

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 830**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C40B 30/06 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2011 E 11726355 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2582813**

54 Título: **Métodos de generación y examen para polipéptidos quiméricos líticos**

30 Prioridad:

18.06.2010 EP 10006360

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

19.07.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SCHERZINGER, ANNA;
MOLINARO, SONJA y
BUCHBERGER, BERND**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 577 830 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

Métodos de generación y examen para polipéptidos quiméricos lífticos

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a métodos de generación y examen para polipéptidos quiméricos, que comprenden al menos un dominio de unión a células (CBD) y al menos un dominio activo enzimático (EAD) que tiene actividad líftica de pared celular bacteriana. Los polipéptidos quiméricos lífticos que pueden obtenerse mediante los métodos de la presente invención son útiles en la terapia y la profilaxis de colonización bacteriana patogénica, incluyendo infecciones bacterianas y enfermedades bacterianas. La presente invención también se refiere a una biblioteca de de polipéptidos quiméricos que pueden obtenerse mediante los métodos de la presente invención.

Antecedentes de la invención

El número rápidamente creciente de bacterias resistentes a antibióticos constituye un reto cada vez mayor para la medicina y los sistemas de atención sanitarios en todo el mundo. El uso de endolisinas derivadas de bacteriófagos para el tratamiento de infecciones bacterianas es una alternativa prometedora para superar el creciente número de resistencia a antibióticos en bacterias. Se han designado lisinas de bacteriófagos usando diversos nombres incluyendo lisinas, lisinas de fagos, virolisinas y endolisinas. Estructuralmente, las lisinas se encuentran comúnmente como proteínas modulares con al menos un dominio que confiere la actividad enzimática para hidrolizar uniones específicas en la capa de mureína o peptidoglicano de la pared celular bacteriana (dominio activo enzimático - EAD), y un dominio que confiere especificidad de unión a un epítipo de la superficie celular (dominio de unión a células - CBD). Por tanto, los miembros de la familia lisina (hidrolasas de peptidoglicano o pared celular) presentan un diseño modular en el que un dominio catalítico se fusiona a un dominio de unión o que media especificidad.

El uso de endolisinas para destruir bacterias se dio a conocer por primera vez por Gasson en 1991 (documento GB 2 255 561). Nelson *et al.* 2001 han descrito aplicaciones terapéuticas y profilácticas adicionales, incluyendo sistemas de modelos animales. Este trabajo describe una aplicación tópica de endolisinas contra estreptococos y neumococos del grupo A en tratamiento oral y nasofaríngeo. En el campo del tratamiento de estafilococos con lisinas derivadas de bacteriófagos, Rashel *et al.* 2007 han mostrado que la endolisina del fago phiMR11 puede erradicar MRSA en orificios nasales de ratones y protege a los ratones de muerte séptica mediante inyección intraperitoneal. En el documento US 5.997.862 se describen regímenes de tratamiento y composiciones farmacéuticas adicionales para tratar y prevenir infecciones bacterianas usando lisinas derivadas de fagos. Sin embargo, en todos los ejemplos publicados hasta ahora usando endolisinas derivadas de bacteriófagos para el tratamiento de infecciones bacterianas, la cantidad de proteína para un tratamiento eficaz es muy alta. Esto se debe a la escasa estabilidad de las enzimas y se debe a la inhibición de la actividad en matrices relevantes de aplicación.

En el caso de lisinas contra bacterias *Staphylococcus*, se han clonado y caracterizado varias endolisinas silvestres. Por ejemplo, la proteína 17 del fago P68 es una endolisina de estafilococo, que se notifica que presenta actividad antimicrobiana contra aislados de *S. aureus* incluyendo aislados clínicos (Takac y Blasi 2005). Diversos grupos investigaron la endolisina del bacteriófago phi11 de *S. aureus* en aplicaciones antimicrobianas. Navarre *et al.* 1999 identificaron dos dominios activos enzimáticos (amidasa y endopeptidasa) en lisina de phi11 y mostraron que un mutante con delección del dominio de amidasa todavía es activo. Se han caracterizado mutantes de endolisina de phi11 (y phi12) mediante diferentes ensayos de actividad en paredes celulares de *S. aureus*, bacterias inactivadas por calor y en biopelículas bacterianas (Sass y Bierbaum 2007). Todas estas investigaciones tienen en común que están usando condiciones experimentales artificiales para la caracterización funcional de las endolisinas. Por tanto, no pueden extraerse evidencias en cuanto a la eficacia en células vivas en condiciones relevantes de aplicación a partir de estas publicaciones.

Otra enzima estafilolítica se deriva del bacteriófago phiK. Esta endolisina, denominada lysK, se ha caracterizado en más detalle por los grupos de David M. Donovan y R. Paul Ross (O'Flaherty *et al.* 2005; documento WO 2008/001342; Becker *et al.* 2008; Horgan *et al.* 2009). Han podido demostrar que lysK tiene una amplia actividad bactericida contra bacterias estafilococos vivas sin discriminar entre los diferentes géneros. LysK consiste en un CBD y dos EAD, una cisteína-histidina aminopeptidasa (CHAP) y un dominio amidasa. Al expresar los EAD individuales, pudieron demostrar que el dominio CHAP sólo es suficiente para destruir, pero no el dominio amidasa. Un mutante de delección, sin el dominio amidasa (lysK Δ 221-390), posee la misma actividad de destrucción que la proteína silvestre. Al determinarse los valores de MIC para los constructos de truncamiento/delección, sólo pudieron medirse los valores de MIC para lysK Δ 221-390 y LysK silvestre en medio TSB. El dominio CHAP no mostró sólo actividad medible dentro de una matriz compleja de este tipo. Los valores de MIC determinados fueron considerablemente altos, 78 μ g/ml y 63 μ g/ml para lysK Δ 221-390 y lysK silvestre, respectivamente. Hasta ahora no se ha descrito ninguna lisina quimérica basándose en los dominios de lysK.

Todos los datos publicados usando endolisinas silvestres muestran claramente que estas moléculas son bastante eficaces en destruir bacterias en disoluciones tampón. La ventaja de estas moléculas es el tiempo de comienzo muy rápido (de minutos a horas), y el modo de acción desde el exterior sin implicación de procesos metabólicos dentro

de la célula. De hecho, para las endolisinas, no se ha descrito en la bibliografía la inducción/adquisición de resistencia. Por otra parte, las endolisinas silvestres tienden a ser bastante inestables a temperaturas elevadas y la funcionalidad se reduce en composiciones complejas como medios de cultivo o fluidos biológicos. Todos los valores de MIC (concentración inhibitoria mínima) o valores de MBC (concentración bactericida mínima) publicados están en el intervalo $> 50 \mu\text{g/ml}$. Puede especularse que en muchos casos los valores de MIC no se notifican por motivos experimentales. También pueden encontrarse en bacterias enzimas con propiedades de degradación de pared celular similares a las lisinas de bacteriófago (endolisinas). Las autolisinas son enzimas bacteriolíticas que digieren el peptidoglicano de la pared celular de las bacterias que las producen. Las autolisinas están implicadas en la reconstrucción de la pared celular durante la división de células bacterianas. Aunque potencialmente letales, las autolisinas parecen ser universales entre las bacterias que poseen peptidoglicano. "Autolisina" es el término usado para las lisinas, que se producen por bacterias y que están implicadas en la división celular, mientras que el término "lisina" o "endolisina" se refiere a enzimas líticas, que están implicadas en la liberación de fagos, tal como se describió anteriormente en el presente documento. Las bacteriocinas son moléculas también producidas y secretadas por microorganismos. Son sustancias antibacterianas de naturaleza proteica que se producen por diferentes especies bacterianas. Una subclase de bacteriocinas consiste en enzimas (toxinas proteicas) que se producen por bacterias para inhibir el crecimiento de cepa(s) bacteriana(s) de concurrencia similar o estrechamente relacionada(s) en su hábitat. También contienen CBD y EAD. Las bacteriocinas seleccionan como diana procariontes pero no eucariotas, lo que las hace seguras para el consumo humano.

La bacteriocina lisostafina se produce de manera natural mediante el *Staphylococcus simulans* para combatir al *Staphylococcus aureus*. Es altamente eficaz *in vitro* y puede destruir bacterias en medios complejos (Kumar J. 2008). La lisostafina consiste en un CBD y un dominio de glicil-glicina endopeptidasa, que escinde el puente cruzado de pentaglicinas característico en paredes celulares de *S. aureus*. Esta molécula se ha sometido a prueba en diversos modelos animales y presenta buena eficacia incluso en matrices complejas (Kokai-Kun *et al.* 2007; Kusuma *et al.* 2007). Los valores de MIC notificados de lisostafina son más de 1000 veces inferiores en comparación con lysK ($<0,02 \mu\text{g/ml}$). La principal desventaja de la lisostafina es la aparición de resistencia en *S. aureus*. Hasta ahora se han descrito dos mecanismos de escape genético diferentes. En primer lugar, la incorporación de serina en el puente de pentaglicinas (DeHart *et al.* 1995). En segundo lugar, el acortamiento del puente de glicinas; gly3 o gly2 (Ehler *et al.* 1997; Strandén *et al.* 1997). Puede suponerse que tal marcador de resistencia monogénica se seleccionará rápidamente bajo presión de selección.

Los dominios activos enzimáticos (EAD) pueden encontrarse además en proteínas estructurales de bacteriófagos (enzimas muralíticas asociadas a la cola). Forman parte de la maquinaria de infección temprana del bacteriófago, hidrolizando localmente la pared celular antes de la inyección de ADN.

Con el fin de abordar el hecho de desarrollo de resistencia, los grupos comenzaron a investigar la combinación de diferentes lisinas. Por ejemplo, se han descrito efectos sinérgicos entre lysK y lisostafina (Becker *et al.* 2008), dando como resultado concentraciones eficaces reducidas para destruir *S. aureus*. El inconveniente de este concepto es que en el caso de aparición de resistencia contra un componente (por ejemplo, lisostafina), la concentración del segundo componente ya no será eficaz. Además, una composición con dos componentes activos es difícil de desarrollar y es caro de producir.

Aunque los *estafilococos* y los *estreptococos* pertenecen a las bacterias patogénicas humanas más comunes, *Listeria* son asimismo bacterias patogénicas extendidas de seres humanos y animales, que provocan el patrón de enfermedad de la listeriosis. Las lisinas de fago de *Listeria* se han probado como sustancias antimicrobianas para la descontaminación de listeria. Por ejemplo, el documento WO 2004/004495 describe la lisina de fago de *Listeria*, PlyP100, del fago de *Listeria* P100 y su aplicación satisfactoria en la contaminación de alimentos por *Listeria*. El documento WO 96/07756 describe lisinas de fago de fagos que infectan *Listeria* que muestran actividad lítica sobre la pared celular de bacterias *Listeria*. En particular, el documento WO 96/07756 da a conocer las lisinas de fago de *Listeria* Ply118, Ply500 y Ply511 de los fagos de *Listeria* A118, A500 y A511, respectivamente. Específicamente, se ha demostrado que Ply511 tiene una amplia variedad de hospedadores en una multitud de serovariedades de *Listeria*. El documento WO 2010/010192 describe la lisina de *Listeria* PlyP40 del fago de *Listeria* P40 y su uso como sustancia antimicrobiana en la descolonización de *Listeria*.

Sanz *et al.* 1996 describen la construcción de una hidrolasa de peptidoglicano de neumococo trifuncional quimérica mediante la fusión de un dominio de unión a colina con dos módulos catalíticos que proporcionan actividad lisozima y amidasa. Se demostró que los tres módulos pueden adquirir la conformación de plegamiento apropiada en la enzima quimérica de tres dominios y que la actividad de la enzima quimérica es comparable a la de las enzimas parentales.

Tominaga y Hatakeyama 2007 (Appl. Environ. Microbiol. 73(16):5292-5299) dan a conocer un método para obtener bacteriocinas mejoradas mediante intercambio de ADN entre diferentes bacteriocinas de clase IIa, obteniendo una biblioteca de proteínas quiméricas. El documento WO 2007/130655 da a conocer proteínas quiméricas de una enzima de degradación de mureína asociada a la cola (TAME) o una bacteriocina de tipo cola con un dominio de unión a células (CBD) heterólogo obtenido mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio. En Yamabhai 2009 (Biotechnology Journal 4(4):544-553) y Kitamura *et al.* 2002 (Protein Engineering 15(10):843-853) se describen diferentes métodos de generar moléculas intercambiadas que comprenden diferentes dominios de una familia de

proteínas. Además, el uso de soportes sólidos para el ligamiento secuencial de dominios para construir proteínas quiméricas se describe, por ejemplo, en el documento WO 03/040342.

5 Se sabe que es posible una combinación de dominios (CBD y EAD) de organismos de diferentes fuentes. Sin embargo, el fin de tales experimentos de intercambio de dominios siempre fue alterar o ampliar la especificidad de hospedador de las lisinas (Díaz *et al.* 1990; Croux *et al.* 1993; Donovan *et al.* 2006). Hasta ahora, no se han realizado experimentos de intercambio de dominios sistemáticos con EAD derivados de endolisina para obtener moléculas líticas con propiedades mejoradas con respecto a la eficacia, el potencial de resistencia y la estabilidad.

10 La presente invención proporciona satisfactoriamente métodos de generación y examen para polipéptidos quiméricos líticos, que pueden usarse en el control de contaminación, colonización e infección bacteriana. Los métodos según la presente invención permiten la generación e identificación de polipéptidos quiméricos líticos nuevos y altamente eficaces como sustituto de antibióticos o sustancias de destrucción de bacterias.

Sumario de la invención

15 El uso de dominios líticos de una endolisina de bacteriófago, una bacteriocina o una autolisina bacteriana, específicamente dominios líticos de bacteriófago derivados de endolisinas, para el tratamiento de infecciones bacterianas es una alternativa prometedora para superar el número creciente de resistencia a antibióticos en bacterias. Tal como mostraron en principio varios investigadores, es posible destruir bacterias *in vitro* y en modelos animales. La ventaja de tales proteínas líticas es el rápido comienzo de acción y el menor riesgo de desarrollo de resistencia contra estas enzimas.

20 Según, entre otros, Sanz *et al.* 1996 y basándose en la teoría modular de la evolución de proteínas, los inventores de la presente solicitud se dirigieron a la construcción de enzimas quiméricas líticas completamente activas con propiedades biológicas mejoradas, que pueden usarse en el tratamiento y la profilaxis de contaminación, colonización e infección bacteriana patogénica. Los métodos de la presente invención proporcionan medios de generación y examen para tales polipéptidos quiméricos líticos mejorados basándose en la reunión aleatoria de dominios de unión a células y dominios activos enzimáticamente funcionales que presentan actividad lítica sobre paredes celulares bacterianas.

25 La presente invención proporciona satisfactoriamente métodos novedosos de generación y examen para polipéptidos quiméricos, que pueden usarse en el tratamiento y la profilaxis de contaminación, colonización e infección bacteriana patogénica. Los métodos novedosos se basan en la recombinación aleatoria de dominios de proteínas, y los polipéptidos quiméricos que pueden obtenerse mediante los métodos según la invención se caracterizan porque comprenden al menos un dominio activo enzimático y al menos un dominio de unión a células. Por tanto, la presente invención proporciona combinaciones novedosas de EAD y CBD de diferentes fuentes u orígenes y permite generar y examinar polipéptidos líticos quiméricos con propiedades mejoradas en cuanto a la unión a y/o lisis de células bacterianas. La presente divulgación también proporciona una biblioteca de polipéptidos quiméricos que pueden obtenerse mediante los métodos de la presente invención.

35 La invención se define en las reivindicaciones.

El primer aspecto de la invención comprende los siguientes puntos:

[1] Un método de examen para un polipéptido quimérico lítico que comprende las etapas de:

40 (a) proporcionar una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un dominio de unión a células (CBD) y una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un dominio activo enzimático (EAD) y opcionalmente una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un CBD y al menos un EAD, en el que el EAD se selecciona del grupo que consiste en

(i) el dominio lítico de una lisina de bacteriófago,

(ii) el dominio lítico de una bacteriocina,

(iii) el dominio lítico de una autolisina bacteriana; y

45 (iv) una proteína asociada a cola de bacteriófago que tiene actividad lítica.

(b) amplificar una secuencia de primer (1^{er}) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir diferentes sitios de restricción en el extremo 5' y en el extremo 3', y un marcaje con etiqueta en el extremo 5' o en el extremo 3';

50 (c) amplificar una secuencia de segundo (2^o) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir:

(i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del 1^{er} dominio, y en el extremo 3' un sitio de restricción diferente de los sitios de restricción introducidos

ES 2 577 830 T3

en la secuencia de 1^{er} dominio,

(ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del 1^{er} dominio, y en el extremo 5' un sitio de restricción diferente de los sitios de restricción introducidos en la secuencia de 1^{er} dominio;

- 5 (d) opcionalmente amplificar una secuencia de tercer (3^{er}) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir:

(i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del 2^o dominio anterior, y en el extremo 3' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 5' del 1^{er} dominio,

- 10 (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del 2^o dominio anterior, y en el extremo 5' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 3' del 1^{er} dominio;

en el que el par de cebadores se diseña además de manera que los sitios de restricción sean diferentes en el extremo 5' y en el extremo 3' de la secuencia de 3^{er} dominio;

- 15 (e) opcionalmente amplificar una o más secuencias de dominio adicionales seleccionadas de las secuencias de dominio de (a) para ampliar la serie de secuencias de dominio según las etapas (b) a (d), usando para cada una de dicha una o más secuencias de dominio adicionales un par de cebadores diseñados siguiendo el principio de las etapas (c) y (d) para introducir:

- 20 (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del dominio anterior, y en el extremo 3' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 5' del 1^{er} dominio,

(ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del dominio anterior, y en el extremo 5' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 3' del 1^{er} dominio;

- 25 en el que el par de cebadores se diseña además de manera que los sitios de restricción sean diferentes en el extremo 5' y en el extremo 3' de cada una de dicha una o más secuencias de dominio adicionales;

(f) realizar una digestión de restricción de las secuencias de dominio amplificadas de cualquiera de las etapas (b) a (e) con enzimas de restricción que seleccionan como diana los sitios de restricción introducidos en cualquiera de las etapas (b) a (e), en el que no se realiza una digestión de restricción en el sitio de restricción introducido en un extremo que porta un marcaje con etiqueta;

- 30

(g) ligar las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio digeridas obtenidas en la etapa (f) para obtener un producto de ligación que comprende las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio;

(h) unir el producto de ligación de la etapa (g) a un soporte sólido usando el marcaje de etiqueta de la secuencia de 1^{er} dominio para obtener un producto de ligación unido que comprende las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio;

- 35 (j) ligar opcionalmente la secuencia de 3^{er} dominio digerida de (d) obtenida en la etapa (f) al producto de ligación unido de la etapa (h) para obtener un producto de ligación unido que comprende las secuencias de 1^{er}, 2^o y 3^{er} dominio;

(k) ligar opcionalmente una o más secuencias de dominio digeridas de (e) obtenidas en la etapa (f) al producto de ligación unido de la etapa (j) para obtener un producto de ligación unido que comprende una o más secuencias de dominio adicionales de (e);

- 40

(l) liberar el producto de ligación obtenido en cualquiera de las etapas (h) a (k) del soporte sólido;

(m) clonar el producto de ligación obtenido en la etapa (l) en un vector de expresión;

(n) introducir el vector obtenido en la etapa (m) en un hospedador de expresión, preferiblemente en un hospedador de expresión bacteriano;

- 45 (o) cultivar el hospedador de expresión de la etapa (n) que porta el vector obtenido en la etapa (m) en condiciones adecuadas para permitir la expresión de un polipéptido lítico codificado por las secuencias de dominio del producto de ligación clonado;

(p) seleccionar y aislar un clon de expresión que expresa un polipéptido lítico según la etapa (o) usando la actividad lítica del polipéptido; y

- 50 (q) caracterizar el polipéptido lítico expresado por el clon de expresión aislado de la etapa (p) e identificar un

polipéptido quimérico lítico.

