQSTTGATLENGYQFQAVLLWEAFGR

SEC ID N°:20 >gen G de PS17  
 MSASDYVFSPSARVFPVALREVYETEGEGWPADAVPVSNERYLHLLAGQEAGMRIAANAS  
 GOPVLVDPFPLTEAERTKARAWRDAQLAQTDGMVARHRDERDLGNDTTLQPEQFVEVMN  
 YRAALRNWPDPAFDPASRPEPPAWLAEETN

SEC ID N°:21 >VHML 34  
 MAGLKLQFTEAGLAEISAKEQGIKGAISHLAFGDMAYTPNKSQTRLQREQERVEIADYO  
 DGGLSLRMAAVFSGEKEYAIREIGVFLSTGTLGTVYSQSGKTIYRTPSVKVMQWLTLNI  
 TALPSDSVTVVVGTEENLNLILDAEFMESAA SFMRLGAATIRQALWNLQLSEKIRALES

SEC ID N°:22 >VHML 35  
 MGTITEQIESLKTASAEXTAAQALAEVSGKMAAIDKKTNDLSIAKVKSTYDQKANGLTI  
 IATDGYRKAVEHNSGGRNTVIYDAQGNPNIMCVIPRFNIEDLGLTELDLGTGVHPAFVTN  
 GAPRGEILVKGYLASSAAGGS AVIGGPQPRTSVNYDTAKQLCTQKGDNWHLMSIHEWAAI  
 ALWSLANGTVPRGNTNYGRSHEAKWETARRADNGLPGDTSGTGRDGTGKGPATWNHDHTE  
 FGVCDLVGNVWEWIDQMKLDDGQILTTLDNPNPVAEANWHRHPAYFDSTSDNQSGAGNNG  
 SPVLSNSVTKRNGPADDDSHDY PYMHNPHFAAITKSAGYXPNELLRRLLESATATTVGG  
 GLWCRNYGDRFPLRGGYWNNGSSAGLGALYLSYARSNSNSSIGFRPAFFV

SEC ID N°:23 >VHML 38  
 MFSYIFQGRTHDTRSYMNSLGMTQEQVDSVLQKQDFEEAQLVVKRQEAYRLES DPLFM  
 EWQYDNTPESEQAWRDKVAEIKARYPLPSES

SEC ID N°:24 >MTD  
 MSTAVQFRGGTTAQHATFTGAAREITVDTDKNTVVVHDGATAGGFPLARHDLVKTAFIKA  
 DKSAVAFTRTGNATASIKAGTIVEVNGKLVQFTADTAITMPALTAGTDYAIYVCDGDTVR  
 ADSNFSAPTGYTSTTARKVGGFHYAPGSNAAAQAGGNTTAQINEYSLWDIKFRPAALDPR  
 GMTLVAGAFWADIYLLGVNHLTDGTSKYNTIADGSASPCKSTKFGGDGSAAYS DGAWYN  
 FAEVMTHHGKRLPNYNEFQALAFGTTEATSSGGTDVPTTGVNGTGATSAWNI FT SKWGVV  
 QASGCLWTWGNFEGGVNGASEYTANTGGRGSVYAQPAAALFGGAWNGTSLSGSRAALWYS  
 GPSFSFAFFGARGVCDHLILE

FIG. 11D

SEC ID N°:25 >gen H de P2  
 MSYKFRVTIVITAGAAKLAATAPGRRKVGITTMVAVDGGGKLPVDPAGQTGLIHEVVRHA  
 LNKI SQDKRNSNYIIAELVIPPVEVGGFWMRELGLYDDAGTLIAVANMAESYKPALAEGSG  
 RWQTCRMVIVSSVASVELTIDTTTVMATQDYVDDKIAEHEQSRRHDPASLTAKGFTQLS  
 SATNSTSETLAATPKAVKAAAYDLANGKYTAQDATTARKGLVQLSSATNSTSETLAATPKA  
 VKTVMDETNKKAPLNSPALTGTPTTPTARQGTNNTQIANTAFVMAAIAALVDSPPDALNT  
 LNBLAAALGNDPNFATTMTNALAGKQPKDATLTALAGLATAADRFPYFTGNDVASLATLT  
 KVGRIILAKSTVAAVIEYLGLOQETVNRAGNAVQKNGDTLSSGGLTFENDSILAWIRNTDWA  
 KIGFKNDADGDTDSYMWFFETGDNGNEYFKWRSRQSTTTKDLMTLKW DALNLVNAVINGC  
 FVGTTNALGGSSIVLGDNDTGFKQNGDGI LDVYANSQRVFRFQNGVAIAFKNIQAGDSK  
 KFLSSSNTSTKNIITFNLWGASTRPVVAELGDEAGWHFYQRNTDNSVIFAVNGQMOPSN  
 WGNFDSRYVKDVRVRLGTRVVQLMARGGRYEKAGHTITGLRIIGEVGDDEAIFRPIQKYIN  
 GTWYNVAQV

SEC ID N°:26 >gen G de P2  
 MQHLKNIKSGNPKTKEQYQLTKNFDVIWLWSEDGKNWYEEVKNFQPDITIKIVYDENNIIV  
 AITRDASTLNPEGFSVVEVPDITSNRRADDSGKWMFKDGAVVKRIYTADEQQQQAESOKA  
 ALLSEAEVNIQPLERAVRLNMATDEERARLESWERYSVLVS RVPANPEWPEMPO

SEC ID N°:27 >R2-P2 1-164:158-669  
 MATNTPKYGGLTDIGAAALATASAAGKKWQPTHMLIGDAGGAPGDTDPDPLPSAAQKSLI  
 NORHRAQLNRLFVSDKNANTLVAEVVLPVEVGGFWIREIGLQDADGKFAVSNCPSPSYKA  
 AMESGSARTQTI RVNIALSGLENVQLLDNGI IYATQDWVKEKLAEHEQSRRHDPASLTA  
 KGFTQLSSATNSTSETLAATPKAVKAAAYDLANGKYTAQDATTARKGLVQLSSATNSTSET  
 LAATPKAVKVTVMDETNKKAPLNSPALTGTPTTPTARQGTNNTQIANTAFVMAAIAALVDS  
 SPDALNTLNELAAALGNDPNFATTMTNALAGKQPKDATLTALAGLATAADRFPYFTGNDV  
 ASLATLTKVGRDIILAKSTVAAVIEYLGLOQETVNRAGNAVQKNGDTLSSGGLTFENDSILAW  
 IRNTDWA KIGFKNDADGDTDSYMWFFETGDNGNEYFKWRSRQSTTTKDLMTLKW DALNLV  
 NAVINGCFVGTTNALGGSSIVLGDNDTGFKQNGDGI LDVYANSQRVFRFQNGVAIAFKN  
 IQAGDSKKFLSSSNTSTKNIITFNLWGASTRPVVAELGDEAGWHFYQRNTDNSVIFAVN  
 GQMOPSNWGNFDSRYVKDVRVRLGTRVVQLMARGGRYEKAGHTITGLRIIGEVGDDEAIFR  
 PIQYINGT WYNVAQV

SEC ID N°:28 >gen H de L-413c  
 MSTKFKTIVITAGAAKLAATVPGGKKNLSAMAVDGNKGLPVPDAGQTKLVHEVVRHA  
 LNKVSDNKNKNYI VAEVLVPPVEVGGFWMRELGLYDDAGTLIAVSNMAESYKPELAEGSG  
 RAQTCRMVILSNVASVELSIDASTVMATQDYVDDKIAEHEQSRRHDPATLTKGFTQLS  
 SATNSTSEKLAATPKAVKAANDNANSRLAKNQNGADIQDKSAFLDNIGVTSLTFMKHNGM  
 IPTTDNLD SYGPEEKYLG TWSCPSQSTAKPESGY PEDKNGVLEVFNAGRPHCTQRYTTR  
 TGNIIYIRMLDAEWNPASPTWSAWRVITSGTRPLSTSIDLNSLGGAEHLGIWRNSSTS IAS  
 FERHFPEDGSFGQGI LEVFEGLYGRMORYTTRSGTMYIRGLTASWDAENPQWEDWIAVG  
 YQSTGWYSGDLLDLKPGIYSVTKQATNAPVTD SKDLAVGSI VEVKKRC DIESYIQTYT  
 TVSATDAYKNRTFORTRASGEADWGEVAEVYNSKSL LTKLVGGVTDRLSSLDWQTYDFV  
 PGSMITVRLSDMTNI PDGMEWGVIDTNLINITVGPSEGGVARSMQVWRSTSNKNTYRFF  
 TVRLYGNPGERSFNIRRLPIIDEAQTWEAKQTFSAGLSGELSGNAATATKLTARKINNV  
 SFDGTS DINLTPKNIGAFASGKTGDTVANDKAVGWNWSSGAYNATTGGASTLILHFNIGE  
 GSCPAAQFRVNYKNGGIFYSARDGYGFEADWSEFYTTTRKPTAGDVGALSLSGGQLNGA  
 LGIGTSSDLGGNSIVLGDNDTGFKQNGDGNLDVYANSVHVMR FVSGSIQSNKTINITGRV  
 NPSDYGNFDSRYVRDVRVRLGTRVVQTMQKGVMEKSGHVITGLIVGEVDGDDPAVFRPIQ  
 KYINGT WYNVAQV