[2] Un método de generación de un polipéptido quimérico que tiene al menos un dominio de unión a células (CBD) y al menos un dominio activo enzimático (EAD), comprendiendo el método las etapas de:

- 5 (a) proporcionar una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un CBD y una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un EAD, y opcionalmente una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un CBD y al menos un EAD, en el que el EAD se selecciona del grupo que consiste en
- (i) el dominio lítico de una lisina de bacteriófago;
- (ii) el dominio lítico de una bacteriocina;
- (iii) el dominio lítico de una autolisina bacteriana; y
- 10 (iv) una proteína asociada a cola de bacteriófago que tiene actividad lítica.
- (b) amplificar una secuencia de primer (1^{er}) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir diferentes sitios de restricción en el extremo 5' y en el extremo 3', y un marcaje con etiqueta en el extremo 5' o en el extremo 3';
- 15 (c) amplificar una secuencia de segundo (2^o) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir:
- (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del primer dominio, y en el extremo 3' un sitio de restricción diferente de los sitios de restricción introducidos en la secuencia de 1^{er} dominio,
- 20 (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del 1^{er} dominio, y en el extremo 5' un sitio de restricción diferente de los sitios de restricción introducidos en la secuencia de 1^{er} dominio;
- (d) opcionalmente amplificar una secuencia de tercer (3^{er}) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir:
- 25 (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del 2^o dominio anterior, y en el extremo 3' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 5' del 1^{er} dominio,
- (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del 2^o dominio anterior, y en el extremo 5' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 3' del 1^{er} dominio;
- 30 en el que el par de cebadores se diseña además de manera que los sitios de restricción sean diferentes en el extremo 5' y en el extremo 3' de la secuencia de 3^{er} dominio;
- (e) opcionalmente amplificar una o más secuencias de dominio adicionales seleccionadas de las secuencias de dominio de (a) para ampliar la serie de secuencias de dominio según las etapas (b) a (d), usando para cada una de dicha una o más secuencias de dominio adicionales un par de cebadores diseñados siguiendo el principio de las etapas (c) y (d) para introducir:
- 35 (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del dominio anterior, y en el extremo 3' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 5' del 1^{er} dominio,
- (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del dominio anterior, y en el extremo 5' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 3' del 1^{er} dominio;
- 40 en el que el par de cebadores se diseña además de manera que los sitios de restricción sean diferentes en el extremo 5' y en el extremo 3' de cada una de dicha una o más secuencias de dominio adicionales;
- (f) realizar una digestión de restricción de las secuencias de dominio amplificadas de cualquiera de las etapas (b) a (e) usando enzimas de restricción que seleccionan como diana los sitios de restricción introducidos en cualquiera de las etapas (b) a (e), en el que no se realiza una digestión de restricción en el sitio de restricción introducido en un extremo que porta un marcaje con etiqueta;
- 45 (g) ligar las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio digeridas obtenidas en la etapa (f) para obtener un producto de ligación que comprende las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio;

- (h) unir los productos de ligación de la etapa (g) a un soporte sólido usando el marcaje de etiqueta de la secuencia de 1^{er} dominio para obtener un producto de ligación unido que comprende las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio;
- (j) ligar opcionalmente la secuencia de 3^{er} dominio digerida de (d) obtenida en la etapa (f) al producto de ligación unido de la etapa (h) para obtener un producto de ligación unido que comprende las secuencias de 1^{er}, 2^o y 3^{er} dominio;
- (k) ligar opcionalmente una o más secuencias de dominio digeridas de (e) obtenidas en la etapa (f) al producto de ligación unido de la etapa (j) para obtener un producto de ligación unido que comprende una o más secuencias de dominio adicionales de (e);
- (l) liberar el producto de ligación obtenido en una cualquiera de las etapas (h) a (k) del soporte sólido; y
- (m) caracterizar el producto de ligación obtenido en la etapa (l) e identificar polipéptidos quiméricos que tienen al menos un CBD y al menos un EAD.
- [3] El método según el punto [1] o [2], que comprende además una etapa de lavado tras unir el primer producto de ligación al soporte sólido en la etapa (h) para eliminar los productos de ligación no unidos y/o las secuencias de dominio no ligadas.
- [4] El método según uno cualquiera de los puntos [1] a [3], en el que las etapas (g) y (h) se sustituyen por una etapa de unir la secuencia de 1^{er} dominio digerida a un soporte sólido usando el marcaje de etiqueta en el extremo 5' o en el extremo 3', respectivamente, y una etapa posterior de ligar la secuencia de 2^o dominio digerida de (c) obtenida en la etapa (f) a la secuencia de 1^{er} dominio unida para obtener un producto de ligación unido que comprende las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio.
- [5] El método según el punto [4], que comprende además una etapa de eliminar secuencias de dominio no unidas tras unir el primer producto de ligación al soporte sólido, y opcionalmente una etapa adicional de eliminar secuencias de dominio no ligadas tras ligar la segunda secuencia de dominio a la primera secuencia de dominio unida.
- [6] El método para examinar un polipéptido quimérico lítico según uno cualquiera de los puntos [1] y [3] a [5], que comprende además una etapa de eliminar secuencias de dominio no ligadas tras cada etapa de ligación realizada en cualquiera de las etapas (j) a (k).
- [7] El método para generar polipéptidos quiméricos que tienen al menos un CBD y al menos un EAD según uno cualquiera de los puntos [2] a [5], que comprende además una etapa de eliminar secuencias de dominio no ligadas tras cada etapa de ligación realizada en la etapas (j) y (k).
- [8] El método según uno cualquiera de los puntos [1] a [7], en el que las secuencias de dominio de (a) se clonan en un vector antes de la amplificación.
- [9] El método según uno cualquiera de los puntos [1] a [8], en el que la etapa de liberar el producto de ligación o productos de ligación del soporte sólido se lleva a cabo usando una enzima de restricción que selecciona como diana el sitio de restricción en el extremo del 1^{er} dominio que está portando el marcaje con etiqueta.
- [10]. El método según uno cualquiera de los puntos [1] a [9], en el que en el caso de etapas de ligación repetidas opcionalmente tras cualquier etapa de ligación repetida, parte del producto de ligación unido obtenido se separa del método antes de realizar una etapa de ligación posterior.
- [11] El método según uno cualquiera de los puntos [1] a [10], en el que el soporte sólido es una partícula, una superficie de un dispositivo, una lámina metálica o un vellón.
- [12] El método según el punto [11], en el que la partícula es una perla de sílice o una perla de polímero orgánico que es magnética.
- [13] Un polipéptido quimérico lítico que puede obtenerse mediante el método para examinar un polipéptido quimérico lítico según uno cualquiera de los puntos [1] y [3] a [12].
- [14] Un polipéptido quimérico o una pluralidad de polipéptidos quiméricos que pueden obtenerse mediante el método de generación de polipéptidos quiméricos que tienen al menos un CBD y al menos un EAD según uno cualquiera de los puntos [2] a [12].
- [15] Una biblioteca de ADN que comprende los clones que portan los productos de ligación obtenidos en el método según uno cualquiera de los puntos [1] a [12].
- Un segundo aspecto de la invención comprende los siguientes puntos:
- 1°. Un método de examen para un polipéptido quimérico lítico que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un dominio de unión a células

(CBD) y una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un dominio activo enzimático (EAD) y opcionalmente una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un CBD y al menos un EAD, en el que el EAD se selecciona del grupo que consiste en

- (i) el dominio lítico de una lisina de bacteriófago,
- 5 (ii) el dominio lítico de una bacteriocina,
- (iii) el dominio lítico de una autolisina bacteriana; y
- (iv) una proteína asociada a cola de bacteriófago que tiene actividad lítica;
- (b) amplificar una secuencia de primer (1^{er}) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir diferentes sitios de restricción en el extremo 5' y en el extremo 3', y un marcaje con etiqueta en el extremo 5' o en el extremo 3';
- 10 (c) amplificar una secuencia de segundo (2^o) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir:
 - (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del 1^{er} dominio, y en el extremo 3' un sitio de restricción diferente de los sitios de restricción introducidos en la secuencia de 1^{er} dominio,
 - 15 (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del 1^{er} dominio, y en el extremo 5' un sitio de restricción diferente de los sitios de restricción introducidos en la secuencia de 1^{er} dominio;
- (d) opcionalmente amplificar una secuencia de tercer (3^{er}) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir:
 - (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del 2^o dominio anterior, y en el extremo 3' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 5' del 1^{er} dominio,
 - 20 (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del 2^o dominio anterior, y en el extremo 5' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 3' del 1^{er} dominio;
- en el que el par de cebadores se diseña además de manera que los sitios de restricción sean diferentes en el extremo 5' y en el extremo 3' de la secuencia de 3^{er} dominio;
- (e) opcionalmente amplificar una o más secuencias de dominio adicionales seleccionadas de las secuencias de dominio de (a) para ampliar la serie de secuencias de dominio según las etapas (b) a (d), usando para cada una de dicha una o más secuencias de dominio adicionales un par de cebadores diseñados siguiendo el principio de las etapas (c) y (d) para introducir:
 - (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del dominio anterior, y en el extremo 3' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 5' del 1^{er} dominio,
 - 25 (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del dominio anterior, y en el extremo 5' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 3' del 1^{er} dominio;
- en el que el par de cebadores se diseña además de manera que los sitios de restricción sean diferentes en el extremo 5' y en el extremo 3' de cada una de dicha una o más secuencias de dominio adicionales;
- (f) realizar una digestión de restricción de las secuencias de dominio de cualquiera de las etapas (b) a (e):
 - (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción de la secuencia de dominio de la etapa (b) con una enzima de restricción que selecciona como diana el sitio de restricción en el extremo 3' y realizar una digestión de restricción de las secuencias de dominio de cualquiera de las etapas (c) a (e) con enzimas de restricción que seleccionan como diana los sitios de restricción en los extremos 5',
 - 35 (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción de la secuencia de dominio de la etapa (b) con una enzima de restricción que selecciona como diana el sitio de restricción en el extremo 5' y realizar una digestión de restricción de las secuencias de dominio de cualquiera de las etapas (c) a (e) con enzimas de restricción que seleccionan como diana los sitios de restricción en los extremos 3';
- 40 (g) ligar las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio digeridas obtenidas en la etapa (f) para obtener un producto de ligación
- 50

ES 2 577 830 T3

que comprende las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio;

(h) unir el producto de ligación de la etapa (g) a un soporte sólido usando el marcaje de etiqueta de la secuencia de 1^{er} dominio para obtener un producto de ligación unido que comprende las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio;

(j) realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido de la etapa (h):

5 (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido de (h) con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 3' del 2^o dominio,

(ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido de (h) con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 5' del 2^o dominio;

10 (k) ligar opcionalmente la secuencia de 3^{er} dominio digerida de la etapa (d) obtenida en la etapa (f) al producto de ligación unido de la etapa (j) para obtener un producto de ligación unido que comprende las secuencias de 1^{er}, 2^o y 3^{er} dominio;

(l) realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido de la etapa (k):

(i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido de la etapa (k) con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 3' del 3^{er} dominio.

15 (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido de la etapa (k) con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 5' del 3^{er} dominio.

(m) ligar opcionalmente una o más secuencias de dominio digeridas de (e) obtenidas en la etapa (f) al producto de ligación unido de la etapa (l) para obtener un producto de ligación unido que comprende una o más secuencias de dominio adicionales de la etapa (e), realizando de ese modo tras cada etapa de ligación una digestión de restricción del producto de ligación unido tal como sigue:

20 (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 3' de dicha secuencia de dominio adicional que se ligó al producto de ligación unido,

25 (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 5' de dicha secuencia de dominio adicional que se ligó al producto de ligación unido;

(n) liberar el producto de ligación obtenido en cualquiera de las etapas (h) a (m) del soporte sólido;

(o) clonar el producto de ligación obtenido en la etapa (n) en un vector de expresión;

30 (p) introducir el vector obtenido en la etapa (o) en un hospedador de expresión, preferiblemente en un hospedador de expresión bacteriano;

(q) cultivar el hospedador de expresión de la etapa (p) que porta el vector obtenido en la etapa (o) en condiciones adecuadas para permitir la expresión de un polipéptido lítico codificado por las secuencias de dominio del producto de ligación clonado;

35 (r) seleccionar y aislar un clon de expresión que expresa un polipéptido lítico según la etapa (q) usando la actividad lítica del polipéptido; y

(s) caracterizar el polipéptido lítico expresado por el clon de expresión aislado de la etapa (r) e identificar un polipéptido quimérico lítico.

2^o. Un método de generación de un polipéptido quimérico que tiene al menos un dominio de unión a células (CBD) y al menos un dominio activo enzimático (EAD), comprendiendo el método las etapas de:

40 (a) proporcionar una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un CBD y una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un EAD, y opcionalmente una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un CBD y al menos un EAD, en el que el EAD se selecciona del grupo que consiste en

(i) el dominio lítico de una lisina de bacteriófago;

(ii) el dominio lítico de una bacteriocina;

45 (iii) el dominio lítico de una autolisina bacteriana; y

(iv) una proteína asociada a cola de bacteriófago que tiene actividad lítica.

ES 2 577 830 T3

- (b) amplificar una secuencia de primer (1^{er}) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir diferentes sitios de restricción en el extremo 5' y en el extremo 3', y un marcaje con etiqueta en el extremo 5' o en el extremo 3';
- 5 (c) amplificar una secuencia de segundo (2^o) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir:
- (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del primer dominio, y en el extremo 3' un sitio de restricción diferente de los sitios de restricción introducidos en la secuencia de 1^{er} dominio,
- 10 (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del 1^{er} dominio, y en el extremo 5' un sitio de restricción diferente de los sitios de restricción introducidos en la secuencia de 1^{er} dominio;
- (d) opcionalmente amplificar una secuencia de tercer (3^{er}) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir:
- 15 (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del 2^o dominio anterior, y en el extremo 3' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 5' del 1^{er} dominio,
- (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del 2^o dominio anterior, y en el extremo 5' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 3' del 1^{er} dominio;
- 20 en el que el par de cebadores se diseña además de manera que los sitios de restricción sean diferentes en el extremo 5' y en el extremo 3' de la secuencia de 3^{er} dominio;
- (e) opcionalmente amplificar una o más secuencias de dominio adicionales seleccionadas de las secuencias de dominio de (a) para ampliar la serie de secuencias de dominio según las etapas (b) a (d), usando para cada una de dicha una o más secuencias de dominio adicionales un par de cebadores diseñados siguiendo el principio de las etapas (c) y (d) para introducir:
- 25 (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del dominio anterior, y en el extremo 3' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 5' del 1^{er} dominio,
- (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del dominio anterior, y en el extremo 5' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 3' del 1^{er} dominio;
- 30 en el que el par de cebadores se diseña además de manera que los sitios de restricción sean diferentes en el extremo 5' y en el extremo 3' de cada una de dicha una o más secuencias de dominio adicionales;
- (f) realizar una digestión de restricción de las secuencias de dominio de cualquiera de las etapas (b) a (e):
- 35 (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción de la secuencia de dominio de la etapa (b) con una enzima de restricción que selecciona como diana el sitio de restricción en el extremo 3' y realizar una digestión de restricción de las secuencias de dominio de cualquiera de las etapas (c) a (e) con enzimas de restricción que seleccionan como diana los sitios de restricción en los extremos 5',
- (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción de la secuencia de dominio de la etapa (b) con una enzima de restricción que selecciona como diana el sitio de restricción en el extremo 5' y realizar una digestión de restricción de las secuencias de dominio de cualquiera de las etapas (c) a (e) con enzimas de restricción que seleccionan como diana los sitios de restricción en los extremos 3';
- 40 (g) ligar las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio digeridas obtenidas en la etapa (f) para obtener un producto de ligación que comprende las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio;
- 45 (h) unir el producto de ligación de la etapa (g) a un soporte sólido usando el marcaje de etiqueta de la secuencia de 1^{er} dominio para obtener un producto de ligación unido que comprende las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio;
- (j) realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido de la etapa (h):
- (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido de (h) con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 3' del 2^o dominio,
- 50 (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación

unido de (h) con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 5' del 2º dominio;

(k) ligar opcionalmente la secuencia de 3º dominio digerida de (d) obtenida en la etapa (f) al producto de ligación unido de la etapa (j) para obtener un producto de ligación unido que comprende las secuencias de 1º, 2º y 3º dominio;

5 (l) realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido de la etapa (k):

(i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1º dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido de la etapa (k) con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 3' del 3º dominio.

(ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1º dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido de la etapa (k) con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 5' del 3º dominio.

10 (m) ligar opcionalmente una o más secuencias de dominio digeridas de (e) obtenidas en la etapa (f) al producto de ligación unido de la etapa (l) para obtener un producto de ligación unido que comprende una o más secuencias de dominio adicionales de la etapa (e), realizando de ese modo tras cada etapa de ligación una digestión de restricción del producto de ligación unido tal como sigue:

15 (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1º dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 3' de dicha secuencia de dominio adicional que se ligó al producto de ligación unido,

(ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1º dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 5' de dicha secuencia de dominio adicional que se ligó al producto de ligación unido;

20 (n) liberar el producto de ligación obtenido en cualquiera de las etapas (h) a (m) del soporte sólido;

(o) caracterizar el producto de ligación obtenido en la etapa (n) e identificar polipéptidos quiméricos que tienen al menos un CBD y al menos un EAD.

25 3º. El método según el punto 1º o 2º, que comprende además una etapa de lavado tras unir el primer producto de ligación al soporte sólido en la etapa (h) para eliminar los productos de ligación no unidos y/o las secuencias de dominio no ligadas.

30 4º. El método según uno cualquiera de los puntos 1º a 3º, en el que las etapas (g) y (h) se sustituyen por una etapa de unir la secuencia de 1º dominio digerida a un soporte sólido usando el marcaje de etiqueta en el extremo 5' o en el extremo 3', respectivamente, y una etapa posterior de ligar la secuencia de 2º dominio digerida de (c) obtenida en la etapa (f) a la secuencia de 1º dominio unida para obtener un producto de ligación unido que comprende las secuencias de 1º y 2º dominio.

5º. El método según el punto 4º, que comprende además una etapa de eliminar secuencias de dominio no unidas tras unir el primer producto de ligación al soporte sólido, y opcionalmente una etapa adicional de eliminar secuencias de dominio no ligadas tras ligar la segunda secuencia de dominio a la primera secuencia de dominio unida.

35 6º. El método para examinar un polipéptido quimérico lítico según uno cualquiera de los puntos 1º y 3º a 5º, que comprende además una etapa de eliminar secuencias de dominio no ligadas y/o productos no deseados que resultan de la digestión de restricción tras cada etapa de ligación y restricción realizada en cualquiera de las etapas (h) a (m).

40 7º. El método para generar polipéptidos quiméricos que tienen al menos un CBD y al menos un EAD según uno cualquiera de los puntos 2º a 5º, que comprende además una etapa de eliminar secuencias de dominio no ligadas y/o productos no deseados que resultan de la digestión de restricción tras cada etapa de ligación y restricción realizada en la etapas (k) a (m).

8º. El método según uno cualquiera de los puntos 2º a 5º, en el que la etapa (o) comprende las etapas de: (o) clonar el producto de ligación obtenido en la etapa (n) en un vector de expresión;

45 (p) introducir el vector obtenido en la etapa (o) en un hospedador de expresión, preferiblemente en un hospedador de expresión bacteriano;

(q) cultivar el hospedador de expresión de la etapa (p) que porta el vector obtenido en la etapa (o) en condiciones adecuadas para permitir la expresión de un polipéptido lítico codificado por las secuencias de dominio del producto de ligación clonado;

50 (r) seleccionar y aislar un clon de expresión que expresa un polipéptido lítico según la etapa (q) usando la actividad lítica del polipéptido; y

(s) caracterizar el polipéptido lítico expresado por el clon de expresión aislado de la etapa (r) e identificar un polipéptido quimérico lítico que tiene al menos un CBD y al menos un EAD.

9°. El método según uno cualquiera de los puntos 1° a 8°, en el que las secuencias de dominio de (a) se clonan en un vector antes de la amplificación.

5 10°. El método según uno cualquiera de los puntos 1° a 9°, en el que la etapa de liberar el producto de ligación o productos de ligación del soporte sólido se lleva a cabo usando una enzima de restricción que selecciona como diana el sitio de restricción en el extremo del 1^{er} dominio que está portando el marcaje con etiqueta.

10 11°. El método según uno cualquiera de los puntos 1° a 10°, en el que en el caso de etapas de ligación repetidas opcionalmente tras cualquier etapa de ligación repetida, parte del producto de ligación unido obtenido se separa del método antes de realizar una etapa de ligación posterior.

12°. El método según uno cualquiera de los puntos 1° a 11°, en el que el soporte sólido es una partícula, una superficie de un dispositivo, una lámina metálica o un vellón.

13°. El método según el punto 12°, en el que la partícula es una perla de sílice o una perla de polímero orgánico que es magnética.

15 14°. Un polipéptido quimérico lítico que puede obtenerse mediante el método para examinar un polipéptido quimérico lítico según uno cualquiera de los puntos 1° y 3° a 13°.

15°. Un polipéptido quimérico o una pluralidad de polipéptidos quiméricos que pueden obtenerse mediante el método de generación de polipéptidos quiméricos que tienen al menos un CBD y al menos un EAD según uno cualquiera de los puntos 2° a 13°.

20 16°. Una biblioteca de polipéptidos quiméricos que pueden obtenerse mediante el método según uno cualquiera de los puntos 2° a 13°.

Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1 muestra un esquema del vector de clonación modificado pET14b. El extremo 5' del inserto se ligará al sitio NcoI, el extremo 3' del inserto se ligará al sitio SpeI del vector. En el sentido de 3' del sitio SpeI se encuentra la secuencia para el ligador sintético. Para que el inserto no porte codón de terminación, la traducción incluirá el ligador sintético y un terminador en un codón intrínseco de vector detrás del sitio BamHI.

30 La figura 2 muestra un esquema para la introducción de sitios de restricción específicos de posición mediante combinaciones de cebador específico de posición. En particular, la figura 2 muestra el vector de clonación pET14b con un inserto (en este caso: EAD) de NcoI en el sitio BamHI. El cebador directo de PCR solapa en 3' con el inserto e introduce para la posición 1 un sitio NcoI y una etiqueta de biotina, para la posición 2 un sitio PstI y para la posición 3 un sitio Sall. El cebador inverso de PCR solapa en 5' con el inserto e introduce para la posición 1 un sitio PstI, para la posición 2 un sitio Sall y para la posición 3 un sitio EcoRV.

35 Figura 3: PCR de EAD500 con combinaciones de cebador específicas de posición y por tanto sitios de restricción de la posición 1, 2 y 3. La figura 3 muestra el gel de agarosa con los productos de PCR de EAD500 de la posición 1, la posición 2 y la posición 3. Los productos se generaron con los cebadores de PCR específicos de posición y el EAD500 clonado como molde. Los fragmentos generados tienen el mismo tamaño pero portan los sitios de restricción específicos de posición, diferentes.

40 Figura 4: Análisis en gel de agarosa de S1, S2 y perlas. La figura 4 muestra un experimento de unión de ADN biotinilado y no biotinilado y perlas recubiertas de estreptavidina. Las etiquetas de biotina pueden cortarse mediante digestión con NcoI. S1 es el sobrenadante tras la incubación de ADN con perlas recubiertas de estreptavidina y contiene ADN biotinilado con 1400 pb y 600 pb así como ADN no biotinilado con 700 pb. El ADN no biotinilado no pudo unirse a las perlas de estreptavidina debido a la falta de una etiqueta de biotina. El ADN biotinilado superó la capacidad de unión de las perlas de estreptavidina y por tanto estaba en el sobrenadante. Se lavaron las perlas y se resuspendieron en tampón y se realizó una digestión de restricción con NcoI. Se retiró el sobrenadante (=S2). S2 sólo contiene ADN con 1400 pb y 600 pb. Se biotinilaron estos fragmentos y pudieron unirse a las perlas. Las propias perlas no mostraron bandas de ADN en el gel de agarosa.

La figura 5 muestra los 16 posibles constructos de la ligación de los 4 EAD N-terminales (EAD511, EADP35, EADP40 y EADPSA) combinados con los 4 CBD C-terminales (CBD006, CBD500, CBD511, CBDP40 variante A). En la ligación aleatoria, cada EAD debe ligarse a cada CBD.

50 Figura 6: Fragmentos de PCR de EAD y CBD para la posición 1 y la posición 2, respectivamente. E: EAD, C: CBD. La figura 6 muestra un gel de agarosa con los productos de PCR de los EAD (E) para la posición 1 (EAD511: 640 pb, EADP40: 730 pb, EADPSA: 601 pb, EADP35: 505 pb) amplificados con los cebadores específicos para la posición 1 y los CBD (C) para la posición 2 (CBD511: 550 pb, CBDP40 variante A: 463 pb, CBD500: 532 pb, CBD006: 337 pb) amplificados con los cebadores específicos para la posición 2.

Figura 7: Análisis de ligación y captura de ADN en gel de agarosa al 1,5%. L: Ligación, NS: sobrenadante tras la digestión con NcoI, D: dominios reunidos. La figura 7 muestra un gel de agarosa de la ligación aleatoria de los 4 EAD N-terminales y los 4 CBD C-terminales. Se aplicaron aproximadamente 0,06 pmol de cada fragmento en el carril D tal como se indica mediante las flechas. El carril L muestra los productos de ligación con 0,06 pmol de cada fragmento. El carril NS muestra los productos de ligación fuera de 0,06 pmol de cada fragmento que se capturaron a través de la etiqueta de biotina mediante perlas recubiertas de estreptavidina y corte de las perlas mediante NcoI.

Figura 8: Esquema de pQE60-lib con sitio de clonación modificado. La figura 8 muestra un esquema del vector pQE60-lib. Se adaptó el sitio de clonación múltiple para clonar los insertos con un sitio NcoI en 5' y un sitio PstI, Sall o EcoRV en 3'. La traducción comienza con el ATG del sitio NcoI y termina en un codón de terminación intrínseco de vector entre el sitio EcoRV y el sitio HindIII.

Figura 9: Las células de *E. coli* M15 inducidas muestran lisis tras transformación con plásmido y crecimiento de colonias. La figura 9 muestra una placa de selección de lisis con transformantes de *E. coli* M15 que expresan endolisina inducida. Se sembraron células de *E. coli* transformadas en placas de lisis con células de *Listeria* WSLC 2011 (*Listeria innocua*, serotipo 6a) inactivadas por calor. La placa de selección de lisis contiene agar superior de LB, células de *Listeria* WSLC 2011 (*Listeria innocua*, serotipo 6a) inactivadas por calor, IPTG y ampicilina. Se transformaron *E. coli* M15 con endolisinas que portaban pQE60-lib y se sembraron en placa. Las células de *E. coli* que expresan una proteína soluble y activa están rodeadas por una zona sin células de *Listeria*.

Figura 10: Confirmación de las 16 posibles variantes. La figura 10 muestra la confirmación de las 16 posibles variantes A a P de los 4 EAD N-terminales (EADP40, EADP35, EAD511, EADPSA) y los 4 CBD C-terminales (CBD511, CBD500, CBDP40 variante A, CBD006). Se realizó PCR de colonias con cebador directo pQE e inverso pQE y se digirió en el sitio PstI donde se ligaron los dominios entre sí durante el procedimiento de clonación. Se analizaron los fragmentos resultantes mediante electroforesis en gel de agarosa. Los dominios separados pueden identificarse por los tamaños de dominio individuales. Los tamaños de dominio incluyen también fragmentos desde los límites de dominio hasta los sitios de cebado del cebador directo pQE e inverso pQE. CBDP40 significa el constructo de CBDP40-A de la tabla 1.

La figura 11 muestra el análisis en gel de SDS de la expresión de proteínas de las 16 variantes A-P. Todas las proteínas tienen el tamaño correcto. Por tanto, los fragmentos de dominio se ligan correctamente sin desplazamientos de marco. La numeración es igual que en la figura 10.

Figura 12: El espectro lítico de las 16 variantes sigue el comportamiento de los CBD correspondientes. La figura 12 muestra el comportamiento lítico de las variantes A-P contra las serovariedades de *Listeria* 6a (*L. innocua* WSLC2011), 1/2a (*L. monocytogenes* EGDe) y 4b (*L. monocytogenes* ScottA). Las proteínas se comportan de manera correspondiente a los espectros de unión de CBD: las variantes A, D, F y K tienen CBD511 y lisan las tres serovariedades, CBD511 se une a las tres serovariedades. Las variantes con CBD500 (B, E, G y L) lisan sólo las serovariedades 6a y 4b, las variantes con CBD006 (I, M, O P) lisan principalmente las serovariedades 1/2a. Los candidatos con CBDP40 no son líticamente activos contra las células de *Listeria* sometidas a prueba, lo que significa que este CBDP40 variante A no es funcional. Sv 6a: *L. innocua* WSLC201 1, 1/2a: *L. monocytogenes* EGDe, 4b: *L. monocytogenes* ScottA.

Figura 13: Las figuras 13A y 13B muestran los métodos reivindicados usando o bien marcaje en 5' (figura 13A) o bien marcaje en 3' (figura 13B) del 1^{er} dominio según el primer aspecto de la invención. Según el primer aspecto de la invención, los métodos reivindicados comprenden realizar una digestión de restricción en las secuencias de dominio amplificadas de cualquiera de las etapas (b) a (e) con enzimas de restricción que seleccionan como diana los sitios de restricción introducidos en cualquiera de las etapas (b) a (e), en los que no se realiza una digestión de restricción en el sitio de restricción introducido en un extremo que porta un marcaje con etiqueta.

Figura 14: La figuras 14A y 14B muestra los métodos reivindicados usando o bien marcaje en 5' (figura 14A) o bien marcaje en 3' (figura 14B) del 1^{er} dominio según el segundo aspecto de la invención. Según el segundo aspecto de la invención, los métodos reivindicados comprenden realizar una digestión de restricción en las secuencias de dominio de cualquiera de las etapas (b) a (e) tal como sigue:

(i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio (figura 14A): realizar una digestión de restricción de la secuencia de dominio de la etapa (b) con una enzima de restricción que selecciona como diana el sitio de restricción en el extremo 3' y realizar una digestión de restricción de las secuencias de dominio de cualquiera de las etapas (c) a (e) con enzimas de restricción que seleccionan como diana los sitios de restricción en los extremos 5',

(ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio (figura 14B): realizar una digestión de restricción de la secuencia de dominio de la etapa (b) con una enzima de restricción que selecciona como diana el sitio de restricción en el extremo 5' y realizar una digestión de restricción de las secuencias de dominio de cualquiera de las etapas (c) a (e) con enzimas de restricción que seleccionan como diana los sitios de restricción en los extremos 3'.

Además, según el segundo aspecto de la invención, los métodos reivindicados comprenden además realizar una digestión de restricción adicional en el producto de ligación unido tal como sigue:

(i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 3' del dominio ligado al producto de ligación unido,

5 (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 5' del dominio ligado al producto de ligación unido.

Descripción detallada de la invención

10 Lo anterior ha explicado resumidamente las características de diversas realizaciones con el fin de que la descripción detallada que sigue se entienda mejor. A continuación en el presente documento se describirán características y ventajas adicionales de diversas realizaciones que constituyen el objeto de las reivindicaciones de la invención.

15 La técnica anterior describe polipéptidos quiméricos líticos, que pueden comprender un CBD y un EAD. El documento WO 2010/020657 describe la combinación de diferentes fragmentos de polipéptidos procedentes de diferentes enzimas silvestres para dar nuevos constructos de polipéptidos quimérico ("intercambio"). Tal como se menciona en el mismo, los fragmentos se combinan mediante métodos biológicos moleculares a nivel del ácido nucleico. Hay varias diferencias entre los documentos WO 2010/020657 y los métodos novedosos de la presente invención. En particular, a diferencia con el documento WO 2010/020657, los métodos de la presente invención comprenden el uso de un soporte sólido. Esto proporciona una mejora de la eficacia y la exactitud de los métodos de generación y examen para un polipéptido quimérico según la presente invención. Además, el uso de un soporte sólido proporciona acelerar la generación de polipéptidos quiméricos novedosos.

20 Además, los métodos de la presente invención siguen un proceso cíclico, que tiene el efecto de que sólo se forman aquellos constructos que tienen la longitud deseada, es decir, polipéptidos quiméricos que tienen, por ejemplo, 3 ó 4 dominios. En relación con esto, ha de observarse que los constructos son tal que no se generan de manera dirigida. Es decir, la secuencia (es decir, el orden cronológico) de los dominios en los polipéptidos quiméricos obtenidos a partir de los métodos no está predeterminada (enfoque combinatorio). En este caso, el enfoque seguido en la técnica anterior, en particular en el documento WO 2010/020657, es completamente diferente. En particular, en los polipéptidos quiméricos generados en la técnica anterior, los dominios están predeterminados (enfoque de clonación dirigida) y los dominios usados en los métodos de clonación eran dominios conocidos que tenían características favorables específicas y propiedades/actividades ventajosas. Esto no es sorprendente dado que en la técnica anterior se deseaba combinar los EAD, que se conocían por su actividad lítica favorable. En otras palabras, la técnica anterior estaba siguiendo el principio de considerar qué combinación de dominios completamente caracterizados conocidos podía desearse. En cambio, los dominios aplicados en los métodos de la presente invención son independientes de cualquier conocimiento anterior de este tipo, aun cuando naturalmente pueden aplicarse secuencias de dominio a los métodos de la presente invención. Sin embargo, básicamente no existe el conocimiento anterior necesario con respecto a las características, las posiciones relativas y las actividades/propiedades de los dominios aplicados en los métodos de la presente invención. Los polipéptidos quiméricos obtenidos a partir de los métodos de la presente invención se caracterizan usando la actividad lítica de los constructos resultantes. Por tanto, los métodos reivindicados permiten seleccionar aquellas variantes que tienen propiedades superiores deseadas. Este enfoque seguido por los métodos de la presente invención es un enfoque libre de hipótesis (dirigido por descubrimiento). No hay necesidad de identificar y caracterizar las secuencias de dominio antes de realizar los métodos de la presente invención. Esta es una clara diferencia con respecto a los métodos de la técnica anterior. La técnica anterior ni enseña ni sugiere ni predice el enfoque que está subyacente a los métodos de la presente invención.

45 En esencia, los métodos de la presente invención permiten generar y examinar combinaciones de dominios mejoradas que no podrían haberse esperado considerando los dominios individuales de manera aislada. Esta eficacia de los métodos reivindicados se ha demostrado en los ejemplos de la presente solicitud (ejemplos 5 y 6). Por tanto, la presente solicitud proporciona evidencias en relación con la calidad de los métodos reivindicados. No hay ningún método en la técnica anterior que generará resultados similares a los logrados con los métodos de la presente invención.

50 Además, la siguiente tabla muestra el número de variantes que pueden obtenerse con los métodos de la presente invención:

Número de secuencias ADN (dominios)	de de	Posibles variantes de 2 dominios	Posibles variantes de 3 dominios	Posibles variantes de 4 dominios	Total
5		25	125	625	775
10		100	1000	10000	11100
20		400	8000	160000	168400
25		625	15625	390625	406875

Por tanto, los métodos de la presente invención proporcionan una generación rápida y precisa de todas las variantes

que resultan de un número específico de secuencias de ADN aplicadas a los métodos. Se requerirían enormes esfuerzos laboriosos que llevan mucho tiempo si tuvieran que generarse todas las variantes posibles usando métodos de clonación convencionales. Además, los métodos de la presente invención tienen el efecto de que se eliminan los subproductos no deseados durante las etapas del método, proporcionando de una alta eficacia de los métodos y mejorando la posibilidad de que todas las posibles variantes estén presentes en la biblioteca resultante.

En la presente invención, el término "CBD" representa la abreviatura para dominio de unión a células, más específicamente dominio de unión a la pared celular. Por tanto, el término "CBD" también puede representar la abreviatura para dominio de unión a la pared celular. Los términos "dominio de unión a células" y "dominio de unión a la pared celular" pueden usarse de manera intercambiable. La definición estructural y funcional de un CBD según la presente invención se facilita en otro lugar de la descripción.

En la presente invención, "EAD" representa la abreviatura para dominio activo enzimático. En la presente invención, un EAD tiene actividad lítica contra bacterias. Por tanto, un EAD según la presente invención también puede considerarse un dominio lítico. Una definición estructural y funcional más específica de un EAD según la presente invención se facilita en otro lugar en el presente documento en la descripción. Los EAD según la presente invención pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse mediante medios recombinantes y sintéticos.

En la bibliografía, los términos "lisina de bacteriófagos", "endolisinas de fago", "endolisinas", "virolisinas" y "lisinas" a menudo se usan de manera intercambiable. Por tanto, en la presente invención, los términos "lisina de bacteriófagos", "endolisinas de fago", "endolisinas" y "lisinas" pueden usarse de manera intercambiable mientras definen el mismo tipo de enzimas, concretamente enzimas que hidrolizan la pared celular bacteriana sintetizadas durante la fase tardía de la expresión génica en el ciclo lítico de la multiplicación del fago. A modo de otra definición, las endolisinas son enzimas codificadas por genomas de fago ADN de doble cadena (dc) que lisan paredes celulares bacterianas. En general, en la presente invención el término "bacteriófago" o "fago" significa "bacteriófago lítico" o "bacteriófago lisogénico" ("fago lítico" o "fago lisogénico").

Un "fago" o "bacteriófago", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la categoría bien conocida de virus que infectan bacterias. Los fagos incluyen secuencias ADN o ARN encapsadas en una envuelta o recubrimiento de proteínas ("cápside").

En la presente invención, el término "bacteria" preferiblemente describe un "bacteriana diana", y se refiere a una bacteria que se une mediante un polipéptido quimérico de la presente invención y/o cuyo crecimiento, supervivencia o replicación se inhibe mediante la actividad enzimática de un EAD según la presente invención. Una bacteria de este tipo según la presente invención es preferiblemente una bacteria patógena. La inhibición del crecimiento bacteriano se refiere a la ralentización o detención de la velocidad de división de una célula bacteriana o al cese de la división celular bacteriana o a la muerte de las bacterias. El término "bacteria diana" incluye específicamente bacterias diana tanto Gram positivas como Gram negativas, preferiblemente bacterias Gram positivas.

En la presente invención, un polipéptido que puede obtenerse mediante los métodos reivindicados es quimérico porque comprende una combinación de dominios seleccionados de CBD y EAD, que no se encuentran como tal en la naturaleza. Preferiblemente, los dominios combinados en un polipéptido quimérico que puede obtenerse mediante los métodos de la presente invención son de fuente u origen diferente. Por tanto, un polipéptido quimérico que puede obtenerse mediante los métodos de la presente invención puede comprender un CBD y un EAD de la misma fuente u origen, siempre que el polipéptido quimérico comprenda al menos un CBD y/o EAD adicional de una fuente u origen diferente. Además, un polipéptido quimérico que puede obtenerse mediante los métodos de la presente invención puede comprender un CBD y un EAD de la misma fuente u origen si la combinación de dominios de la misma fuente u origen es tal que no se encuentra en la naturaleza. En la presente invención, el término "heterólogo" puede usarse de manera intercambiable con el término "quimérico".

En la presente invención, el término "dominio(s) de fuente u origen diferente" incluye "dominio(s) de una fuente u origen de organismo diferente" y "dominio(s) de una fuente u origen de enzima diferente".

Un polipéptido quimérico que puede obtenerse mediante los métodos de la presente invención puede comprender más de un EAD y, por tanto, puede actuar sobre diferentes estructuras de pared celular, y por tanto tiene potencial para tratar dos o más infecciones bacterianas diferentes al mismo tiempo.

En la presente invención, una especie bacteriana patógena se define por las similitudes encontradas entre sus miembros. Se usan propiedades tales como reacciones bioquímicas, composición química, estructuras celulares, características genéticas y características inmunológicas para definir las especies bacterianas patogénicas y por tanto para diferenciar diferentes especies bacterianas patogénicas.

Un EAD según la presente invención presenta actividad lítica contra una célula bacteriana. Por tanto, un EAD según la presente invención presenta la actividad de inhibición de crecimiento bacteriano, incluyendo la ralentización o detención de la velocidad de división celular de las bacterias o el cese de la división celular de bacterias, o la muerte de las bacterias (destrucción de las bacterias colonizadoras).

En diversas realizaciones de la presente invención, el EAD es el dominio lítico de una endolisina de bacteriófago,

incluyendo endolisinas de bacteriófago contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Más preferiblemente, el EAD es el dominio lítico de una endolisina de bacteriófago, en el que la endolisina procede de un bacteriófago que infecta una bacteria Gram positiva. En diversas realizaciones, el EAD es el dominio lítico de una endolisina de bacteriófago, en el que la endolisina procede de un bacteriófago que infecta una bacteria Gram negativa.

5 Tal como se mencionó anteriormente, en la presente invención las lisinas de bacteriófagos (o lisinas) son enzimas hidrolizantes de la pared celular bacteriana sintetizadas durante la fase tardía de la expresión génica en el ciclo lítico de multiplicación de fagos. Como el peptidoglicano es el principal componente estructural de paredes celulares bacterianas, en la presente invención las lisinas de bacteriófagos son preferiblemente enzimas hidrolizantes de peptidoglicano. Más preferiblemente, en la presente invención una lisina de bacteriófago es una glicosidasa, 10 amidasa o endopeptidasa, dependiendo del tipo de enlace químico que escinden dentro del peptidoglicano. Todavía más preferiblemente, una lisina de bacteriófago que va a usarse en la presente invención muestra actividad muramidasa, actividad glucosaminidasa o actividad transglicosilasa. Por tanto, en la presente invención, una lisina de bacteriófago proporciona al menos una de las siguientes actividades enzimáticas contra un sustrato de peptidoglicano: actividad muramidasa, actividad glucosaminidasa, actividad N-acetilmuramil-L-alanina amidasa y 15 actividad endopeptidasa.

A modo de otra definición, las endolisinas de bacteriófagos son enzimas codificadas por genomas de fagos de ADN bicatenario (bc) que someten a lisis paredes celulares bacterianas. Esta definición de endolisinas de bacteriófagos también queda abarcada por la presente invención.

20 En diversas realizaciones de la presente invención, el EAD es el dominio lítico de una bacteriocina, incluyendo el dominio lítico de una bacteriocina de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Preferiblemente, el EAD es el dominio lítico de una bacteriocina de una bacteria Gram-positiva. En diversas realizaciones, el EAD es el dominio lítico de una bacteriocina de una bacteria Gram-negativa.

25 En diversas realizaciones de la presente invención, el EAD es el dominio lítico de una autolisina bacteriana, incluyendo autolisinas de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Preferiblemente, el EAD es el dominio lítico de una autolisina de una bacteria Gram-positiva. En diversas realizaciones, el EAD es el dominio lítico de una autolisina de una bacteria Gram-negativa.

30 No sólo se sabe que los bacteriófagos codifican y producen lisinas, sino también las denominadas enzimas muralíticas asociadas con la cola (TAME), que también pueden hidrolizar paredes celulares bacterianas. Mientras que las lisinas se producen en la fase final del ciclo vital del fago para facilitar la liberación de los fagos progenie a partir de la bacteria hospedadora, en cambio las TAME son proteínas estructurales necesarias durante la primera fase del proceso de infección de una célula hospedadora. La primera fase del proceso de infección de fago comprende las etapas de adsorción a y penetración en la célula hospedadora, lo cual se media usando, entre otras cosas, la TAME. Muchos pero no todos los fagos tienen colas unidas a la cabeza del fago. Por tanto, en diversas realizaciones de la presente invención, el EAD es una proteína asociada a cola de bacteriófago que tiene actividad 35 lítica. Preferiblemente, el EAD es una proteína asociada a cola que tiene actividad lítica de fagos que infectan hospedadores Gram-positivos. En diversas realizaciones, el EAD es una proteína asociada a cola que tiene actividad lítica de fagos que infectan hospedadores Gram-negativos. Las proteínas asociadas a cola de bacteriófago median normalmente en el reconocimiento y la unión del fago al hospedador diana, y algunas de ellas presentan actividades de degradación de la pared celular, lo cual ayuda en la penetración de componentes de fago en el 40 hospedador.