SEC ID N°:29 >gen G de L-413c  
 MQHLKNIKSGNPKTKEQYQLTKNFDVIWLWSEDGKNWYEEVSNFQEDT IKIVYDENNIIV  
 GITRDASTFNPEGFSVVEVPDITANRRADDSGKWMFKDGAVIKRIYTADEQQQQAESOKA  
 ALLSEAEVNIQPLERAVRLNMATDEERSRLEAWERYSVLVS RVPANPEWPEMPO

FIG. 11E

SEC ID N°:30 >R2-L-413c 1-164:158-913  
 MATNTPKYGGLLTDIGAAALATASAAGKKWOPHMLIGDAGGAPGDTDPDPLPSAAQKSLI  
 NQRHRAQLNRLFVSDKNANTLVAEVVLPVEVGGFWIREIGLQDADGKFAVAVSNCPSPYKA  
 AMESGSARTQTRVNIALSGLENVQLLDNGI IYATQDWWKEKVAEHEQSRRHDPATLTE  
 KGFTQLSSATNSTSEKLAATPKAVKAANDNANSRLAKNQNGADIQDKSAFLDNIGVTSLT  
 FMKHNGMIPTTDNLDSDYGPPEEKYLGTWSCSPSQSTAKPESGYPEDKGNVLEVFNAGRHC  
 TQRYTTRTGNIIYIRMLDAEWNPASPTWSAWRVITSGTRPLSTSIDLNSLGGAEHLGIWRN  
 SSTS IASFERHFPEDGSFGQILEVFEGLYGRMQRYTTRSGTMYIRGLTASWDAENPQW  
 EDWIAVGYQSTGWTYSGDLDDLKPGIYSVTKQATNAPVTDKDLAVGSIVEVKKRCDIE  
 SYIQTYTTVSATDAYKNRTFQRTASGEADWGEVAEVYNSKSLTTLKLVGGVTDRLSSLD  
 WQTYDFVPGSMITVRLSDMTNIPDGMEWGVIDTNLINITVGPSEGGGVARSMQVWRSTN  
 KTNRYFFTVRLYGNPGRS FNIRRLPI IDEAQTWEAKQTF SAGLSGELSGNAATATKLKT  
 ARKINNV SFDGTS DINLTPKNIGAFASGKTGDTVANDKAVGWNWSSGAYNATTGGASTLI  
 LHFNIGEGSCPAAQFRVNYKNGGIFYRSARDGYGFEADWSEFYTTTRKPTAGDVGALSLS  
 GGQLNGALGIGTSSDLGGNSIVLGDNDTGFKQNGDGNLDVYANSVHV MR FVSGSIQSNKT  
 INITGRVNP SDYGNFDSRYVRDVR LGTRVVQTMQKGV MYEKSGHVITGLGIVGEVDGDDP  
 AVFRPIQKYINGTWYNVAQV