En diversas realizaciones de la presente invención, el EAD se deriva de equivalentes de cola de bacteriófago en *caudovirales*, que proporcionan medios para que el fago entre en un hospedador bacteriano a partir del entorno externo.

45 Un polipéptido quimérico que puede obtenerse mediante los métodos de la presente invención puede comprender más de un CBD y, por tanto, puede unirse a diferentes estructuras de la pared celular, y por tanto tiene posibilidad para tratar dos o más infecciones bacterianas diferentes al mismo tiempo.

50 En la presente invención, puede usarse cualquier clase de CBD en los métodos de la presente invención e incluye dominios de unión a célula, que son parte de proteínas que se unen a una célula bacteriana diana, específicamente a la pared celular de una bacteria diana. Por tanto, en la presente invención, los CBD son específicamente dominios de unión a pared celular. En general, un CBD según la presente invención se une a células bacterianas, específicamente a paredes celulares de bacterias diana, más específicamente a componentes de la pared celular producidos por una célula diana, que están asociados de manera no covalente o covalente con la pared celular de una célula diana. En otras palabras, el dominio de unión a célula o dominio de unión a pared celular es la parte de una proteína de unión a célula o proteína de unión a pared celular que es necesaria y suficiente para la capacidad 55 de unión a una célula bacteriana o célula bacteriana diana, específicamente para la capacidad de unión a la superficie celular de una célula bacteriana o célula bacteriana diana. La célula bacteriana o célula bacteriana diana incluye cualquier célula bacteriana Gram-positiva o Gram-negativa.

En diversas realizaciones preferidas de la presente invención, el CBD es el dominio de unión a célula de una

endolisina de bacteriófago, incluyendo endolisinas de bacteriófagos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Más preferiblemente, el CBD es el dominio de unión a célula de una endolisina de bacteriófago, en el que la endolisina es de un bacteriófago que infecta una bacteria Gram-positiva. En diversas realizaciones el CBD es el dominio de unión a célula de una endolisina de bacteriófago, en el que la endolisina es de un bacteriófago que infecta una bacteria Gram-negativa.

En diversas realizaciones preferidas de la presente invención, el CBD es el dominio de unión a célula de una bacteriocina, incluyendo el dominio de unión a célula de una bacteriocina de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Preferiblemente, el CBD es el dominio de unión a célula de una bacteriocina de una bacteria Gram-positiva. En diversas realizaciones, el CBD es el dominio de unión a célula de una bacteriocina de una bacteria Gram-negativa.

En diversas realizaciones preferidas de la presente invención, el CBD es el dominio de unión a célula de una autolisina bacteriana, incluyendo autolisinas de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Preferiblemente, el CBD es el dominio de unión a célula de una autolisina de una bacteria Gram-positiva. En diversas realizaciones, el CBD es el dominio de unión a célula de una autolisina de una bacteria Gram-negativa.

Los CBD que van a usarse en los métodos de la presente invención pueden unirse específicamente a bacterias. Por tanto, aunque los CBD según la presente invención muestran actividad de unión a célula, no tienen nada de actividad hidrolítica o actividad hidrolítica no significativa. Se pretende que nada de actividad hidrolítica o actividad hidrolítica no significativa en este contexto describa la situación en la que la actividad hidrolítica no es suficiente para prevenir que la aplicación de un CBD se una a una célula bacteriana, más específicamente a una pared celular bacteriana. Se supone que un CBD que va a usarse en los métodos de la presente invención es una proteína, que no tiene ninguna actividad hidrolítica en sí misma. Esto también se aplica a fragmentos y variantes de un CBD según la presente invención, que también quedan abarcados por la presente invención.

La presente invención abarca secuencias de ADN de cualquier CBD y EAD conocidos. En la presente invención, también pueden usarse secuencias de ADN que codifican fragmentos funcionales de CBD y EAD conocidos así como secuencias de ADN que codifican mutantes y variantes de CBD y EAD conocidos que tienen la misma función o actividad biológica que el CBD o EAD de referencia conocido en los métodos de la presente invención, es decir, la unión a la pared celular de una célula bacteriana y mostrar la actividad de hidrolizar una pared celular bacteriana, respectivamente.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "fragmento funcional", "mutante" y "variante" se refieren a un polipéptido, que presenta función o actividad biológica identificada mediante un ensayo funcional definido y asociado con una alteración biológica, morfológica o fenotípica particular en una célula bacteriana o de una célula bacteriana. Los EAD y CBD según la presente invención también abarcan específicamente formas que se producen de manera natural tales como, por ejemplo, formas modificadas o sometidas a corte y empalme de manera alternativa y variantes que se producen de manera natural de las mismas, pudiendo usarse las secuencias de ADN que codifican las mismas en los métodos de la presente invención.

Las secuencias de ADN que codifican fragmentos y variantes de CBD y EAD que pueden usarse en los métodos de la presente invención incluyen secuencias de ADN sintetizadas químicamente (genes sintéticos).

Las modificaciones de CBD y EAD según la presente invención pueden dar como resultado proteínas mutantes o variantes que tienen actividad sustancialmente equivalente a un CBD o EAD de referencia descrito en el presente documento. Tales modificaciones pueden ser deliberadas, tales como mutagénesis dirigida al sitio, o pueden producirse mediante cambios espontáneos en secuencias de nucleótidos y de aminoácidos en las que estos cambios producen polipéptidos modificados que tienen actividad sustancialmente equivalente al CBD o EAD de referencia respectivo. Cualquier polipéptido producido mediante modificaciones secundarias de una secuencia de aminoácidos primaria de CBD o EAD conocida se incluye en el presente documento siempre que esté presente la actividad biológica de un dominio de unión a pared celular o un dominio activo enzimático que muestra actividad lítica. También pueden usarse secuencias de ADN que codifican tales polipéptidos de CBD y EAD modificados en los métodos según la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, "actividad sustancialmente equivalente" se refiere a polipéptidos, en los que cambios en una o más bases de nucleótido de la secuencia de nucleótidos respectiva que codifica el polipéptido dan como resultado la sustitución de uno o más aminoácidos, pero no afectan a las propiedades funcionales del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos. "Actividad sustancialmente equivalente" también se refiere a modificaciones de secuencias de ácido nucleico que codifican CBD y/o EAD tales como delección o inserción que no afectan sustancialmente a las propiedades funcionales del transcrito y/o la proteína resultante. Por tanto, se entiende que en los métodos según la presente invención pueden usarse más de una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de CBD y EAD conocidos, es decir incluyendo equivalentes funcionales de los mismos.

Los CBD y EAD para su uso en la presente invención pueden identificarse mediante análisis de secuencias genómicas usando el sitio web del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>); específicamente, puede usarse ORF Finder en el sitio web del NCBI para la identificación (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Pueden examinarse

secuencias de proteínas predichas para determinar homología con proteínas conocidas usando búsquedas de BLAST a través del sitio web de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Pueden realizarse alineaciones de secuencias múltiples de genes y proteínas homólogas usando ClustalW en el sitio web de EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

- 5 En particular, con respecto a endolisinas, el experto en la técnica está en posición de identificar CBD y EAD mediante búsqueda de homología en el genoma de bacterias y fagos bacterianos y/o examen funcional de bibliotecas de ADN de genomas de fagos. Tales búsquedas de homología pueden no sólo seleccionar como diana genes de lisina, sino también genes de holina correspondientes ya que resulta que la holina y la lisina se codifican de manera adyacente en un genoma particular. Por tanto, seleccionando como diana genes de holina es posible
10 identificar lisinas adyacentes. Además, pueden identificarse CBD y EAD de endolisina de bacteriófago de manera experimental tal como se describe, por ejemplo, en Loessner *et al.* 2002 y Korndorfer *et al.* 2006, es decir determinando la estructura de dominio de una endolisina y esclareciendo la función de unión a pared celular y lítica de los dominios respectivos. Las lisinas de bacteriófago que van a analizarse para detectar CBD y EAD pueden identificarse mediante el método descrito en Schuch *et al.* 2009. Tal como se menciona en ese documento, las
15 técnicas descritas pueden adaptarse para identificar lisinas de cualquier fago que infecta a bacterias Gram-positivas o incluso Gram-negativas. Además, pueden identificarse CBD y EAD de endolisina usando bibliotecas de ADN tal como se describe en Schmitz *et al.* 2008.

Asimismo, con respecto a autolisinas y bacteriocinas, el experto en la técnica está en posición de identificar CBD y EAD mediante búsqueda de homología en el genoma de bacterias. También pueden identificarse CBD y EAD de autolisinas y bacteriocinas de manera experimental.
20

Básicamente, los métodos según la presente invención se caracterizan por la unión de una secuencia de primer dominio, que puede ser un CBD o un EAD y que puede ser parte de un constructo de ligación de dos o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD, a un soporte sólido usando un marcaje con etiqueta de dicha secuencia de primer dominio que va a unirse al soporte sólido. Además, los métodos según la
25 presente invención se caracterizan básicamente por ligar una o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD a dicha secuencia de primer dominio cuando está unida al soporte sólido y/o a un constructo de ligación de dos o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD, que está unido a la fase de soporte sólido mediante dicha secuencia de primer dominio que está unida al soporte sólido. Por tanto, ligar una o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD incluye no sólo ligar una o
30 más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD a una única secuencia de primer dominio originalmente unida al soporte sólido, sino también ligar una o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD a un constructo de ligación, que comprende dos o más secuencias de dominio y que estaba originalmente unido al soporte sólido mediante una secuencia de primer dominio. Por tanto, las etapas de ligación dan como resultado productos de ligación de una o más secuencias de dominio seleccionadas de
35 secuencias de CBD y EAD a una única secuencia de primer dominio unida a un soporte sólido o una o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD a un constructo de ligación de dos o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD, que estaba originalmente unido al soporte sólido mediante una secuencia de primer dominio. Todavía adicionalmente, los métodos según la presente invención se caracterizan básicamente por liberar el producto de ligación del soporte sólido tras la ligación de una o más
40 secuencias de dominio a dicha secuencia de primer dominio unida al soporte sólido y/o al constructo de ligación, que estaba originalmente unido a la fase de soporte sólido mediante dicha secuencia de primer dominio que estaba unida al soporte sólido. Por tanto, la etapa de liberar un producto de ligación del soporte sólido tras realizar una o más etapas de ligación de una o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD proporciona un ADN que codifica un polipéptido, que entonces puede demostrarse que es un polipéptido quimérico
45 lítico según la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos de generación y examen para un polipéptido quimérico que comprende al menos un CBD y al menos un EAD que comprenden las etapas de (i) unir una secuencia de primer dominio, que puede ser un CBD o un EAD y que puede ser parte de un constructo de ligación de dos o más
50 secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD, a un soporte sólido usando un marcaje con etiqueta de la secuencia de dominio que va a unirse al soporte sólido, (ii) ligar una o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD a dicha secuencia de primer dominio unida al soporte sólido y/o a dicho constructo de ligación que comprende una o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD, que está unido a la fase de soporte sólido mediante dicha secuencia de primer dominio unida al soporte sólido, y (iii) liberar del soporte sólido el producto de ligación resultante de la ligación de una o más secuencias de dominio
55 a la secuencia de primer dominio unida al soporte sólido y/o resultante de la ligación de una o más secuencias de dominio a dicho constructo de ligación, que estaba originalmente unido a la fase de soporte sólido mediante dicha secuencia de primer dominio unida al soporte sólido.

En la presente invención, una o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD se unen al soporte sólido como secuencia de primer dominio mediante marcaje con etiqueta. Por tanto, un número ilimitado de las denominadas secuencias de primer dominio diferentes se unen al soporte sólido, y a cada una de ellas pueden ligarse una o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD. Esto permite proporcionar un número ilimitado de productos de ligación correspondientes a todas las combinaciones de CBD y EAD, que son

estadísticamente posibles dependiendo de las secuencias de CBD y EAD aplicadas y los ciclos de ligación realizados, y que como tales no se encuentran en la naturaleza.

La situación descrita anteriormente es válida en consecuencia para constructos de dos o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD, que se unen a la fase de soporte sólido. Es decir, en diversas realizaciones de la presente invención puede unirse un número ilimitado de constructos de una o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD al soporte sólido mediante la secuencia de primer dominio que porta un marcaje con etiqueta. Por tanto, a cada uno de los constructos de ligación originalmente unidos de dos o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD, pueden ligarse una o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD. Esto permite proporcionar un número ilimitado de productos de ligación correspondientes a todas las combinaciones de CBD y EAD, que son estadísticamente posibles dependiendo de las secuencias de CBD y EAD aplicadas y los ciclos de ligación realizados, y que como tales no se encuentran en la naturaleza.

Más específicamente, los métodos de la presente invención pueden proporcionar un número ilimitado de productos de ligación correspondientes a todas las combinaciones de CBD y EAD de las diferentes fuentes u orígenes descritos en el presente documento. Por tanto, la generación y el examen para polipéptidos quiméricos líticos proporcionados por la presente invención se basan en un intercambio aleatorio de secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD usando un soporte sólido, en el que se forma un número ilimitado de productos de ligación de dos o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD. Por tanto, el número de secuencias de primer dominio y/o constructos de ligación de dos o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD, que van a unirse originalmente al soporte sólido con el fin de formar productos de ligación mediante realización repetida de etapas de ligación con dicha(s) secuencia(s) de primer dominio y/o constructo(s) de ligación, no está limitado e incluye incluso la unión de tan sólo una única secuencia de primer dominio de este tipo y/o un único constructo de ligación de este tipo al soporte sólido.

Según la presente invención, la secuencia de dominio originalmente unida al soporte sólido o la secuencia de dominio de un constructo de ligación, que se une directamente al soporte sólido mediante marcaje con etiqueta, se denomina secuencia de 1^{er} dominio. Además, según la presente invención el constructo de ligación de dos o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD, que se une originalmente al soporte sólido mediante marcaje con etiqueta de la secuencia de primer dominio de un constructo de ligación de este tipo, también puede denominarse primer producto de ligación.

En la presente invención, un soporte sólido que tiene unidas secuencias de primer dominio y/o constructos de ligación de dos o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD puede denominarse fase de soporte sólido. Por tanto, en la presente invención ligar secuencias de dominio a secuencias de primer dominio y/o constructos de ligación unidos a un soporte sólido también puede describirse como ligar secuencias de dominio a la fase de soporte sólido.

En diversas realizaciones, los métodos según la presente invención se caracterizan por la etapa de proporcionar una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un CBD, y además una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un EAD, en los que el EAD se selecciona del grupo que consiste en (i) el dominio lítico de una lisina de bacteriófago, (ii) el dominio lítico de una bacteriocina, (iii) el dominio lítico de una autolisina bacteriana; y (iv) una proteína asociada a cola de bacteriófago que tiene actividad lítica. Opcionalmente, la etapa (a) de los métodos según la presente invención proporciona además una o más secuencias de ADN, en los que cada secuencia codifica al menos un CBD y al menos un EAD, en los que el EAD se selecciona del grupo que consiste en (i) el dominio lítico de una lisina de bacteriófago, (ii) el dominio lítico de una bacteriocina, (iii) el dominio lítico de una autolisina bacteriana; y (iv) una proteína asociada a cola de bacteriófago que tiene actividad lítica. Por tanto, aunque en la etapa (a) básicamente cada una de las secuencias de ADN (una o más) codifica o bien para al menos un CBD o bien para al menos un EAD, opcionalmente la etapa (a) incluye además proporcionar una o más secuencias de ADN, en el que cada secuencia de ADN codifica tanto para al menos un CBD como para al menos un EAD.

En la presente invención, la generación de fragmentos de PCR específicos de la posición que pueden ligarse (véase el ejemplo 2) puede realizarse de dos maneras: o bien con un cebador que no está marcado con etiqueta (es decir, por ejemplo, un cebador no biotinilado) o bien con un cebador que está marcado con etiqueta (es decir, por ejemplo, un cebador biotinilado). Los productos de PCR para secuencias de dominio, que se generan con un cebador que no está marcado con etiqueta, así como los productos de PCR para la secuencia de primer dominio ("posición 1") generados con un cebador que está marcado con etiqueta, deben purificarse usando kits de purificación comunes. Los productos de PCR para secuencias de dominio excepto por secuencias de primer dominio generadas con un cebador que está marcado con etiqueta (con, por ejemplo, una etiqueta de biotina) pueden purificarse mediante partículas magnéticas preparadas de manera correspondiente. Es decir, en el caso de usar el sistema de biotina-estreptavidina, tales productos de PCR pueden purificarse mediante partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina. En particular, los productos de PCR se unen a perlas, que posteriormente se lavan para aplicar un tampón apropiado o cambiar de tampón y se liberan de perlas mediante digestión de restricción en sitios de restricción anteriormente introducidos en la secuencia de dominio. Los productos de PCR para secuencias de primer dominio generadas con un cebador que se marca con etiqueta pero puede no purificarse mediante partículas magnéticas junto con el uso de una enzima de restricción porque esto eliminaría el marcaje con etiqueta de la

secuencia de primer dominio, lo que sin embargo se requiere para la unión de secuencias de primer dominio a un soporte sólido.

5 En la presente invención, la amplificación de las secuencias de dominio sigue procedimientos convencionales usando PCR y cebadores específicos de la posición. Alternativamente, pueden obtenerse secuencias de dominio a partir de preparaciones de plásmido, es decir para la reacción de ligación pueden prepararse secuencias de dominios mediante digestión de restricción a partir de plásmidos, que portan las secuencias de dominio y que se cultivan en hospedadores apropiados para la "amplificación" de los plásmidos.

10 En la presente invención, la unión de productos de ligación a un soporte sólido se realiza usando un marcaje con etiqueta, preferiblemente un marcaje con etiqueta de biotina. Diversas etiquetas de péptidos se han vuelto populares en biotecnología, entre ellas aquellas que permiten esencialmente la inmovilización reversible de proteínas con matrices de afinidad.

15 En la presente invención, la introducción de un marcaje con etiqueta en el extremo 5' o en el extremo 3' de una secuencia de ADN de dominio puede realizarse usando sistemas de marcaje convencionales que implican el uso, por ejemplo, de cebadores biotinilados en 5' y 3', respectivamente. En diversas realizaciones, el marcaje con etiqueta puede introducirse no directamente en el extremo 5', sino en una posición de base ubicada más en el sentido del extremo 3', siempre que el marcaje con etiqueta todavía pueda retirarse mediante una digestión con enzima de restricción. En la presente invención, un marcaje con etiqueta es un marcaje que proporciona una unión de una secuencia de ácido nucleico a un soporte sólido tal como una partícula, una superficie de un dispositivo, una lámina metálica o un vellón, más específicamente una perla de sílice o una perla de polímero orgánico, que puede ser magnético. Por tanto, en diversas realizaciones de la presente invención un marcaje con etiqueta prevé un marcaje con etiqueta química, por ejemplo un marcaje con biotina o un marcaje con digoxigenina. En diversas realizaciones, el sistema de biotina-estreptavidina es un sistema preferido para usarse en los métodos según la presente invención, en el que la unión de una secuencia de dominio, específicamente una secuencia de primer dominio según la presente invención, o un constructo de ligación de dos o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD a un soporte sólido se realiza mediante estreptavidina. En diversas otras realizaciones, el sistema de digoxigenina-anticuerpo es un sistema preferido para usarse en los métodos según la presente invención, en el que la unión de una secuencia de dominio, específicamente una secuencia de primer dominio según la presente invención, o un constructo de ligación de dos o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD a un soporte sólido se realiza mediante un anticuerpo.

20 25 30 En diversas realizaciones de los métodos de la presente invención, el primer dominio que va a ligarse al soporte sólido puede ser un dominio sin sentido, que porta un marcaje con etiqueta y que puede desprenderse tras realizar la(s) etapa(s) de ligación que ligan los dominios de EAD y CBD a la fase de soporte sólido, es decir según la etapa de liberar el producto de ligación obtenido del soporte sólido.

35 En la presente invención, se realizan digestiones de restricción con enzimas de restricción mediante procedimientos convencionales y según el manual del fabricante de la enzima de restricción respectiva.

40 En la presente invención, la ligación de secuencias de dominio sigue procedimientos convencionales. En diversas realizaciones, la ligación de las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio se realiza en tampón de ligasa mientras que la ligación del 1^{er} y 2^o dominio ligados con una o más secuencias de dominio adicionales se realiza en tampón de enzima de restricción de la(s) enzima(s) de restricción respectiva(s) con la adición de ATP. En diversas realizaciones, la ligación de dominios a la fase sólida, es decir ligación de dominios al soporte sólido que ya tiene unido un producto de ligación, se realiza usando dominios unidos y libres en una razón de 1:5, preferiblemente 1:10. En diversas realizaciones, la razón de dominios unidos y libres es de 1:15, más preferiblemente 1:20.

45 50 55 60 En los métodos de la presente invención, las secuencias de dominio pueden ligarse a la fase de soporte sólido tras haberse realizado una digestión de restricción con cada una de las secuencias de dominio amplificadas con la enzima de restricción apropiada que selecciona como diana el sitio de restricción anteriormente introducido en las secuencias de dominio respectivas según la presente invención. Alternativamente, las secuencias de dominio pueden ligarse a la fase de soporte sólido digiriéndose únicamente ese extremo de la secuencia de dominio con una enzima de restricción correspondiente, que se liga a la secuencia de dominio anterior en la fase de soporte sólido. Dependiendo de la orientación del producto de ligación en crecimiento, es decir dependiendo de que el marcaje con etiqueta de la secuencia de primer dominio esté o bien en el extremo 5' o bien en el extremo 3', el extremo digerido de la secuencia de dominio que va a ligarse puede ser o bien el extremo 3' o bien el extremo 5'. En esta situación, se realiza una digestión de restricción en la fase de soporte sólido, es decir, en particular, en el producto de ligación en crecimiento, usando la enzima de restricción apropiada que selecciona como diana el sitio de restricción introducido en la secuencia de dominio ligada más reciente con el fin de preparar el extremo no ligado de la secuencia de dominio ligada más reciente para ligarse con una secuencia de dominio adicional. Esta manera alternativa de la digestión de restricción y ligación de una secuencia de dominio etapa por etapa es preferiblemente aplicable en la situación en la que las secuencias de dominio que pueden ligarse se amplifican usando un cebador que está marcado con etiqueta (es decir, por ejemplo, un cebador biotinilado). Por consiguiente, los productos de PCR resultantes pueden purificarse mediante partículas magnéticas preparadas de manera correspondiente y los productos de PCR se liberan de las perlas mediante digestión de restricción, que se realiza en el sitio de restricción

anteriormente introducido en la secuencia de dominio que va a amplificarse, que se requiere para ligar la secuencia de dominio al producto de ligación en crecimiento en la fase de soporte sólido. Este enfoque no requiere realizar una digestión de restricción en el otro sitio de restricción anteriormente introducido en el otro extremo (o bien 5' o bien 3') de la secuencia de dominio que va a amplificarse. Tal como se describió anteriormente, entonces se realiza una digestión de restricción en este sitio de restricción tras haberse ligado la secuencia de dominio a la fase de soporte sólido.

En diversas realizaciones de la presente invención, la etapa de liberar el producto de ligación o productos de ligación del soporte sólido se lleva a cabo usando una enzima de restricción que selecciona como diana el sitio de restricción en el extremo del 1^{er} dominio que está portando el marcaje con etiqueta. En diversas otras realizaciones de la presente invención, la etapa de liberar el producto de ligación o productos de ligación del soporte sólido se lleva a cabo liberando la etiqueta unida del soporte sólido. En este caso, se libera el producto de ligación junto con el marcaje con etiqueta del soporte sólido. Por tanto, cuando se usa, por ejemplo, el sistema de biotina-estreptavidina en los métodos de la presente invención, esto significa la rotura del enlace estreptavidina-biotina en condiciones apropiadas. Cuando la etapa de liberar el producto de ligación del soporte sólido se lleva a cabo liberando la etiqueta unida del soporte sólido, la posterior clonación del producto de ligación liberado en un vector de expresión requiere una digestión de restricción del producto de ligación con la enzima de restricción respectiva que selecciona como diana el sitio de restricción en el extremo del 1^{er} dominio del producto de ligación que está portando el marcaje con etiqueta.

En la presente invención, introducir el vector de expresión que porta el producto de ligación liberado del soporte sólido en un hospedador de expresión puede realizarse mediante métodos descritos en manuales de laboratorio convencionales, e incluye procedimientos de transformación convencionales tales como, por ejemplo, electroporación o el uso de células químicamente competentes. En la presente invención, el hospedador de expresión, en el que se introduce el vector de expresión que porta el producto de ligación, incluye cualquier sistema basado en hospedador, que permite la expresión del producto de ligación liberado del soporte sólido. Pueden modificarse células hospedadoras por ingeniería genética para incorporar sistemas de expresión o partes de los mismos. Los ejemplos representativos de hospedadores apropiados incluyen células bacterianas, tales como células de estreptococos, estafilococos, enterococos, *E. coli*, *Streptomyces* y *Bacillus subtilis*; células fúngicas, tales como células de levadura y células de *Aspergillus*; células de insecto tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células de animales tales como células CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293 y de melanoma de Bowes y células vegetales.

En la presente invención, el hospedador de expresión es preferiblemente una cepa de expresión bacteriana. Más preferiblemente, la cepa de expresión bacteriana es una cepa de expresión bacteriana inducible tal como, por ejemplo, las cepas de expresión T5 o T7. En general, el experto en la técnica conoce hospedadores de expresión y vectores de expresión (plásmidos) que pueden usarse en la presente invención.

Los vectores de expresión que van a usarse en la presente invención proporcionan o están diseñados para permitir la clonación del producto de ligación obtenido del soporte sólido mediante sitios de enzimas de restricción apropiados. Los constructos de sistema de expresión que van a usarse en la presente invención pueden contener regiones de control que regulan así como generan la expresión. Generalmente, con respecto a esto cualquier sistema o vector adecuado para expresar productos de ligación y polipéptidos quiméricos según la presente invención puede usarse para la expresión. Las secuencias apropiadas pueden insertarse en el sistema de expresión mediante cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas y rutinarias.

En diversas realizaciones, el vector de restricción porta un marcador de selección apropiado tal como, por ejemplo, un gen de resistencia a ampicilina.

En la presente invención, seleccionar un clon de expresión que expresa un polipéptido quimérico lítico codificado por las secuencias de dominio de un producto de ligación obtenido del soporte sólido incluye, pero no se limita a, escoger colonias individuales que forman un halo lítico en placas de agar que comprenden, por ejemplo, células de *Listeria*. Tales colonias son transformantes que portan un vector de expresión con un producto de ligación y que expresan un polipéptido, que es lítico contra dichas células de *Listeria*. Las colonias individuales pueden aislarse, por ejemplo, escogiendo y cultivando en placas de agar de reserva apropiadas. Una placa de agar de reserva apropiada comprende un antibiótico según el vector de expresión que porta el producto de ligación obtenido del soporte sólido.

Se entenderá que no todos los vectores, secuencias de control de la expresión y hospedadores funcionarán igual de bien para expresar las secuencias de ADN de esta invención. Ni tampoco todos los hospedadores funcionarán igual de bien con el mismo sistema de expresión. Sin embargo, un experto en la técnica podrá seleccionar vectores, secuencias de control de la expresión y hospedadores apropiados sin experimentación excesiva para lograr la expresión deseada sin apartarse del alcance de la invención.

En la presente invención, caracterizar e identificar un polipéptido que puede obtenerse mediante los métodos de la presente invención como polipéptido lítico incluye, pero no se limita a, someter a prueba clones seleccionados para determinar su actividad lítica contra varias cepas bacterianas, es decir, por ejemplo, contra diferentes

serovariedades de *Listeria*. Por tanto, un polipéptido lítico que puede obtenerse mediante los métodos de la presente invención puede caracterizarse para determinar su actividad lítica contra una o más cepas bacterianas.

5 En la presente invención, caracterizar e identificar un polipéptido que puede obtenerse mediante los métodos de la presente invención como polipéptido lítico también incluye, pero no se limita a, secuenciar los clones que muestran actividad lítica contra cepas bacterianas, es decir identificar la secuencia del polipéptido lítico codificada por el plásmido que porta el producto de ligación obtenido en los métodos de la presente invención.

10 En la presente invención, caracterizar e identificar un polipéptido que puede obtenerse mediante los métodos de la presente invención como polipéptido lítico incluye además, pero no se limita a, realizar pruebas sobre la expresión del polipéptido lítico codificado por el plásmido que porta el producto de ligación obtenido en los métodos de la presente invención. En la presente invención, eliminar secuencias de dominio no ligadas tras realizar las etapas de ligar dominios a la fase de soporte sólido incluye, pero no se limita a, lavar la fase de soporte sólido usando un tampón de lavado apropiado para eliminar mediante lavado las secuencias de dominio no ligadas. Por tanto, en la presente invención la etapa de eliminar secuencias de dominio no ligadas tras una etapa de ligación es preferiblemente una etapa de lavado. Lo mismo es válido para la etapa de eliminar secuencias de dominio no unidas tras unir secuencias de primer dominio y/o constructos de ligación según la presente invención a un soporte sólido.

20 En general, los métodos según la presente invención pueden comprender una o más etapas de lavado tras cada etapa de unir una secuencia de primer dominio o un constructo de ligación de dos o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD a un soporte sólido. Lo mismo se aplica a cada etapa de ligar secuencias de dominio a una secuencia de primer dominio y/o a un constructo de ligación de dos o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD, que se unen originalmente al soporte sólido con el fin de formar productos de ligación mediante la realización repetida de etapas de ligación con dicha(s) secuencia(s) de primer dominio y/o dicho(s) constructo(s) de ligación. Tal como se usan el presente documento, las etapas de lavado proporcionan cambiar tampones, lo cual puede ser necesario debido, por ejemplo, a diferentes enzimas de restricción que van a usarse cuando se realizan las etapas de ligación de los métodos de la presente invención. De manera similar, una etapa de lavado puede resultar necesaria entre las etapas de unión de una secuencia de primer dominio o un constructo de ligación de dos o más secuencias de dominio seleccionadas de secuencias de CBD y EAD a un soporte sólido y las etapas posteriores de ligación. Además, una o más etapas de lavado pueden resultar necesarias tras realizar una digestión de restricción con la fase de soporte sólido tal como se describió anteriormente en el presente documento, es decir, una digestión de restricción realizada con el producto de ligación en crecimiento.

25 30 Tales etapas de lavado pueden no sólo resultar necesarias para cambiar tampones, en particular tampones de enzima de restricción, sino que también pueden realizarse con el fin de eliminar, es decir eliminar mediante lavado, productos no deseados que resultan de la digestión de restricción. Por consiguiente, tales etapas de lavado tal como se describió anteriormente pueden realizarse tras cualquier etapa de realizar una digestión de restricción en la presente invención.

35 Tal como entenderá un experto en la técnica, el método de generación de un polipéptido quimérico que tiene al menos un CBD y al menos un EAD según la presente invención (véase el punto [2] en "Sumario de la invención") puede comprender además una etapa de clonar el producto de ligación obtenido en la etapa (I) en un vector de clonación antes de caracterizar los productos de ligación obtenidos. La caracterización de un polipéptido que puede obtenerse mediante dicho método como polipéptido quimérico según la presente invención incluye, pero no se limita

40 a, secuenciación de los productos de ligación obtenidos y esclarecimiento así de las estructuras de dominios CBD y EAD. Además, la caracterización de un polipéptido que puede obtenerse mediante dicho método como polipéptido quimérico según la presente invención puede realizarse sometiendo a prueba el polipéptido para determinar su actividad de unión a pared celular y lítica contra varias cepas bacterianas, por ejemplo, contra diferentes serovariedades de *Listeria*.

45 En la presente invención, los términos "proteína" y "péptido" pueden usarse de manera intercambiable con el término "enzima". En otras palabras, un "polipéptido quimérico lítico" que puede obtenerse mediante los métodos de la presente invención es un polipéptido que comprende uno o más dominios heterólogos que muestran actividad lítica sobre células bacterianas patógenas.

50 En diversas realizaciones de la presente invención, los métodos comprenden además una etapa de seleccionar hospedadores de expresión que portan el vector de expresión con el producto de ligación clonado en los mismos antes de cultivar el hospedador de expresión en condiciones adecuadas para permitir la expresión de un polipéptido lítico codificado por las secuencias de dominio del producto de ligación clonado.

55 En diversas realizaciones de la presente invención, las secuencias de dominio se unen (ligan) mediante una secuencia de ligador, que es una secuencia de ligador nativa o sintética. En diversas realizaciones de la presente invención, la "secuencia de ligador" se refiere a una secuencia de aminoácidos que une dos secuencias de dominio de un polipéptido quimérico lítico de la presente invención o fragmentos o variantes de las mismas. En general, tal como se usa en el presente documento, un ligador incluye, pero no se limita a, una secuencia de aminoácidos que une de manera covalente los dominios del polipéptido quimérico lítico que puede obtenerse mediante la presente invención. Más específicamente, el ligador comprende al menos un enlace peptídico. Tal como aprecia un experto

60 en la técnica, el ligador puede comprender aminoácidos adicionales. En general, una secuencia de ligador o ligador

de dominio tal como se usa en la presente invención indica una secuencia de aminoácidos que funciona para conectar secuencias de dominio individuales entre sí. El experto en la técnica conoce propiedades de las secuencias de ligador o los ligadores de dominio según la presente invención así como métodos para detectar los mismos. En la presente invención, puede incorporarse una secuencia de ligador en un polipéptido quimérico que puede obtenerse mediante los métodos de la presente invención si es parte de un vector de clonación tal como se muestra a modo de ejemplo en la figura 1. Aunque la figura 1 muestra a modo de ejemplo un ligador sintético, el ligador del vector de clonación también puede ser un ligador nativo clonado en el vector de clonación. Alternativamente, puede incorporarse un ligador nativo en un polipéptido quimérico que puede obtenerse mediante los métodos de la presente invención si se aísla una secuencia de dominio seleccionada junto con su secuencia de ligador nativa. Además, puede incorporarse una secuencia de ligador en un polipéptido quimérico que puede obtenerse mediante los métodos de la presente invención por medio de PCR aplicada en diversas etapas de los métodos de la presente invención.

Los métodos para generar un polipéptido quimérico que tiene al menos un CBD y al menos un EAD según la presente invención proporcionan una pluralidad de polipéptidos quiméricos. La presente invención también proporciona una biblioteca de ADN que comprende los clones que portan los productos de ligación obtenidos en los métodos según la presente invención.

Basándose en métodos de pruebas comparativas disponibles en la técnica (véase, por ejemplo, Kusuma y Kokai-Kun 2005), el experto en la técnica puede determinar fácilmente si un polipéptido quimérico lítico obtenido mediante los métodos de la presente invención muestra propiedades biológicas mejoradas con respecto a polipéptidos líticos conocidos en la técnica. Las propiedades biológicas mejoradas significan una mejora con respecto a una concentración de trabajo inferior, estabilidad superior, especificidad alterada y/o actividad de hidrolización sobre paredes celulares bacterianas.

En diversas realizaciones preferidas, los métodos de la presente invención comprenden amplificar las secuencias de 1^{er}, 2^o y 3^{er} dominio, y opcionalmente amplificar una o más secuencias de dominio adicionales.

En diversas realizaciones del método para generar un polipéptido quimérico según el primer aspecto de la invención, la etapa (m), es decir caracterizar el producto de ligación obtenido en la etapa (l), comprende las etapas de:

- (m) clonar el producto de ligación obtenido en la etapa (l) en un vector de expresión;
- (n) introducir el vector obtenido en la etapa (m) en un hospedador de expresión, preferiblemente en un hospedador de expresión bacteriano;
- (o) cultivar el hospedador de expresión de la etapa (n) que porta el vector obtenido en la etapa (m) en condiciones adecuadas para permitir la expresión de un polipéptido lítico codificado por las secuencias de dominio del producto de ligación clonado;
- (p) seleccionar y aislar un clon de expresión que expresa un polipéptido lítico según la etapa (o) usando la actividad lítica del polipéptido; y
- (q) caracterizar el polipéptido lítico expresado por el clon de expresión aislado de la etapa (p) e identificar un polipéptido quimérico lítico que tiene al menos un CBD y al menos un EAD.

En diversas realizaciones del método de examen para un polipéptido quimérico lítico y el método de generación de un polipéptido quimérico según el segundo aspecto de la invención, las etapas (h) y (j) y etapas (k) y (l) pueden combinarse, tal como se refleja en las etapas (h) y (j) correspondientes de las realizaciones siguientes de los métodos reivindicados según el segundo aspecto de la invención:

- 1°. Un método de examen para un polipéptido quimérico lítico que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un dominio de unión a células (CBD) y una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un dominio activo enzimático (EAD) y opcionalmente una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un CBD y al menos un EAD, en el que el EAD se selecciona del grupo que consiste en
 - (i) el dominio lítico de una lisina de bacteriófago,
 - (ii) el dominio lítico de una bacteriocina,
 - (iii) el dominio lítico de una autolisina bacteriana; y
 - (iv) una proteína asociada a cola de bacteriófago que tiene actividad lítica;
 - (b) amplificar una secuencia de primer (1^{er}) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir diferentes sitios de restricción en el extremo 5' y en el extremo 3', y un marcaje con etiqueta en el extremo 5' o en el extremo 3';

- (c) amplificar una secuencia de segundo (2º) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir:
- 5 (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del 1^{er} dominio, y en el extremo 3' un sitio de restricción diferente de los sitios de restricción introducidos en la secuencia de 1^{er} dominio,
- (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del 1^{er} dominio, y en el extremo 5' un sitio de restricción diferente de los sitios de restricción introducidos en la secuencia de 1^{er} dominio;
- 10 (d) opcionalmente amplificar una secuencia de tercer (3^{er}) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir:
- (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del 2º dominio anterior, y en el extremo 3' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 5' del 1^{er} dominio,
- 15 (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del 2º dominio anterior, y en el extremo 5' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 3' del 1^{er} dominio;
- en el que el par de cebadores se diseña además de manera que los sitios de restricción sean diferentes en el extremo 5' y en el extremo 3' de la secuencia de 3^{er} dominio;
- (e) opcionalmente amplificar una o más secuencias de dominio adicionales seleccionadas de las secuencias de dominio de (a) para ampliar la serie de secuencias de dominio según las etapas (b) a (d), usando para cada una de dicha una o más secuencias de dominio adicionales un par de cebadores diseñados siguiendo el principio de las etapas (c) y (d) para introducir:
- 20 (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del dominio anterior, y en el extremo 3' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 5' del 1^{er} dominio,
- 25 (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del dominio anterior, y en el extremo 5' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 3' del 1^{er} dominio;
- en el que el par de cebadores se diseña además de manera que los sitios de restricción sean diferentes en el extremo 5' y en el extremo 3' de cada una de dicha una o más secuencias de dominio adicionales;
- 30 (f) realizar una digestión de restricción de las secuencias de dominio de cualquiera de las etapas (b) a (e):
- (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción de la secuencia de dominio de la etapa (b) con una enzima de restricción que selecciona como diana el sitio de restricción en el extremo 3' y realizar una digestión de restricción de las secuencias de dominio de cualquiera de las etapas (c) a (e) con enzimas de restricción que seleccionan como diana los sitios de restricción en los extremos 5',
- 35 (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción de la secuencia de dominio de la etapa (b) con una enzima de restricción que selecciona como diana el sitio de restricción en el extremo 5' y realizar una digestión de restricción de las secuencias de dominio de cualquiera de las etapas (c) a (e) con enzimas de restricción que seleccionan como diana los sitios de restricción en los extremos 3';
- 40 (g) ligar las secuencias de 1^{er} y 2º dominio digeridas obtenidas en la etapa (f) para obtener un producto de ligación que comprende las secuencias de 1^{er} y 2º dominio;
- (h) unir el producto de ligación de la etapa (g) a un soporte sólido usando el marcaje de etiqueta de la secuencia de 1^{er} dominio para obtener un producto de ligación unido que comprende las secuencias de 1^{er} y 2º dominio, y realizar una digestión de restricción de dicho producto de ligación unido:
- 45 (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 3' del 2º dominio,
- (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 5' del 2º dominio;
- 50 (j) ligar opcionalmente la secuencia de 3^{er} dominio digerida de la etapa (d) obtenida en la etapa (f) al producto de ligación unido de la etapa (h) para obtener un producto de ligación unido que comprende las secuencias de 1^{er}, 2º y 3^{er} dominio, y realizar una digestión de restricción de dicho producto de ligación unido:

- (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 3' del 3^{er} dominio.
- (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 5' del 3^{er} dominio,
- 5 (k) ligar opcionalmente una o más secuencias de dominio digeridas de (e) obtenidas en la etapa (f) al producto de ligación unido de la etapa (j) para obtener un producto de ligación unido que comprende una o más secuencias de dominio adicionales de la etapa (e), realizando de ese modo tras cada etapa de ligación una digestión de restricción del producto de ligación unido tal como sigue:
- 10 (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 3' de dicha secuencia de dominio adicional que se ligó al producto de ligación unido,
- (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 5' de dicha secuencia de dominio adicional que se ligó al producto de ligación unido;
- 15 (l) liberar el producto de ligación obtenido en cualquiera de las etapas (h) a (k) del soporte sólido;
- (m) clonar el producto de ligación obtenido en la etapa (l) en un vector de expresión;
- (n) introducir el vector obtenido en la etapa (m) en un hospedador de expresión, preferiblemente en un hospedador de expresión bacteriano;
- 20 (o) cultivar el hospedador de expresión de la etapa (n) que porta el vector obtenido en la etapa (m) en condiciones adecuadas para permitir la expresión de un polipéptido lítico codificado por las secuencias de dominio del producto de ligación clonado;
- (p) seleccionar y aislar un clon de expresión que expresa un polipéptido lítico según la etapa (o) usando la actividad lítica del polipéptido; y
- 25 (q) caracterizar el polipéptido lítico expresado por el clon de expresión aislado de la etapa (p) e identificar un polipéptido quimérico lítico.
- 2^o. Un método de generación de un polipéptido quimérico que tiene al menos un dominio de unión a células (CBD) y al menos un dominio activo enzimático (EAD), comprendiendo el método las etapas de:
- (a) proporcionar una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un CBD y una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un EAD, y opcionalmente una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un CBD y al menos un EAD, en el que el EAD se selecciona del grupo que consiste en
- 30 (i) el dominio lítico de una lisina de bacteriófago;
- (ii) el dominio lítico de una bacteriocina;
- (iii) el dominio lítico de una autolisina bacteriana; y
- (iv) una proteína asociada a cola de bacteriófago que tiene actividad lítica.
- 35 (b) amplificar una secuencia de primer (1^{er}) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir diferentes sitios de restricción en el extremo 5' y en el extremo 3', y un marcaje con etiqueta en el extremo 5' o en el extremo 3';
- (c) amplificar una secuencia de segundo (2^o) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir:
- 40 (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del primer dominio, y en el extremo 3' un sitio de restricción diferente de los sitios de restricción introducidos en la secuencia de 1^{er} dominio,
- (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del 1^{er} dominio, y en el extremo 5' un sitio de restricción diferente de los sitios de restricción introducidos
- 45 en la secuencia de 1^{er} dominio;
- (d) opcionalmente amplificar una secuencia de tercer (3^{er}) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir:
- (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el