SEC ID N°:31 >fibra caudal de T4 (ep37)  
 MATLKQIQFKRSKIAGTRPAASVLAEGELA INLKDRITFKDSDGNIIDLGFAKGGQVDG  
 NVTINGLLRLNGDYVQTGGMTVNGPIGSDTDGVTGKIFRSTQGSFYARATNDTNSAHLWFE  
 NADGTERGVIYARPQT TTDGEIRLRVRQGTGSTANSEFYFRSINGGEFQANRILASDSL  
 TKRIAVDTVIHDAKAFGQYDSSHSLVNYVYPGTGETNGVNYLRKVRKSGGTIYHEIVTAQ  
 TGLADEVSWWSGDTFVFKLYGIRDDGRMIIRNSLALGTF TTNFPSSDYGNVGVMDKYL  
 LGDVTGLSYKKTGVFDLVGGYSVASITPDSFRSTRKGI FGRSEDQGATWIMPGTNAAL  
 LSVQQTADNNAGDGO THIGYNAGGKMNHYFRGTGQMNINTQOGMEINPGILKLVTSNN  
 VQFYADGTISSIQPIKLDNEIFLTKSNNTAGLKFGAPSQVDGTRTIQWNGGTREGQNKNY  
 VIKAWGNSFNATGDRSRET V FQVSDSQGYFYAHRKAPTGETIGRIEAQFAGDVYAKG  
 I IANGNFRVVGSSALAGNVMTMSNGLFVQGGSSITGQVKIGGTANALRIWNAEYGAIFRRS  
 ESNFYIIP TNQNEGESGDIHSSLRPVRIGLNDGMVGLGRDSFIVDQNNALTTINSNRIN  
 ANFRMQLGQSAYIDAECTDAVRPAGAGSFASQNNEDVRAPFYMNI DRTDASAYVPILKQR  
 YVQNGCYSLGTLINNGNFRVHYHGGGDNGSTGPQTADFGWEFIKNGDFISPRDLIAGKV  
 RFDRGTNITGGSGNFANLNSTIESLKT DIMSSYP I GAPIPWPSDSVPAGFALMEGQTFDK  
 SAYPKLAVAYPSGVI PDMRGQTIK GKPSGRAVLSAEADGVKAHSHSASASSTDLGTKTTS  
 SFDYGTKG TNSTGGH THSGSGSTSTNGEHSYIEAWN GTGVGNKMSSYAI SYRAGGSNT  
 NAAGNHSHTFSFGTSSAGDHSHSVIGIAHTHTVAIGSHGHTITVNSTGNTENTVKNI AFN  
 YIVRLA

SEC ID N°:32 >Chaperona de T4 (qp38)  
 MKIYHYFDTKEFYKEENYKPVKGLGLPAHSTIKKPLEPKEGYAVVFDERTQDWIYEEDH  
 RGKRAWTFNKEEIFISD IGSPVGITFDEPGEFDIWTDDGWKEDETYKRVLI RNKIEELY  
 KEFQVLNMMIEASVANKKEKFFYKLNKRFFALLEKHEHLGGEFFSWPEKEQKRPYKRLFK  
 HYV

FIG. 11F

SEC ID N°:33 >conjunto de fibra caudal de AB17  
 MATLKQIQFKRSKTAGARPAASVLAEGELAINLKDRVLFKDDQGNIDLGFAGKGSIDG  
 NVIHTGNYNQTDYTLNGVFTQTGNFNLTGIARVTRDIIAAGQIMTEGGELITKSSGTAH  
 VRFDDNNSRERGIYAPANDGLTQVLNIRVQDYAAGSESTYAFSGSGLFTSPEVSAWKS  
 ISSPQILTNKVITNNKSTGDYDIYSMADNVPLSESTTAINHLRVMRNAVSGSIFHEVKDN  
 DGITWYSGDGLDAYLWSFTWSSGKISSHSISIGLTPGNKDYSILGPSIALGDNDDTGFKW  
 HQDGYFVSVNNGTKTFLFNPSETTSLRKFVAGYSTNGTDLTTPPTENYALATVVVYHDNN  
 AFGDQQLLGGYQGGNYHHYFRGKGTNNINHGGLLVTPGNIDVIGGSVNIIDGRNNSSTL  
 MFRGNTTGYSSVDNMDIKVWGNFVDPSSGGIRKNIMEISDATSWMSYIQRLLTGEVEMNV  
 NGSFESSGVTAGDRGVHTTGEISSGAVNALRIWNADYGAIFRRESEGLHIPTAYGEGKN  
 GDIGPLRPFSLALDTGKVIIPDLQSSYNTFAANGYIKFVGHGAGAGGYDIQYAAQAPIFQ  
 EIDDDAVSKYYPYIKQKFLNGKAVWSLGTTEINSGTFV IHHLKEDGSQGHSTRFNQDGTVN  
 FPDNVSVGGGEATIARNNGNIWSDIWKTFTSAGDTTNIRDIAIATRVSKEGDTMTGTLWINK  
 DAAGIVLNPPLTSDSSFIRSDTAGANNWYIGKGGADNGLGFYSYVTOGGVYITNNGEISL  
 SPQGGQTFNFNRDRHLINGTQWAAHQGGGWNQWNEAPVFDVDFGNVGNDSYYPYIKGKS  
 GITNEGYISGVDFGMRRITNTWAQGIIRVGNQENGYDPPQAVYEFHHNGTFYAPSLKSSR  
 VSAGGDPFAGWGPCIVLGDNDTGLLWENDGIFNAYANGQGVFSFRPGLAQTFGDVNFHCN  
 AGMYVRDNDVNDVYIRSDIRCKSEIKLIKNAQEKSKLLGGYTYLLKNSVTDEVKPSAGL  
 IAQEVQVLPPELVEDKETGLRLNNGYIIGLNTAAINEHTDEIKELKSEITELKALIKS  
 LIK