- extremo 3' del 2º dominio anterior, y en el extremo 3' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 5' del 1º dominio,
- (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1º dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del 2º dominio anterior, y en el extremo 5' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 3' del 1º dominio;
- 5 en el que el par de cebadores se diseña además de manera que los sitios de restricción sean diferentes en el extremo 5' y en el extremo 3' de la secuencia de 3º dominio;
- (e) opcionalmente amplificar una o más secuencias de dominio adicionales seleccionadas de las secuencias de dominio de (a) para ampliar la serie de secuencias de dominio según las etapas (b) a (d), usando para cada una de dicha una o más secuencias de dominio adicionales un par de cebadores diseñados siguiendo el principio de las etapas (c) y (d) para introducir:
- 10 (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1º dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del dominio anterior, y en el extremo 3' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 5' del 1º dominio,
- 15 (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1º dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del dominio anterior, y en el extremo 5' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 3' del 1º dominio;
- en el que el par de cebadores se diseña además de manera que los sitios de restricción sean diferentes en el extremo 5' y en el extremo 3' de cada una de dicha una o más secuencias de dominio adicionales;
- 20 (f) realizar una digestión de restricción de las secuencias de dominio de cualquiera de las etapas (b) a (e):
- (i) en el caso del marcaje en el extremo 5' del 1º dominio: realizar una digestión de restricción de la secuencia de dominio de la etapa (b) con una enzima de restricción que selecciona como diana el sitio de restricción en el extremo 3' y realizar una digestión de restricción de las secuencias de dominio de cualquiera de las etapas (c) a (e) con enzimas de restricción que seleccionan como diana los sitios de restricción en los extremos 5',
- 25 (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1º dominio: realizar una digestión de restricción de la secuencia de dominio de la etapa (b) con una enzima de restricción que selecciona como diana el sitio de restricción en el extremo 5' y realizar una digestión de restricción de las secuencias de dominio de cualquiera de las etapas (c) a (e) con enzimas de restricción que seleccionan como diana los sitios de restricción en los extremos 3';
- (g) ligar las secuencias de 1º y 2º dominio digeridas obtenidas en la etapa (f) para obtener un producto de ligación que comprende las secuencias de 1º y 2º dominio;
- 30 (h) unir el producto de ligación de la etapa (g) a un soporte sólido usando el marcaje de etiqueta de la secuencia de 1º dominio para obtener un producto de ligación unido que comprende las secuencias de 1º y 2º dominio, y realizar una digestión de restricción de dicho producto de ligación unido:
- (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1º dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido con una enzima de restricción que selecciona como diana el extremo 3' del 2º dominio,
- 35 (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1º dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido con una enzima de restricción que selecciona como diana el extremo 5' del 2º dominio;
- (j) ligar opcionalmente la secuencia de 3º dominio digerida de la etapa (d) obtenida en la etapa (f) al producto de ligación unido de la etapa (h) para obtener un producto de ligación unido que comprende las secuencias de 1º, 2º y 3º dominio, y realizar una digestión de restricción de dicho producto de ligación unido:
- 40 (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1º dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido con una enzima de restricción que selecciona como diana el extremo 3' del 3º dominio.
- (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1º dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido con una enzima de restricción que selecciona como diana el extremo 5' del 3º dominio,
- 45 (k) ligar opcionalmente una o más secuencias de dominio digeridas de (e) obtenidas en la etapa (f) al producto de ligación unido de la etapa (j) para obtener un producto de ligación unido que comprende una o más secuencias de dominio adicionales de la etapa (e), realizando de ese modo tras cada etapa de ligación una digestión de restricción del producto de ligación unido tal como sigue:
- (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1º dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 3' de dicha secuencia de dominio adicional que se ligó al producto de ligación unido,
- 50

- (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido con una enzima de restricción que selecciona como objetivo el extremo 5' de dicha secuencia de dominio adicional que se ligó al producto de ligación unido;
- (l) liberar el producto de ligación obtenido en cualquiera de las etapas (h) a (k) del soporte sólido;
- 5 (m) caracterizar el producto de ligación obtenido en la etapa (l) e identificar polipéptidos quiméricos que tienen al menos un CBD y al menos un EAD.
- 3^o. El método según el punto 1^o o 2^o, que comprende además una etapa de lavado tras unir el primer producto de ligación al soporte sólido en la etapa (h) para eliminar los productos de ligación no unidos y/o las secuencias de dominio no ligadas.
- 10 4^o. El método según uno cualquiera de los puntos 1^o a 3^o, en el que las etapas (g) y (h) se sustituyen por una etapa de unir la secuencia de 1^{er} dominio digerida a un soporte sólido usando el marcaje de etiqueta en el extremo 5' o en el extremo 3', respectivamente, y una etapa posterior de ligar la secuencia de 2^o dominio digerida de la etapa (c) obtenida en la etapa (f) a la secuencia de 1^{er} dominio unida para obtener un producto de ligación unido que comprende las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio, seguido por realizar una digestión de restricción de dicho producto de ligación unido:
- 15 (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido con una enzima de restricción que selecciona como diana el extremo 3' del 2^o dominio,
- (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: realizar una digestión de restricción del producto de ligación unido con una enzima de restricción que selecciona como diana el extremo 5' del 2^o dominio.
- 20 5^o. El método según el punto 4^o, que comprende además una etapa de eliminar secuencias de dominio no unidas tras unir el primer producto de ligación al soporte sólido, y opcionalmente una etapa adicional de eliminar secuencias de dominio no ligadas tras ligar la segunda secuencia de dominio a la primera secuencia de dominio unida.
- 6^o. El método para examinar un polipéptido quimérico lítico según uno cualquiera de los puntos 1^o y 3^o a 5^o, que comprende además una etapa de eliminar secuencias de dominio no ligadas y/o productos no deseados que resultan de la digestión de restricción tras cada etapa de ligación y restricción realizada en cualquiera de las etapas (h) a (k).
- 25 7^o. El método para generar polipéptidos quiméricos que tienen al menos un CBD y al menos un EAD según uno cualquiera de los puntos 2^o a 5^o, que comprende además una etapa de eliminar secuencias de dominio no ligadas y/o productos no deseados que resultan de la digestión de restricción tras cada etapa de ligación y restricción realizada en la etapas (h) a (k).
- 30 8^o. El método según uno cualquiera de los puntos 2^o a 5^o, en el que la etapa (m) comprende las etapas de:
- (m) clonar el producto de ligación obtenido en la etapa (l) en un vector de expresión;
- (n) introducir el vector obtenido en la etapa (m) en un hospedador de expresión, preferiblemente en un hospedador de expresión bacteriano;
- 35 (o) cultivar el hospedador de expresión de la etapa (n) que porta el vector obtenido en la etapa (m) en condiciones adecuadas para permitir la expresión de un polipéptido lítico codificado por las secuencias de dominio del producto de ligación clonado;
- (p) seleccionar y aislar un clon de expresión que expresa un polipéptido lítico según la etapa (o) usando la actividad lítica del polipéptido; y
- 40 (q) caracterizar el polipéptido lítico expresado por el clon de expresión aislado de la etapa (p) e identificar un polipéptido quimérico lítico que tiene al menos un CBD y al menos un EAD.
- 9^o. El método según uno cualquiera de los puntos 1^o a 8^o, en el que las secuencias de dominio de (a) se clonan en un vector antes de la amplificación.
- 10^o. El método según uno cualquiera de los puntos 1^o a 9^o, en el que la etapa de liberar el producto de ligación o productos de ligación del soporte sólido se lleva a cabo usando una enzima de restricción que selecciona como diana el sitio de restricción en aquel extremo del 1^{er} dominio que está portando el marcaje con etiqueta.
- 45 11^o. El método según uno cualquiera de los puntos 1^o a 10^o, en el que en el caso de etapas de ligación repetidas opcionalmente tras cualquier etapa de ligación repetida, parte del producto de ligación unido obtenido se separa del método antes de realizar una etapa de ligación posterior.
- 50 12^o. El método según uno cualquiera de los puntos 1^o a 11^o, en el que el soporte sólido es una partícula, una

superficie de un dispositivo, una lámina metálica o un vellón.

13". El método según el punto 12", en el que la partícula es una perla de sílice o una perla de polímero orgánico que es magnética.

5 14". Un polipéptido quimérico lítico que puede obtenerse mediante el método para examinar un polipéptido quimérico lítico según uno cualquiera de los puntos 1" y 3" a 13".

15". Un polipéptido quimérico o una pluralidad de polipéptidos quiméricos que pueden obtenerse mediante el método de generación de polipéptidos quiméricos que tienen al menos un CBD y al menos un EAD según uno cualquiera de los puntos 2" a 13".

10 16". Una biblioteca de polipéptidos quiméricos que pueden obtenerse mediante el método según uno cualquiera de los puntos 2" a 13".

Ejemplos

Ejemplo 1: Clonación de dominios seleccionados

La tabla 1 muestra dominios seleccionados usados para la construcción de bibliotecas.

15 Tabla 1: Dominios seleccionados con descripción de fuente de proteína, bordes de dominio de la secuencia de aminoácido y especificidad enzimática de EAD.

Fuente de proteína	SEQ ID NO:	Dominio	Bordes de dominio	Especificidad
Endolisina, Ply511	1	EAD511	1-195	Amidasa 2
Endolisina, Ply511	1	CBD511	194-141 + Linsyn	
Endolisina, Ply500	2	EAD500	1-154	VanY
Endolisina, Ply500	2	CBD500	148-189 + Linsyn	
Endolisina, PlyP40	3	EADP40	1-225	Lisozima de <i>Chalaropsis</i>
Endolisina, PlyP40	3	CBDP40	A: 226-344 + Linsyn B: 192-344 + Linsyn C: 192-344	
Endolisina, PlyP35	4	EADP35	1-150	VanY
Endolisina, PlyP35	4	CBDP35	140-291 + Linsyn	
Endolisina, PlyB054	5	EADB054	1-194	Amidasa 3
Endolisina, PlyPSA	6	EADPSA	1-182	Amidasa 3
Endolisina, Ply006	7	CBD006	157-235 + Linsyn	
Endolisina, PlyB025	8	CBDB025	127-276 + Linsyn	
Proteína de la cola lítica, gp29 de P100	9	EADgp29	641-795 + Linsyn	NlpC/p60 (CHAP)
Autolisina, <i>L. monocytogenes</i>	10	MurA	A: 52-327 B: 142-327	Lisozima tipo 2
Autolisina, <i>L. monocytogenes</i>	11	IspC	1-226	Lisozima tipo 2
Bacteriocina, <i>S. coelicolor</i> Müller	12	Mutanolisina	79-294 + Linsyn	Lisozima de <i>Chalaropsis</i>
Autolisina, <i>S. aureus</i> USA 300	13	Sle1	201-334 + Linsyn	NlpC/p60 (CHAP)

Linsyn: secuencia de ligador sintético, secuencia de aminoácidos: GGSKPGGTPKPGGSKP.

Se amplificaron los dominios mediante cebadores de PCR con el siguiente diseño:

Cebador directo CACAC**CCATGG**CG (dominio de inicio)

Cebador inverso de SpeI TGTGTG**ACTAGT** (dominio de finalización sin codón de TERMINACIÓN)

20 Cebador inverso de BamHI TGTGTG**GGATCC** (dominio de finalización sin codón de TERMINACIÓN)

El cebador directo contiene un sitio NcoI, y el cebador inverso para la unión de una secuencia de ligador sintético tiene un sitio SpeI, el cebador inverso para la clonación sin secuencia de ligador sintético tiene un sitio BamHI. Los sitios de restricción se muestran en negrita y subrayados.

25 Se digirieron los productos de PCR purificados con NcoI y SpeI o NcoI y BamHI y se ligaron en un vector de plásmido modificado pET14b tal como se muestra en la figura 1. Este pET14b contiene la secuencia para la región de ligador sintético en 3'. La secuencia de ligador sintético está situada entre el sitio SpeI y el sitio pET14b-BamHI

Tras la transformación de *E. coli* HMS174 (DE3) usando procedimientos comunes, se seleccionaron clones positivos con resistencia a ampicilina. Se secuenciaron los clones que expresaban la proteína del tamaño correcto.

Ejemplo 2: Generación de fragmentos de PCR específicos de la posición que podían ligarse

5 Para la introducción de los sitios de restricción específicos de la posición, se amplificaron los dominios mediante PCR mediante combinaciones de cebadores específicos de la posición (véanse la figura 2 y la tabla 1). Los dominios clonados en pET14b sirvieron como moldes de PCR. La figura 3 muestra a modo de ejemplo los productos de PCR para las posiciones 1, 2 y 3 de EAD500.

Tabla 2: Pares de cebadores específicos de la posición

Pos. 1	directo: B-5'-GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGCG-3' inverso: 5'-CCTTTCGGGCTTTGTTACTGCAGGGATCC-3'
Pos. 2	directo: 5'-GTTTAACTTTAAGAAGGAGACTGCAGATGGCG-3' inverso: 5'-CCTTTCGGGCTTTGTTAGTGCACGGATCC-3'
Pos. 3	directo: 5'-GTTTAACTTTAAGAAGGAGAGTGCACATGGCG-3' o directo: B-5'-GTTTAACTTTAAGAAGGAGAGTGCACATGGCG-3' inverso: 5'-CCTTTCGGGCTTTGTTAGATATCGGATCC-3'

B: etiqueta de biotina unida en 5'

CCATGG: sitio NcoI

CTGCAG: sitio PstI

10 **GTCGAC**: sitio Sall

GATATC: sitio EcoRV

15 Se realizó dos veces la PCR para la posición 3 del dominio: con cebador directo sin biotinilar y con cebador directo biotilado. Los productos de PCR para la posición 1 y sin etiqueta de biotina deben purificarse usando kits de purificación comunes. Los productos de PCR con etiqueta de biotina (todos excepto por la posición 1) pueden purificarse mediante partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina: unión a perlas, lavado y retirada de perlas mediante digestión de restricción.

Ejemplo 3: Prueba para determinar la actividad de dominios clonados

20 Se sometieron a prueba todos los dominios clonados para determinar la actividad del dominio. Se sometieron a prueba EAD para determinar actividad lítica de *Listeria*, se sometieron a prueba CBD para determinar actividad de unión a *Listeria*.

3-1. Pruebas de actividad lítica de *Listeria* de EAD

25 Se transfirieron clones de *E. coli* HMS (174) que contenían los constructos de pET14bEAD sobre placas de agar superior de LB que contenían IPTG para la inducción de la expresión de proteína, ampicilina para la presión de selección de plásmido y 120 µl de células de *Listeria* inactivadas por calor de *Listeria monocytogenes* EGDe (J. Kreft), serotipo 1/2a. Se transfirió cada dominio y se incubó a 30°C y posteriormente a temperatura ambiente. En el caso de lisis de *Listeria*, el clon de *E. coli* transferido se rodeó por un aclaramiento en el agar. Como resultado, todos los EAD sometidos a prueba muestran lisis con *Listeria monocytogenes* EGDe.

30 Generación de células de *Listeria* inactivadas por calor: Se hizo crecer *Listeria* en caldo de triptosa (TB), 30°C, con agitación hasta DO = 1. Tras la recogida, volvieron a suspenderse las células en un volumen de 1/200 de PBST (1xPBS + Tween al 0,1%) pH 8. Se inactivaron las células por calor durante 20 minutos a 80°C y se almacenaron a -20°C.

3-2. Pruebas de actividad de unión a *Listeria* de CBD

Purificación de proteínas de proteínas marcadas con etiqueta de C-His: Se subclonaron los CBD en sitios NcoI y BamHI de pQE60. Tras la transformación de *E. Coli* M15, se expresaron CBD con etiqueta de His C-terminal.

35 Se realizó la rotura celular mediante sonicación del sedimento celular en tampón de lavado (tampón de cloruro de sodio 50 mM (NaPi) pH 7,5, NaCl 1 M, imidazol 20 mM, Tween al 0,05%). Tras la centrifugación se usó el sobrenadante para cromatografía de afinidad común con Ni-Sepharose. Se realizaron etapas de lavado con tampón de lavado; se realizó la elución con tampón de elución (NaPi 50 mM pH 7,5, NaCl 1 M, imidazol 250 mM, Tween al 0,05%). Se dializaron las proteínas purificadas frente a Tris 25 mM pH 8, NaCl 250 mM, EDTA 2,5 mM.

ELISA para la prueba de la unión celular: ELISA de células

Cepas de *Listeria* sometidas a prueba:

WSLC 201 1: *Listeria innocua*, serotipo 6a

WSLC 1485: *Listeria monocytogenes*, serotipo 3a

5 EGDe (J. Kreft): *Listeria monocytogenes*, serotipo 1/2a

Scott A 1685: *Listeria monocytogenes*, serotipo 4b

10 Se cultivaron las cepas de *Listeria* en TB hasta DO600 = 1. Tras lavar las células dos veces en 1xPBS pH 7,2, se recubrieron placas de 96 pocillos (MaxiSorp, Nunc) con 10^8 ufc en 1xPBS durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió conjugado anti-His-pUD en PBST (Tween al 0,05%) pH 7,2 con BSA al 0,5% durante 1 h a temperatura ambiente tras 3 etapas de lavado con PBST. Antes de añadir el sustrato ABTS, se lavaron los pocillos dos veces con PBST y una vez con PBS. Se midió la absorción a 405/600 nm según el lector de ELISA. En la tabla 3 se muestra el resultado de la unión.

Tabla 3: Cualificación de la unión celular. Se muestra la cantidad mínima de señal para concluir que hay unión celular fuerte.

CBD-C His	ELISA de células
CBD006	-
CBD025	-
CBD511	30 veces la señal de fondo
CBD500	37 veces la señal de fondo
CBD5P40-A, -B, -C	-
CBDP35	75 veces la señal de fondo

15 Ejemplo 4: Captura específica de ADN biotinilado con partículas magnéticas (sin unión de ADN no biotinilado) y liberación mediante digestión de restricción

20 Se lavaron 75 µg de perlas recubiertas con estreptavidina (Microcoat) con 500 µl de 1xSSC (citrato de sodio 0,3 M, NaCl 3 M pH 7) y se incubaron con 3,76 pmol de ADN biotinilado de 600 pb, 3,76 pmol de ADN biotinilado de 1,4 kb y 3,76 pmol de ADN no biotinilado de 800 pb. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 1 h se retiró el sobrenadante (=S1) para el análisis en gel de agarosa. Tras dos etapas de lavado con 200 µl de SSC se lavaron las perlas con tampón de restricción 1xNEB P3. Volvieron a suspenderse las perlas en 20 µl de 1xNEB P3 que contenía 10 U de NcoI (NEB). Se realizó la digestión durante 2 h a 37°C. Se retiró el sobrenadante (=S2) para el análisis en gel de agarosa. Se prepararon S1, S2 y las perlas para análisis en gel de agarosa con tampón de gel.

25 La figura 4 muestra que S1 todavía contiene ADN biotinilado (600 pb y 1,4 kpb). Esto significa que se superó la capacidad de unión de las perlas. También se encuentra todo el ADN no biotinilado (800 pb) en S1, mostrando por tanto que las perlas no se unen de manera inespecífica a ADN. El ADN biotinilado capturado pudo retirarse completamente de las perlas mediante digestión de restricción.

Ejemplo 5: Ligación aleatoria de 4 EAD 4 N-terminales y 4 CBD C-terminales

30 Se seleccionaron cuatro EAD para la posición 1 y cuatro CBD para la posición 2 para ligarse de manera aleatoria con 16 variantes posibles (véase la figura 5). Para CBDP40 se eligió la variante A (véase la tabla 1).

5-1. Generación de fragmentos de PCR específicos de la posición de dominios

35 Se amplificaron los EAD mediante PCR específica para la posición 1, se amplificaron los CBD mediante PCR específica para la posición 2 (véase el ejemplo 2). Se analizaron los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa tal como se muestra en la figura 6 y se purificaron mediante kits de purificación en gel comunes. Se digirieron todos los productos de PCR con PstI y se purificaron mediante kits de purificación de PCR comunes.

5-2. Ligación de fragmentos digeridos con PstI y captura mediante partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina

Se realizó la ligación con una combinación de 0,2 pmol de cada fragmento digerido, ligasa de T4 (NEB) y tampón de ligasa de T4 durante 3 h a 16°C.

40 Se retiró un tercio de la ligación para análisis en gel (L). Se incubó el resto de ADN ligado con 750 µg de perlas de estreptavidina magnéticas (MyOne Dynal-Beads T1) que se lavaron dos veces con 500 µl de 1x tampón BW (Tris 5 mM pH 7,5, EDTA 0,5 mM, NaCl 1 M) antes de su uso. Tras 30 minutos de agitación a temperatura ambiente se retiró el sobrenadante. Tres etapas de lavado con 1x tampón NEB4 equilibraron las perlas para la digestión en

1xNEB4 con Sall (NEB) durante 2 h. Se retiró el sobrenadante (S-Sall) y se lavaron las perlas con 1xNEB4. Para separar mediante corte el ADN de las perlas, se realizó digestión con NcoI-HF en 1x tampón NEB4 durante 2 h. Se analizó la mitad del sobrenadante (NS) mediante análisis en gel de agarosa (véase la figura 7). Tras inactivar por calor la enzima NcoI-HF (20 min, 80°C) se usó el ADN restante para la clonación (D).

5 5-3. Clonación en vector de expresión y transformación de *E. coli*, siembra en placas de selección

Se ligó el ADN restante mediante NcoI y Sall en pQE60-lib, un pQE60 con un sitio de clonación múltiple modificado (véase la figura 8).

10 Se transformaron células *E. coli* M15 ultracompetentes con el ADN ligado y se sembraron en placas de selección de lisis que contenían agar superior de LB, 120 µl de células *Listeria* WSLC 2011 inactivadas por calor (véase el ejemplo 3-1), IPTG y Amp. Las colonias que expresan una proteína lítica de *Listeria* funcional y soluble muestran lisis (véase la figura 9).

5-4. Confirmación de 16 variantes posibles y prueba para determinar la funcionalidad

15 Para mostrar que se generaron todas las combinaciones de dominios posibles de 4 EAD N-terminales y 4 CBD C-terminales, se realizó PCR de colonias con 88 clones con cebador directo e inverso de pQE. Se digirió el producto de PCR mediante PstI y se analizó en geles de agarosa. Se confirmó el resultado mediante PCR específica de dominio. Se encontraron todos menos un constructo usando este procedimiento. El último constructo (B en la figura 10) se identificó mediante PCR de colonias con 93 clones adicionales usando el cebador de clonación de EADP40 directo y CBD500 inverso, se encontró B dos veces. En conclusión, todas las variantes existían (véase la figura 10).

20 Se sometió a prueba la expresión de las 16 variantes para afirmar el ensamblaje correcto de los dos dominios. Tal como se muestra en la figura 11, las 16 proteínas tienen el peso molecular correcto. Se sometió a prueba la actividad lítica de *Listeria* con placas de agar superior de LB con células de *Listeria* inactivadas por calor (véase el ejemplo 3-1). Las proteínas se comportaron tal como se esperaba con los CBD correspondientes, una excepción fueron los constructos con CBDP40-A, que no mostraron actividad lítica específica de serovariedad (véase la figura 12). Este resultado implica que CBDP40-A es inactivo.

25 Ejemplo 6: Ligación aleatoria de 19 dominios con proteínas de 2 dominios y proteínas de 3 dominios

Para la generación de proteínas de 2 y 3 dominios, se eligió cada dominio de la tabla 1 excepto por CBDP40-A, en conjunto esto significa la combinación aleatoria de 19 dominios diferentes. Es decir, cada dominio puede aparecer en cada posición. Para proteínas de 2 dominios, hay 361 combinaciones de dominios posibles. Para proteínas de 3 dominios hay 6859 combinaciones de dominios posibles.

30 6-1. Proteínas de 2 dominios

35 Para cada dominio se realizó PCR específica de la posición para las posiciones 1 y 2. Se digirieron ambos fragmentos con PstI. Se ligaron 0,06 pmol de cada fragmento mediante ligasa de T4 en tampón T4 (NEB) y se capturaron con 120 µl de perlas de estreptavidina (Microcoat) (lavadas dos veces con 1xBW) en 1xBW (2xBW = Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 2 M). Se retiró el sobrenadante con ADN no unido y se lavaron las perlas con 1xNEB4. Tras 2 h de digestión con Sall-HF en 1xNEB4 (NEB) volvieron a lavarse las perlas. Para la liberación de ADN de las perlas se realizó la digestión con NcoI-HF en 1x tampón NEB4 durante 2 h. Tras inactivar por calor la enzima NcoI-HF (20 min, 80°C) se usó el ADN para la clonación.

40 Se ligó el ADN mediante NcoI y Sall en pQE60-lib, se transformaron células *E. coli* M15 ultracompetentes y se sembraron en placas de selección de lisis que contenían agar superior de LB, 120 µl de células *Listeria* WSLC 2011 inactivadas por calor (véase el ejemplo 3-1), IPTG y ampicilina. Las colonias que expresaban una proteína lítica de *Listeria* funcional y soluble mostraron lisis y se recogieron.

Se sometieron a prueba los clones de *E. coli* recogidos para determinar la lisis en varias cepas:

WSLC 2011: *Listeria innocua*, serotipo 6a

WSLC 1485: *Listeria monocytogenes*, serotipo 3a

45 EGDe (J. Kreft): *Listeria monocytogenes*, serotipo 1/2a

Scott A 1685: *Listeria monocytogenes*, serotipo 4b

50 Se analizaron 1057 clones, es decir casi 3 veces más clones que variantes posibles. 49 clones mostraron lisis en *L. innocua* WSLC 2011 y se escogieron y se secuenciaron. La secuenciación mostró que los 49 clones contenían 21 combinaciones diferentes, y 11 de las 21 combinaciones diferentes sometieron a lisis las 4 serovariedades sometidas a prueba. Para la validación se secuenciaron 20 clones independientemente del comportamiento lítico. Como resultado, había 18 combinaciones de dominios diferentes y un clon con un fragmento foráneo de dominio. Se encontraron todos los dominios excepto CBDP35.

6-2. Proteínas de 3 dominios

La construcción de proteínas de 3 dominios sigue el mismo protocolo que para proteínas de 2 dominios pero tras la digestión con Sall-HF no se libera el ADN de las perlas sino que se liga con una cantidad de 10 veces de fragmento digerido con Sall para la posición 3 (0,6 pmol de cada dominio) en 1x tampón NEB4 con ligasa de T4 y ATP 1 mM.

5 Después de eso se digiere el ADN mediante EcoRV-HF en NEB4 durante 2 horas y se libera de las perlas mediante digestión con NcoI en 1x tampón NEB4 durante 2 h. Tras inactivar por calor la enzima NcoI-HF (20 min, 80°C) se usó el ADN para la clonación.

Se ligó el ADN mediante NcoI y EcoRV en pQE60-lib, se transformaron células *E. coli* M15 ultracompetentes con la ligación y se sembraron en placas de selección de lisis que contenían agar superior de LB, 120 µl de células *Listeria monocytogenes* EGDe inactivadas por calor (véase el ejemplo 3-1), IPTG y ampicilina. Las colonias que expresaban una proteína lítica de *Listeria* funcional y soluble mostraron lisis y se recogieron.

10 Se sometieron a prueba los clones de *E. coli* recogidos para determinar la lisis en varias cepas:

Se sometieron a prueba los clones de *E. coli* recogidos para determinar la lisis en varias cepas:

WSLC 2011: *Listeria innocua*, serotipo 6a

WSLC 1485: *Listeria monocytogenes*, serotipo 3a

15 EGDe (J. Kreft): *Listeria monocytogenes*, serotipo 1/2a

Scott A 1685: *Listeria monocytogenes*, serotipo 4b

Se analizaron 13482 clones, es decir casi 2 veces más clones que variantes posibles. Aproximadamente 940 clones mostraron lisis en *L. monocytogenes* EGDe y se escogieron. 240 clones mostraron lisis en al menos 3 de las 4 serovariedades sometidas a prueba. La secuenciación reveló 132 proteínas de 3 dominios diferentes con al menos un CBD y al menos un EAD. En los 240 clones de secuencia se encontraron todos los dominios en casi todas las posiciones posibles.

20

Bibliografía

1. Solicitud de patente del R.U. GB 2 255 561 A (11 de noviembre de 1992).
2. Nelson D. et al., 2001, PNAS 98(7):4107-4112.
- 25 3. Rashel M. et al., 2007, J. Infect. Dis. 196(8):1237-1247.
4. Patente estadounidense n.º 5.997.862 (7 de diciembre de 1999).
5. Takac M. and U. Blasi, 2005, Antimicrob. Agents Chemother. 49(7):2934-2940.
6. Navarre W. et al., 1999, J. Bioi. Chern. 274(22):15847-15856.
7. Sass P. and G. Bierbaum, 2007, Appl. Environ. Microbiol. 73(1):347-352.
- 30 8. O'Fiaherty S. et al., 2005, J. Bacteriol. 187(20):7161-7164.
9. Documento WO 2008/001342 (3 de enero de 2008)
10. Becker S. et al., 2008, FEMS Microbiol. Lett. 287(2):185-191.
11. Horgan M. et al., 2009, Appl. Environ. Microbiol. 75(3):872-874.
12. Kokai-Kun J.F. et al., 2007, J. Antimicrob. Chemother. 60(5):1051-1059.
- 35 13. Kusuma C. et al., 2007, Antimicrob. Agents Chemother. 51 (2):475-482.
14. DeHart H.P. et al., 1995, Appl. Environ. Microbiol. 61(4):1475-1479.
15. Ehlert K. et al., 1997, J. Bacteriol. 197(23):7573-7576.
16. Strandé A.M. et al., 1997, J. Bacteriol. 197(1):9-16.
17. Díaz E. et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8125-8129.
- 40 18. Croux C. et al., 1993, Mol. Microbiol. 9(5):1019-1025.
19. Donovan D.M. et al., 2006, Appl. Environ. Microbiol. 72(4):2988-2996.
20. Loessner M.J. et al., 2002, Molecular Microbiology 44(2):335-349.

21. Korndorfer I.P. *et al.*, 2006, J. Mol. Biol. 364(4):678-689.
22. Schuch R. *et al.*, 2009, *in*: Martha R.J. Clokie, Andrew M. Kropinski (eds.), Bacteriophages: Methods and Protocols, vol. 2: Molecular and Applied Aspects, Vol. 502, Humana Press.
23. Schmitz J.E. *et al.*, 2008, Appl. Environ. Microbiol. 74(5):1649-1652.
- 5 24. Kusuma M. and Kokai-Kun F., 2005, Antimicrob. Agents Chemother. 49(8):3256-63.
25. Documento WO 2010/020657 (25 de febrero de 2010).
26. Tominaga T. y Hatakeyama Y., 2007, Appl. Environ. Microbiol. 73(16):5292-5299.
27. Documento WO 2007/130655 (15 de noviembre de 2007).
28. Yamabhai M., 2009, Biotechnology Journal 4(4):544-553.
- 10 29. Kitamura K. *et al.*, 2002, Protein Engineering 15(10):843-853.
30. Documento WO 03/040342 (15 de mayo de 2003).

Lista de secuencias

SEQ ID NO: 1: secuencia de aminoácidos de endolisina Ply511 (341 residuos de aminoácido; origen: bacteriófago A511)

1 MVKYTVENKI IAGLPKGKLGK GANFVIAHET ANSKSTIDNE VSYMTRNWKN
 51 AFVTHFVGGG GRVVQVANVN YVSWGAGQYA NSYSYAQVEL CRTSNATTFK
 101 KDYEVYCQLL VDLAKKAGIP ITLDGSGKTS DKGKSHKWV ADKLGGTTHQ
 151 DPYAYLSSWG ISKAQFASDL AKVSGGGNTG TAPAKPSTPA PKPSTPSTNL
 201 DKLGLVDYMN AKKMDSSYSN RDKLAKQYGI ANYSGTASQN TTLLSKIKGG
 251 APKPSTPAPK PSTSTAKKIY FPPNKGNSV YPTNKAPVKA NAIGAINPTK
 15 301 FGGLTYTIQK DRGNGVYEQ TDQFGRVQVY GAPSTGAVIK K

SEQ ID NO: 2: secuencia de aminoácidos de endolisina Ply500 (289 residuos de aminoácido; origen: bacteriófago A500)

1 MALTEAWLIE KANRKLNAGG MYKITSDKTR NVIKKMAKEG IYLCVAQGYR
 51 STAEQNALYA QGRTPGAIIV TNAKGGQSNH NYGVAVDLCL YTNDGKDVIW
 101 ESTTSRWKKV VAAMKAEGFK WGGDWKSFKD YPHFELCDAV SGEKI PAATQ
 151 NNTNSNRYE GKVIDSAPLL PKMDFKSSPF RMYKVGTEFL VYDHNQYWYK
 201 TYIDDKLYYM YKSFCDVAK KDAKGRIKVR IKSADLRIP VWNINIKLNSG
 251 KIKWYAPNVK LAWYNYRRGY LELWYPNDGW YTAEYFLK

20 SEQ ID NO: 3: secuencia de aminoácidos de endolisina PlyP40 (344 residuos de aminoácido; origen: bacteriófago P40)

1 MVLVLDISKW QPTVNYSGLK EDVGFVVIRS SNGTQKYDER LEQHAKGLDK
 51 VGMPFGLYHY ALFEGGQDTI NEANMLVSAY KKRQLGAEP TFLFLDYEEV
 101 KLKSGNVVNE CQRFIDHVKG QTGVKVGLYA GDSFWKTHDL DKVKHDLRWV
 151 ARYGVDNGKP STKPSIPYDL WQYTSKGRIK AIASPDMNT CSSDILNKLK
 201 GSKAPVKPAP KPTPSKPAPA KPAPKTTTKY VNTAHLNIRE KASADSKVLG
 251 VLDLNDSVQV ISESGGWSKL KSGNKQVYVS SKYLSKSKTT PKAKPSSKQY
 301 YTIKSGDNLS YIAKKYKTTV KQIQNWNGIK DANKIYAGQK IRVK

SEQ ID NO: 4: secuencia de aminoácidos de endolisina PlyP35 (291 residuos de aminoácido; origen: bacteriófago P35)

ES 2 577 830 T3

1 MARKFTKAEL VAKAEKKVGG LKPDVKKAVL SAVKEAYDRY GIGIIVSQGY
 51 RSIAEQNGLY AQGRTKPGNI VTNAKGGQSN HNFGVAVDFA IDLIDDGKID
 101 SWQPSATIVN MMKRRGFKWG GDWKSFTDLP HFEACDWYRG ERKYKVDTS
 151 WKKKENINIV IKDVG YFQDK PQFLNSKSVR QWKHG TKVKL TKHNSHWYTG
 201 VVKDGNKSVR GYIYHSMKV TSKNSDGSVN ATINAHAF CW DNKKLNGGDF
 251 INLKRGF KGI THPASDGFYP LYFASR KTF YIPRYMFDIK K

SEQ ID NO: 5: secuencia de aminoácidos de endolisina PlyB054 (321 residuos de aminoácido; origen: bacteriófago B054)

1 MAKKLKLA IY AGHGGVDSGA TGE GYREDDL TLDIAKRTTK VLRGAGHTVI
 51 NNRTTDVNRN ISADAKLANR EKVDVIEFH FDAAGASAEG TTGFYCEGSS
 101 SSKLAQCVN DKLDDVFKDR NVKPD TSTRH GRLGILRETN AVATLQEVAF
 151 ITNKNDMIKY NQRADEIAKK AAEGILSYFN EKLPEQNP NR HDGAVVDSIP
 201 ALPKPDFKT V PSKMYKAGSE LLVYDHNKYW YKTYINDKLC YIYKSF CISN
 251 GKKDSKGRIP IKIKSVKDLR IPVWDNTKLS SGKIKWYAPN TKLSWYNNKK
 301 GYLELYYPNQ GWYYTANYFL K

5 SEQ ID NO: 6: secuencia de aminoácidos de endolisina PlyPSA (314 residuos de aminoácido; origen: bacteriófago PSA)

1 MSNYSMSR GH SDKCVGAEDI LSEIKEAEKV LNAASDELKR EGHNVKTFID
 51 RTSTTQSANL NKIVNWHNAN PADVHISVHL NAGKGTGVEV WYYAGDEKGR
 101 KLAVEISAKM AKALGLPNRG AKATKDLRFL NSTKG TAVLL EVC FVDRKED
 151 ANAIHKSGMY DKL GIAIAEG LTGKTVA AKN PNRHSGAVVD SVPMLSKMDF
 201 KSSPIKMYKA GSSLLVYEHN KYWYKAYIND KLCYIYKSFC ISNGKKDAKG
 251 RIKVRIKSAK DLRIPVWNNT KLNSGKIKWY SPGTKLSWYD NKKGYLELWY
 301 EKDGWYYTAN YFLK

SEQ ID NO: 7: secuencia de aminoácidos de endolisina Ply006 (235 residuos de aminoácido; origen: bacteriófago A006)

1 MALTEAWLIE KANRKLNVSG MNKSVADKTR NVIKKMAKKG IYLCVAQGYR
 51 SSAEQNALYA QGRTKPGAVV TNAKGGQSNH NYGVAVDLCL YTS DGKNVIW
 101 ESTTSRWKT V VSAMKAEGFE WGGDWKSF KD YPHFELYDAA GGEKAPSTSA
 151 SKPATSTSSN KNVYYTENPR KVKTLVQCDL YNSVDFTEKH KTG GTPAGT
 201 VFTISGMGKT KGGTPRLKTK SGYYLTANKK FVKKI

10

SEQ ID NO: 8: secuencia de aminoácidos de endolisina PlyB025 (276 residuos de aminoácido; origen: bacteriófago B025)

1 MTMYEERSR NNIAKLAANT RAKALEWFNW CCKNGIEVLV YETIRTKEQQ
 51 AANVANGKSQ TMRSYHIVGQ AFDFVMAK GK TVDWGGYKTA KAKKVIKAK
 101 ALGFSWGGDW SGFVDCPHMQ YEYKGYGTDK FTADKLVANN KTGKQGVYAR
 151 DFLNIRTKAT WDSPVAFKVP IYYYAQILWD TKNGDWVQIE FQGKKGWYKP
 201 SFKEYWYEKD PCTSYICVAD VNFRKSSKWD SPVAQKKKKG ETVRMVKKAK
 251 NGWLEFGLTN GVIGYIPNSA KYVKKK

15 SEQ ID NO: 9: secuencia de aminoácidos de proteína de la cola lítica gp29 (795 residuos de aminoácido; origen: bacteriófago P1 00)

```

1      MTTVKRMPEF DLK FVTEKND YLIRYDARNP SSDTLAEKVI SVTTKNAMSD
51     DSAVFSIVVA GDM EWDKILD SNDVVILKIY PNLRVMMPDN VVVLVGLISE
101    VRREGDYSNN SIIYRITGQS FAKSFMQFQL GVIQEVSVVI TDIGWLPDSK
151    ADGVEFTGKT AAEIGKSITD RFKKYMKYNF NREYTMENFL DYSFSSWKDY
201    EKLADPTPFI NYEGSLKQLL DDVTAKPFNE LFFESTSDEK CKMIMRRTPF
251    NKEDWDKLPS YKISTEAVIS DSLAKGDTEA YSIFNVTSGN MAGATSVDLN
301    SFPQYHQALV DKYGYKKLEV DNRYLFESST DGSSTTEKAD VGSKEKTKTV
351    ITYSKFNSFM RSYTSDQVRM NQSSI AKSLV DSYDKLTTSQ ANQLLAKYSA
401    VGAISEADFK KIVGDIAEGD NTGTATLDFD SVNSWFSLNY SSLSEVSTNR
451    DATIKAFVKN FANTDEDQAT KIVALYISSQ GVMTKEKFDA IIKESTSSST
501    KDPDNTTGNS SSALQYFSKT IYNWYSENAN FYAGDIK VIG SPVYRLGSKL
551    LVEDKQQGDE WEFYIESVSH EYSYTAGYTT TLGVTRGLNN KGKDRFTHLW
601    GKSSDFK GGL LGEKTS AELI QEAGSTSSGS DGSGDVSAPD VQGS DVA VAA
651    LRYGLAHKKP EKKS VYSFGG GRGSSNPMEG KEPYAMDCSS FVWWCYKACG
701    VTLAGAQTQA ILGDDRFNTV SSRGSKSKEI FKKMQVGD LV YFYDNNTHIG
751    MYAGEGKFLG CNGDGSWDTN GGVQLKPMDS GYWWTQFQGH VIRFV

```

SEQ ID NO: 10: secuencia de aminoácidos de autolisina MurA de *Listeria monocytogenes* (590 residuos de aminoácido; origen: *Listeria monocytogenes* EGDe (J. Krefl), serotipo 1/2a)

```

1      MQKTRKERIL EALQEEKKNK KSKKFKTGAT IAGVTAIATS ITVPGIEVIV
51     SADETAPADE ASKSAEANTT KEASATATPE NTAKQTVGPQ QTETKEQTKT
101    PEEKQAATNQ VEKAPAEPAT VSNPDNATSS STPATYNLLQ KSALRSGATV
151    QSFIQTIQAS SSQIAAENDL YASVMIAQAI LESAYGTSEL GSAPNYNLFQ
201    IKGAYNGQSY TKQTL EDDGK GNYYTITAKF RKYPSYHQSL EDYAQVIRKG
251    PSWNP NYYSK AWKSNTTSYK DATKALTGTY ATDTAYATKL ND LISRYNLT
301    QYDSGKTTGG NSGSTGNSSN TGNTNTSNAK IYTVVKGDSL WRIANNHKVT
351    VANLKAWNNL KSDFIYPGQK LKVSAGSTTS DTNTSKPSTG TSTSKPSTGT
401    STNAKVYTVV KGDSLWRIAN NNKVTIANLK AWNNLKSDFI YPGQKLK VSA
451    GSTSNTNTSK PSTNTNTSKP STNTNTNAKV YTVAKGDSLW RIANNKVTI
501    ANLKAWNNLK SDFIYPGQKL KVSAGSTTNT NTAKPSTNNP SNSTVKTYTV
551    KKGDSLW AIS RQYKTTVDNI KAWNKLTSNM IHVGQKLTIK