SEC ID N°:34 >conjunto de fibra caudal de AB17  
 MAVVGIPGWIGTSAVAETGQRWMTAASRELRLGNPSWMSQFAGRSREIHTLGDHNFNG  
 QWFRDRCFEAGSAPIVFNITGNLVSYSKDVPLFMYGDTNPNEYVTLNIHGGVHMWGRGGN  
 GTVNGNPGTNGGDVIQNDIGGRLRIWNYGVIASGGGGGAVSLXNSWAPNATAGGGGGRP  
 FGIIGGGVNWPGGNASYDAPGGAGYTSQFGGGNGGDAGGRGGDGNHLSRSGGAPGRA  
 VFGSSPSWGATGTIYGSWI

SEC ID N°:35 > OpmQ  
 MKNLSLISACLLLGACGSTPAPLDSGLAAPSOWRYLAAGRSDASDIRQWWKAFGAPELDS  
 LLQRALLNSQDLGAAVARVRQAQASAVIAGAPLLPELNATLGASRQLLRDSGYSGTDTAT  
 SDNDAVDSFSAGLSASYEVDVFWGGRQAAYRSALSLKASEYDRATVELTLLSGVANSYLQ  
 VLALREQQRIARLNLDNAEHLVRLVETRHAAGSATALEVAQQSSLVASQRKQLPPLLEQQA  
 HEALITLTLIGEPVQALQVAERPFDSLRLWPETGAGLPSELLSRPDIANAEEAQLAAAQA  
 DVQVARAALFPKLTLSASLSSGANRAADTFRNPNYNLGANLLAPIFNHGRRLRAERDRSLA  
 RQEELEETRYKAILTAFADTERSLSIDGLDRQLHWQQELEQAQRAFDSLDSRYQAGAE  
 TLLTVLETQRTLYAAQDAAVQLRLARLQASVGLYKALGGGWQSDRQGLARKD

SEC ID N°:36 > OpmB  
 MKHTPSLLALVAALGGCAIGPDYQRPDLAVPAEFKEAEGWRRABPRDVFQGAWWELY  
 GDQTLNDLQMHLESNQTLAQSVAFRQAEALVRGARAFAFFPSITGNVKGTRSGQGGGDS  
 TVLLPGGSTVSSGGGAI STSYSTNLSVSWEDLVGKLRRLQLEANQASLHASAADLAAVR  
 LSQOSQLAQNLYQLRVMDEQIRLLNDTVTAYERSLKVAENKYRAGIVTRADVAQARTQLK  
 STQAQAI DLKYQRAQLEHAI AVLVLGPPAQFNLPVAVSVPKLPDLPAVVPSQLLERRPDI  
 ASAERKVISANAQIGVAKAAYFPDLTLSAAGGYRSGSLSNWISTPNRFWSIGPQFAMTLF  
 DGGGLIGSQVDQAEATYDQTVATYRQTVLDGFREVEDYLVQLSVLDEBSGVQREALESARE  
 ALRLAENQYKAGTVDYTDVVNTQATALSNERVTLTLLGSRLTASVQLIAAMGGGWDSADI  
 ERTDERLGRVEEGLPPSP

SEC ID N°:37 OpmJ  
 MPLASHLRCVALALGISTALGCANRNQAPAPRAESLDPGLSRVAGTRGDALPAQWWTLYQD  
 PGLNHLVAAALRHNRDLAAADAHARALLGHLRGAQGERWPERTEVGYQYGRDGDQTLA  
 EATDEDLHSQWKHTVRLDLSYQLDLWGEVRRARIAAKADAEAAQAARDLLRVSVASQTTL  
 AYVRACALARRAEVQRSSVGLLDASLALSERQLAAGLSSELQRRRLLALRERTRALPML  
 EARRRAALYELALLSGRSPRQLDAPATCAGIPQLRRALPTGDGWSLLARRPDVRAAERR  
 LAAADARRALAEAEYPRISFVGAETSAATLAGLGGSGALAYAAGPLL SWRFPPNRESAR  
 GRLDSAAAERDAALARFDGAVLGALREVERALALYAGERQRRADLQRALDEQRHAYRLAR  
 SNYRAGALDALELLDSQRSLVADRARLVDAEMRVAERQVELFRALGGGWQAASSPSHQEN  
 GQ

FIG. 11G

SEC ID N°:38 > OpmG

MPFPLLHPWQRLALASAILLAAGCVTSEGLEPNARLQFAGALQAGRSLDGVALSPAAWP  
 RQDWTWGLGDRQLDQLIGEALQGTDLQIAEARARQAAATAQAQDAARQPTLDAKASYSG  
 IRAPTSVAPAPLGGRYSAIKYLSLGFNYDFDLWGGERAWEAALGQANAARIDSQAARIG  
 LSASITARAYSDLAHAFTVRDLAEELKRSQRMTELSQKRMSAGLDSKVQLQQTQTQLATA  
 RQQLSAAEQDIASARIALAVLLGKGPDRGLELQRPQPLNPASLSLPSVLPAILLGRRADI  
 VAARWRVEAARRNIDSAKTEFYPNLNLGAMAGLALHTSDVLQAPSRFFQVAPATSLPIF  
 DGGRRRANLAERDADYDLAVGQYNKTLVQALGEVSDDLGKLRSLQEQVIDQRQARDIARS  
 NFDLAMRRYGEVGSYLDALSVQQLLVAERQLASLESQQIDLSVQLVQALGGGFQPDSSR  
 SAALATAKAPAE

SEC ID N°:39 > OpmI

VPRALRKELTLVGSFVGFVVFSAISGCVSTGDIAPFAATLDANALATDHAIQAAAREAG  
 WPQARQWVKVYADPQLDAWIEKALDGNPGLAVAHARVRQAKSMAGLVESIESPQIEGKGS  
 VRHRWPDYFYGPGDLARTTSWNNSTEIGLNYKLDLWGRDRSDSERAVDLAHMAAAEARQ  
 AQLELEGNIVRAYVQLSQAEMDIKAMLQOQORDILALAQRRRLRGGIGTHFEVSQAQV  
 LPETERRIEVIDEETQLTRNLLAALAGKGPGEGRITIRPPLNLAAQPSLPSALPAELLGR  
 RPDVVARRWQVAALAKGVVVARADFYPNVDLMASVGFSAVGGGMLEFFRSKYTYSAGPA  
 VTLPIFDGGRRLRSQLEAAAGYDAAVEQYNQTLVDALKNISDQLIRLHSVDIQKDFAAQS  
 VASAQKTYDIATLAYQRGLTDYLNVLNAQTRLFQOQLVQEQVQAARLAHAHSLTLALGGG  
 VGAGADTPAQRKLAFENVPVRAVSSR

SEC ID N°:40 > OpmH

MLRRLSLAAAVAAATGVAWAAQPTPLPTKTDLISVYKEAVDNNADLAAAQADYLARKEVV  
 PQARAGLLPQLGAGARVGDTRIAFDERPATVKRNSQVVQATLSQPLFRADRWFWQAAAKE  
 TSDQARLEFSATQOQLILRSAETFTVLRQDNLATSKAEEAAFKRQLDQANERFDVGLS  
 DKTDVLEAQASYDTARANRLIAEQRVDDAFQALVTLTNRDYSIEGMRHTLPVVPAPND  
 AKAWVDTAVQONLRLASNYAVNAABETLRQRKAGHLPTLDAVAQYQKGDNDALGFANSA  
 ANPLVHYGKYVDERSIGLELNIPIYSGGLTSSQVRESYQRLNQSEOSREGORRQVQDTR  
 NLHRAVNTDVEQVQARRQAIISNQSSLEATEIGYQVGRNIVDVLNAQRQLYAAVRDYNN  
 SRYDYILDTRLKQAAGTSLSPADLEALSAYLKQDYDPDKDFLPPDLAKAAAEOLQSKPRQ  
 QY

SEC ID N°:41 > OpmK

MRALAGLLCGLLGLVPGAAAYEPDVFGTGQVAGQAVYDLGGSGLPCRGGPPPTLESL  
 AIERILCHDPQTRLAWANAKAQAAQVIGKSAYLPRLDGRLDASRGYSMDYRDAPYLSG  
 DGHRRRGASLQLSWVLFDFGRRSAALRNAQQLLLAANASQDATLQNTFALAAQAYYDAL  
 AAQRSLAASRQVAELAAQNLEAADAKYRAGAALSDRLQAQTALSQASLAQVRDEGALS  
 ALGVIALRMGLAPDTPRLRSGELEAQPDGTGFVKAIDEMLAEARREHPALLAAQARLAAA  
 ASVEESRAAGRPSLALSANLARSHSDQAMAFNGDTRERDRS IGLQLNIPLFEGFERTYQV  
 RNALARREASEAELADTEQQVSLEVWNNYQSLSVETRSLARTRELVEQSRQSLEVVQGRY  
 RSGVGSMIELLNALTAYASAEDQHIRALGNWQTSRLRLAASLGRLLGFWSLR

SEC ID N°:42 > OpmN

MPILRPLASAGKRACWLLMGLCLGLPALANEAPVSFNGTSSISLEQALERALRSNPFLAAV  
 GRETEIASGARQQAGLIPNPDLSWSVEDTRQGNRQTSVSIAPLELGGKRGARVEVAKRG  
 SEIAWTQLEVRRAELRAQVRGAYYAALTAQERVRLAKTSLDLARRALQAADRRVKAGSIS  
 SVERVRAQVLADNAQLDLSQAELEQRTYVQLSSTWDEFPQPFARVGGALDAVPASITRG  
 ALLRHLDESPTLRLAAQEVARGEAVDLEKRQRIPNLTVSIKSKYDQTARDGRGERVNL  
 GLSMPLFLFDRNQGNIYAAQSRADQARDLQRATLLRLRSEAVQAYDQLRTSEQELAVRR  
 DLLPGAQSALDSMTRGFEMGKFNFLDVLDAQRTLGVVRAQYVRLDAAAQARVSMERLLG  
 EDIGHLGQ

FIG. 11H

SEC ID N°:43 > OpmF

MNRWGLGVLWLVLTALPVAASVNPALSPDVPSMAREQGRSVLLSEQVIDLSLSDAVYLGLR  
 NNRGIRSAYLQRIAQKFDLRVAADAFNPKLVVRGDYRANRATEDRTRTSNVSPATLLGE  
 YGTRFSLAWVKQFRTADEAGRYRS DGLDLTVVQPLLRDAGWDVTTAPLRLARLSEANRL  
 QLKASVSQTTISQVIGAYRELLRAEQARIAREALARTQELLEVNKAMIRAGRMAEFEIVQ  
 TEADVASQELNVEESTNQVDSARLALLQLLALDLSTQIRASDALAATPIEVDRQQAIRTA  
 LQQQPEYLQRLIGSRQADLNLVLAKNQRLWDVSLVGGASQIRDRYSEGGGDNRSRWSWSYA  
 GVQVEIPIGDLRRQAEVRAQVDVENQKILIEDARQTLQNVIDAVRDLGTRWRQYQIAQ  
 RATALSRRKLEIEREKLVRGRSSNFQVLSFETDLRNVENTQLNALISFLNAQTQLDLIVG  
 MTLDSWEISLNDH

SEC ID N°:44 > OpmL

MRGRRQYARKGRRHGKGAIWLLSLGLPMFASAMPLDQAVRAGLAIHPEVRSAMAEADRAG  
 TEVEMAKGGYYPVMTSGGPOEFDFGEIVYDLTASQMLYDWGRVTSKVDSASATQKLS  
 AVLVARDDAALDIVETYLDVLA SERRVEAVREHIQRLDGIEMTQARGGDGYADRSELDR  
 ANLELSRAEQLSLEKGNLQDARNQYAILVGQEPADLVEPEPMSLQRYLAASDMARVIRE  
 SPLQRKALEDANVAEAEVREAKASLLPQLNLEASALRREIGGHPESDSVSLRFRMDTFQ  
 GLSNFRRPTAAQQRLES AKWSADAMQRDIRRQLQNLFDNGDTLRWREQSQTQVTESEQV  
 GELYREQFEVGRRDVIDLLNVQRRERFEAERQLINLRIERKRIEYRAAAQVGLLELLENR  
 LNHGS

SEC ID N°:45 >gen H de phiCTX

MTSPKYGGLLTDIGAAALIAASEAGKKWQPTHMLIGDAGGAPGETADPIPSAAQTKLIRQ  
 RYRAQLNRLFVSEQSANVLVAELVLPMAIGGFWIREIGLEDADGKFVAVANCPSPFKASV  
 ESGSARTQTI RRVQIILSGMEHVELIIDDGIVYATQDQVVTAKVAADF KGRKVLAGNGLVGG  
 GDLSADRTIALPASGVGAGTYRAVTVNANGIVTAGSNPTTLGGYGITDALHASEAVTTPT  
 ANKLLRLNAAGLLPASITGNAATASRLAAPTLSASGDATWSARFDGATNVNGVLTANS  
 GVTAGTYAKVTVNAGLVTGATGLVASDIPALDAGKITSGILPAARGGTGNGIGQAATAV  
 KLVAPRTIYLGDDVSGSTTFDGSANAGITVTLANGV NAGSYPKVTVNAGLVTGGGLTA  
 ADIPALDASKIATGRDLERLPLVSQGLATAVHTSVDPNSVVIPLVLTNHANGPVAGRY  
 YIQTMFYPTVEGNATQIATGYAGVADMYVRYAYASPATTDSSKREWSAWVRCDLGGFAH  
 APDGELGGYVNLDSMIASGWWHQFFTANAKNGANYPVGEAGLLTVHAPTASMIYQTYRGY  
 AAGGLYWRCRYNGTWSAWYRAWDSGNFNPNANYVAKSEYSWASLPKPSNFPSPVHVHSA  
 SRGVSGWYKNDTGVIFQWVNLISGDHPGGVIDRVVTFPIAFPNA CLHVVPTVRENGRPA  
 IPASTVTVAEKARTATNCTIVSSEYIGNVQNFGINVFAIGY

SEC ID N°:46 > AV085

GCTTCAATGTGCAGCGTTTGC

SEC ID N°:47 > AV088

GCCACACCGGTAGCGGAAAGGCCACCGTATTTCCGGAGTAT

SEC ID N°:48 > AV087

ATACTCCGAAATACGGTGGCCTTTCCGCTACCGGTGTGGC

SEC ID N°:49 > AV086

TCCTTGAATTCGCTTGCTGCCGAAGTTCTT

SEC ID N°:50 > AV110

TTTATTAGCGGAAGAGCCGACTGCACGGTGCACCAATG

SEC ID N°:51 > AV114

CCCTCGAATTCATGAATACTGTTTCTGTGTGAAATG

SEC ID N°:52 > AV118

CTTCCTTTCATGACGACCAATACTCCGAA

SEC ID N°:53 > AV116

ACCACGAATTCATCGTCCAAATGCCTC

FIG. 11I

SEC ID N°:54 > AV107   
CACCATCTAGACAATACGAGAGCGACAAGTC

SEC ID N°:55 > AV091  
TCCTCAAGCTTACGTTGGTTACCGTAACGCCGTG

SEC ID N°:56 > AV127  
TTCTTTAAGCTTTTCCTTCACCCAGTCCTG

SEC ID N°:57 > AV124  
CCTCCTGAATTCTTATTGCGGCATTCCG

SEC ID N°:58 > AV126  
TCCTTCGAATTCTTACACCTGCGCAACGT

SEC ID N°:59 > AV125  
CCTCCTGAATTCTTATTGCGGCATTCCG

FIG. 11J