```

5 SEQ ID NO: 11: secuencia de aminoácidos de autolisina IspC de *Listeria monocytogenes* (774 residuos de aminoácido; origen: *Listeria monocytogenes* LI 0521, serotipo4b)

```

1      MINKKWMKIV MIPMLVVPY GLTTVGGQLQ DSLTGENSEFV KEVEAATTAS
51     QQAFIDKIAP AAQASQEKYH LLSSITLAQA ILESGWGKSG LATQGYNLFG
101    IKGKYNGQSV IMTTSEYVNG EWIKIDAEFR KYPWSNESVT DHTLLLVTNGT
151    SWNKDLYKKV VDATDYKVTA MEPQKAGYAT SPTYGASLIQ VIENYDLAKY
201    DVLYDKILTQ KSTSGKATVT SPTGNGVWTL PYKVKGVQSV SPASTYANKD
251    IDLVSVATTK RGTYYQFKYN GKVVGVVDGK ALTIYDSVNY DKVNVGRAKI
301    TSPVSNGIWS KPYNVYGREF VTNATTYAQQ EIKLLREAQT AKGTTYQFSI
351    NNKTIGWIDK RALTIYPYDS IISSKNVNLG GQITNPTGNG IWTKAYKLEG
401    TTSVAQATKY ANKDVKISQQ IETQHGTYYN ISIDGKAIGW LDRNAITLYD
451    QEYNTKVAI DAVVKNVKN AVWTEPYRTV GTKLIGPAET YLNKEVEVVR
501    EAKTPKGTYY QFKSGGKVIG WLDKKAFDVY DNINYNKAVN LDAVVENVTG
551    NAVWTAPYKS KGVKLVTSAA TYKGKATKIT REAQTSRGTY YEFSVDGKVI
601    GWLDDKAFDV YDNINYNKAV NLDVAVVENVT GNAVWTAPYK SKGVKLV TSA
651    ATYKDKATKI TREAQTSRGT YYEFSVNGKV IGWLDKKAFD VYDSIEYNKA
701    INMTGLLSNA PGNGIWTEPY RVIGTKNVGQ ATAYANKTVQ LIREAKTTRA
751    TYYQMSVNGK IVGWVDKRAF TNVK

```

SEQ ID NO: 12: secuencia de aminoácidos de bacteriocina de *Streptomyces coelicolor* Müller (294 residuos de aminoácido; origen: *Streptomyces coelicolor* Müller)

```

1      MPAYSSLARR GRRPAVVLLG GLVSASLALT LAPATAAAPL APPPGKDVGP
51     GEAYMGVGR IEQGLGAGPD ERTIGPADTS GVQGIDVSHW QGSINWSSVK
101    SAGMSFAYIK ATEGTNYKDD RFSANYTNAY NAGIIRGAYH FARPNASSGT
151    AQADYFASNG GGWSRDNR TL PGVLDIEHNP SGAMCYGLST TQMRWINDF
201    HARYKARTTR DVVIYTTASW WNTCTGSWNG MAAKSPFWVA HWGVSAPTVP
251    SGFPTWTFWQ YSATGRVGGV SGDVDNRNKFN GSAARLLALA NNTA

```

5 SEQ ID NO: 13: secuencia de aminoácidos de autolisina de *Staphylococcus aureus* USA300 (334 residuos de aminoácido; origen: *Staphylococcus aureus* USA300)

```

1      MQKKVIAAII GTSAISAVAA TQANAATHT VKPGESVWAI SNKYGISIAK
51     LKSLNNLTSN LIFPNQVLKV SGSSNSTSNS SRPSTNSGGG SYTQVQAGDS
101    LSLIASKYGT TYQNMRLNG LNNFFIYPGQ KLKVSQTASS SNAASNSSRP
151    STNSGGGSYY TVQAGDSL SL IASKYGTTYQ KIMSLNGLNN FFIYPGQKLG
201    VTGNASTNSG SATTTNRGYN TPVFSHQONLY TWGQCTYHVF NRRAEIGKGI
251    STYWWNANNW DNAAAADGYT IDNRPTVGS I AQTDVGYGH VMFVERVND
301    GSILVSEMNY SAAPGILTYR TVPAYQVNNY RYIH

```

SEQ ID NO: 14: secuencia artificial (secuencia de aminoácidos diseñada para actuar como ligador)

GGSKPGGTPGGSKP

10 SEQ ID NO: 15: secuencia artificial (secuencia de nucleótidos diseñada para actuar como cebador)

CACACACCATGGCG

SEQ ID NO: 16: secuencia artificial (secuencia de nucleótidos diseñada para actuar como cebador)

TGTGTGACTAGT

SEQ ID NO: 17: secuencia artificial (secuencia de nucleótidos diseñada para actuar como cebador)

TGTGTGGGATCC

SEQ ID NO: 18: secuencia artificial (secuencia de nucleótidos diseñada para actuar como cebador)

GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAACCATGGCG

SEQ ID NO: 19: secuencia artificial (secuencia de nucleótidos diseñada para actuar como cebador)

CCTTTCGGGCTTTGTTACTGCAGGGATCC

5

SEQ ID NO: 20: secuencia artificial (secuencia de nucleótidos diseñada para actuar como cebador)

GTTTAACTTTAAGAAGGAGACTGCAGATGGCG

SEQ ID NO: 21: secuencia artificial (secuencia de nucleótidos diseñada para actuar como cebador)

CCTTTCGGGCTTTGTTAGTCGACGGATCC

10

SEQ ID NO: 22: secuencia artificial (secuencia de nucleótidos diseñada para actuar como cebador)

GTTTAACTTTAAGAAGGAGAGTCGACATGGCG

SEQ ID NO: 23: secuencia artificial (secuencia de nucleótidos diseñada para actuar como cebador)

CCTTTCGGGCTTTGTTAGATATCGGATCC

Lista de secuencias

- 5 <110> Hyglos Invest GmbH
<120> Métodos de generación y examen para polipéptidos quiméricos lífticos
<130> PCT68898FZ210pau
- 10 <140> sin asignar aún
<141> con el presente documento
<150> 10 006 360.1
<151> 18-06-2010
- 15 <160> 23
<170> PatentIn versión 3.3
- 20 <210> 1
<211> 341
<212> PRT
<213> Bacteriófago A511
- 25 <400> 1

ES 2 577 830 T3

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

ES 2 577 830 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Val Ile Lys Lys
340

<210> 2
<211> 289
<212> PRT
<213> Bacteriófago A500

<400> 2

Met Ala Leu Thr Glu Ala Trp Leu Ile Glu Lys Ala Asn Arg Lys Leu
1 5 10 15

Asn Ala Gly Gly Met Tyr Lys Ile Thr Ser Asp Lys Thr Arg Asn Val
20 25 30

Ile Lys Lys Met Ala Lys Glu Gly Ile Tyr Leu Cys Val Ala Gln Gly
35 40 45

Tyr Arg Ser Thr Ala Glu Gln Asn Ala Leu Tyr Ala Gln Gly Arg Thr
50 55 60

5

10

ES 2 577 830 T3

Lys Pro Gly Ala Ile Val Thr Asn Ala Lys Gly Gly Gln Ser Asn His
65 70 75 80

Asn Tyr Gly Val Ala Val Asp Leu Cys Leu Tyr Thr Asn Asp Gly Lys
85 90 95

Asp Val Ile Trp Glu Ser Thr Thr Ser Arg Trp Lys Lys Val Val Ala
100 105 110

Ala Met Lys Ala Glu Gly Phe Lys Trp Gly Gly Asp Trp Lys Ser Phe
115 120 125

Lys Asp Tyr Pro His Phe Glu Leu Cys Asp Ala Val Ser Gly Glu Lys
130 135 140

Ile Pro Ala Ala Thr Gln Asn Thr Asn Thr Asn Ser Asn Arg Tyr Glu
145 150 155 160

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

Ser Ser Pro Phe Arg Met Tyr Lys Val Gly Thr Glu Phe Leu Val Tyr
180 185 190

Asp His Asn Gln Tyr Trp Tyr Lys Thr Tyr Ile Asp Asp Lys Leu Tyr
195 200 205

Tyr Met Tyr Lys Ser Phe Cys Asp Val Val Ala Lys Lys Asp Ala Lys
210 215 220

Gly Arg Ile Lys Val Arg Ile Lys Ser Ala Lys Asp Leu Arg Ile Pro
225 230 235 240

Val Trp Asn Asn Ile Lys Leu Asn Ser Gly Lys Ile Lys Trp Tyr Ala
245 250 255

Pro Asn Val Lys Leu Ala Trp Tyr Asn Tyr Arg Arg Gly Tyr Leu Glu
260 265 270

Leu Trp Tyr Pro Asn Asp Gly Trp Tyr Tyr Thr Ala Glu Tyr Phe Leu
275 280 285

Lys

<210> 3

<211> 344

5 <212> PRT

<213> Bacteriófago P40

<400> 3

10 Met Val Leu Val Leu Asp Ile Ser Lys Trp Gln Pro Thr Val Asn Tyr

ES 2 577 830 T3

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

ES 2 577 830 T3

275

280

285

Thr Thr Pro Lys Ala Lys Pro Ser Ser Lys Gln Tyr Tyr Thr Ile Lys
 290 295 300

Ser Gly Asp Asn Leu Ser Tyr Ile Ala Lys Lys Tyr Lys Thr Thr Val
 305 310 315 320

Lys Gln Ile Gln Asn Trp Asn Gly Ile Lys Asp Ala Asn Lys Ile Tyr
 325 330 335

Ala Gly Gln Lys Ile Arg Val Lys
 340

<210> 4

<211> 291

5 <212> PRT

<213> Bacteriófago P35

<400> 4

Met Ala Arg Lys Phe Thr Lys Ala Glu Leu Val Ala Lys Ala Glu Lys
 1 5 10 15

Lys Val Gly Gly Leu Lys Pro Asp Val Lys Lys Ala Val Leu Ser Ala
 20 25 30

Val Lys Glu Ala Tyr Asp Arg Tyr Gly Ile Gly Ile Ile Val Ser Gln
 35 40 45

Gly Tyr Arg Ser Ile Ala Glu Gln Asn Gly Leu Tyr Ala Gln Gly Arg
 50 55 60

Thr Lys Pro Gly Asn Ile Val Thr Asn Ala Lys Gly Gly Gln Ser Asn
 65 70 75 80

His Asn Phe Gly Val Ala Val Asp Phe Ala Ile Asp Leu Ile Asp Asp
 85 90 95

Gly Lys Ile Asp Ser Trp Gln Pro Ser Ala Thr Ile Val Asn Met Met
 100 105 110

Lys Arg Arg Gly Phe Lys Trp Gly Gly Asp Trp Lys Ser Phe Thr Asp
 115 120 125

Leu Pro His Phe Glu Ala Cys Asp Trp Tyr Arg Gly Glu Arg Lys Tyr
 130 135 140

Lys Val Asp Thr Ser Glu Trp Lys Lys Lys Glu Asn Ile Asn Ile Val
 145 150 155 160

Ile Lys Asp Val Gly Tyr Phe Gln Asp Lys Pro Gln Phe Leu Asn Ser
 165 170 175

10

ES 2 577 830 T3

Lys Ser Val Arg Gln Trp Lys His Gly Thr Lys Val Lys Leu Thr Lys
180 185 190

His Asn Ser His Trp Tyr Thr Gly Val Val Lys Asp Gly Asn Lys Ser
195 200 205

Val Arg Gly Tyr Ile Tyr His Ser Met Ala Lys Val Thr Ser Lys Asn
210 215 220

Ser Asp Gly Ser Val Asn Ala Thr Ile Asn Ala His Ala Phe Cys Trp
225 230 235 240

Asp Asn Lys Lys Leu Asn Gly Gly Asp Phe Ile Asn Leu Lys Arg Gly
245 250 255

Phe Lys Gly Ile Thr His Pro Ala Ser Asp Gly Phe Tyr Pro Leu Tyr
260 265 270

Phe Ala Ser Arg Lys Lys Thr Phe Tyr Ile Pro Arg Tyr Met Phe Asp
275 280 285

Ile Lys Lys
290

<210> 5
<211> 321
<212> PRT
<213> Bacteriófago B054

5

<400> 5

Met Ala Lys Lys Leu Lys Leu Ala Ile Tyr Ala Gly His Gly Gly Val
1 5 10 15

Asp Ser Gly Ala Thr Gly Glu Gly Tyr Arg Glu Asp Asp Leu Thr Leu
20 25 30

Asp Ile Ala Lys Arg Thr Thr Lys Val Leu Arg Gly Ala Gly His Thr
35 40 45

Val Ile Asn Asn Arg Thr Thr Asp Val Asn Arg Asn Ile Ser Ala Asp
50 55 60

Ala Lys Leu Ala Asn Arg Glu Lys Val Asp Ala Val Ile Glu Phe His
65 70 75 80

Phe Asp Ala Ala Gly Ala Ser Ala Glu Gly Thr Thr Gly Phe Tyr Cys
85 90 95

Glu Gly Ser Ser Ser Ser Lys Lys Leu Ala Gln Cys Val Asn Asp Lys
100 105 110

10

ES 2 577 830 T3

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

Arg His Gly Arg Leu Gly Ile Leu Arg Glu Thr Asn Ala Val Ala Thr
 130 135 140

Leu Gln Glu Val Ala Phe Ile Thr Asn Lys Asn Asp Met Ile Lys Tyr
 145 150 155 160

Asn Gln Arg Ala Asp Glu Ile Ala Lys Lys Ala Ala Glu Gly Ile Leu
 165 170 175

Ser Tyr Phe Asn Glu Lys Leu Pro Glu Gln Asn Pro Asn Arg His Asp
 180 185 190

Gly Ala Val Val Asp Ser Ile Pro Ala Leu Pro Lys Pro Asp Phe Lys
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Lys Met Tyr Lys Ala Gly Ser Glu Leu Leu Val Tyr
 210 215 220

Asp His Asn Lys Tyr Trp Tyr Lys Thr Tyr Ile Asn Asp Lys Leu Cys
 225 230 235 240

Tyr Ile Tyr Lys Ser Phe Cys Ile Ser Asn Gly Lys Lys Asp Ser Lys
 245 250 255

Gly Arg Ile Pro Ile Lys Ile Lys Ser Val Lys Asp Leu Arg Ile Pro
 260 265 270

Val Trp Asp Asn Thr Lys Leu Ser Ser Gly Lys Ile Lys Trp Tyr Ala
 275 280 285

Pro Asn Thr Lys Leu Ser Trp Tyr Asn Asn Lys Lys Gly Tyr Leu Glu
 290 295 300

Leu Tyr Tyr Pro Asn Gln Gly Trp Tyr Tyr Thr Ala Asn Tyr Phe Leu
 305 310 315 320

Lys

<210> 6

<211> 314

5 <212> PRT

<213> Bacteriófago PSA

<400> 6

10 Met Ser Asn Tyr Ser Met Ser Arg Gly His Ser Asp Lys Cys Val Gly
 1 5 10 15

ES 2 577 830 T3

Ala Glu Asp Ile Leu Ser Glu Ile Lys Glu Ala Glu Lys Val Leu Asn
20 25 30

Ala Ala Ser Asp Glu Leu Lys Arg Glu Gly His Asn Val Lys Thr Phe
35 40 45

Ile Asp Arg Thr Ser Thr Thr Gln Ser Ala Asn Leu Asn Lys Ile Val
50 55 60

Asn Trp His Asn Ala Asn Pro Ala Asp Val His Ile Ser Val His Leu
65 70 75 80

Asn Ala Gly Lys Gly Thr Gly Val Glu Val Trp Tyr Tyr Ala Gly Asp
85 90 95

Glu Lys Gly Arg Lys Leu Ala Val Glu Ile Ser Ala Lys Met Ala Lys
100 105 110

Ala Leu Gly Leu Pro Asn Arg Gly Ala Lys Ala Thr Lys Asp Leu Arg
115 120 125

Phe Leu Asn Ser Thr Lys Gly Thr Ala Val Leu Leu Glu Val Cys Phe
130 135 140

Val Asp Arg Lys Glu Asp Ala Asn Ala Ile His Lys Ser Gly Met Tyr
145 150 155 160 165

Asp Lys Leu Gly Ile Ala Ile Ala Glu Gly Leu Thr Gly Lys Thr Val
165 170 175

Ala Ala Lys Asn Pro Asn Arg His Ser Gly Ala Val Val Asp Ser Val
180 185 190

Pro Met Leu Ser Lys Met Asp Phe Lys Ser Ser Pro Ile Lys Met Tyr
195 200 205

Lys Ala Gly Ser Ser Leu Leu Val Tyr Glu His Asn Lys Tyr Trp Tyr
210 215 220

Lys Ala Tyr Ile Asn Asp Lys Leu Cys Tyr Ile Tyr Lys Ser Phe Cys
225 230 235 240

Ile Ser Asn Gly Lys Lys Asp Ala Lys Gly Arg Ile Lys Val Arg Ile
245 250 255

Lys Ser Ala Lys Asp Leu Arg Ile Pro Val Trp Asn Asn Thr Lys Leu
260 265 270

Asn Ser Gly Lys Ile Lys Trp Tyr Ser Pro Gly Thr Lys Leu Ser Trp
275 280 285

ES 2 577 830 T3

Tyr Asp Asn Lys Lys Gly Tyr Leu Glu Leu Trp Tyr Glu Lys Asp Gly
 290 295 300

Trp Tyr Tyr Thr Ala Asn Tyr Phe Leu Lys
 305 310

<210> 7
 <211> 235
 5 <212> PRT
 <213> Bacteriófago A006

<400> 7

Met Ala Leu Thr Glu Ala Trp Leu Ile Glu Lys Ala Asn Arg Lys Leu
 1 5 10 15

Asn Val Ser Gly Met Asn Lys Ser Val Ala Asp Lys Thr Arg Asn Val
 20 25 30

Ile Lys Lys Met Ala Lys Lys Gly Ile Tyr Leu Cys Val Ala Gln Gly
 35 40 45

Tyr Arg Ser Ser Ala Glu Gln Asn Ala Leu Tyr Ala Gln Gly Arg Thr
 50 55 60

Lys Pro Gly Ala Val Val Thr Asn Ala Lys Gly Gly Gln Ser Asn His
 65 70 75 80

Asn Tyr Gly Val Ala Val Asp Leu Cys Leu Tyr Thr Ser Asp Gly Lys
 85 90 95

Asn Val Ile Trp Glu Ser Thr Thr Ser Arg Trp Lys Thr Val Val Ser
 100 105 110

Ala Met Lys Ala Glu Gly Phe Glu Trp Gly Gly Asp Trp Lys Ser Phe
 115 120 125

Lys Asp Tyr Pro His Phe Glu Leu Tyr Asp Ala Ala Gly Gly Glu Lys
 130 135 140

Ala Pro Ser Thr Ser Ala Ser Lys Pro Ala Thr Ser Thr Ser Ser Asn
 145 150 155 160

Lys Asn Val Tyr Tyr Thr Glu Asn Pro Arg Lys Val Lys Thr Leu Val
 165 170 175

Gln Cys Asp Leu Tyr Asn Ser Val Asp Phe Thr Glu Lys His Lys Thr
 180 185 190

Gly Gly Thr Tyr Pro Ala Gly Thr Val Phe Thr Ile Ser Gly Met Gly
 195 200 205

10 Lys Thr Lys Gly Gly Thr Pro Arg Leu Lys Thr Lys Ser Gly Tyr Tyr

ES 2 577 830 T3

210

215

220

Leu Thr Ala Asn Lys Lys Phe Val Lys Lys Ile
225 230 235

<210> 8

<211> 276

5 <212> PRT

<213> Bacteriófago B025

<400> 8

Met Thr Met Tyr Tyr Glu Glu Arg Ser Arg Asn Asn Ile Ala Lys Leu
1 5 10 15

Ala Ala Asn Thr Arg Ala Lys Ala Leu Glu Trp Phe Asn Trp Cys Cys
20 25 30

Lys Asn Gly Ile Glu Val Leu Val Tyr Glu Thr Ile Arg Thr Lys Glu
35 40 45

Gln Gln Ala Ala Asn Val Ala Asn Gly Lys Ser Gln Thr Met Arg Ser
50 55 60

Tyr His Ile Val Gly Gln Ala Phe Asp Phe Val Met Ala Lys Gly Lys
65 70 75 80

Thr Val Asp Trp Gly Gly Tyr Lys Thr Ala Lys Ala Lys Lys Val Ile
85 90 95

Ala Lys Ala Lys Ala Leu Gly Phe Ser Trp Gly Gly Asp Trp Ser Gly
100 105 110

Phe Val Asp Cys Pro His Met Gln Tyr Glu Tyr Lys Gly Tyr Gly Thr
115 120 125

Asp Lys Phe Thr Ala Asp Lys Leu Val Ala Asn Asn Lys Thr Gly Lys
130 135 140

Gln Gly Val Tyr Ala Arg Asp Phe Leu Asn Ile Arg Thr Lys Ala Thr
145 150 155 160

Trp Asp Ser Pro Val Ala Phe Lys Val Pro Ile Tyr Tyr Tyr Ala Gln
165 170 175

Ile Leu Trp Asp Thr Lys Asn Gly Asp Trp Val Gln Ile Glu Phe Gln
180 185 190

Gly Lys Lys Gly Trp Tyr Lys Pro Ser Phe Lys Glu Tyr Trp Tyr Glu
195 200 205

Lys Asp Pro Cys Thr Ser Tyr Ile Cys Val Ala Asp Val Asn Phe Arg
210 215 220

10

ES 2 577 830 T3

Lys Ser Ser Lys Trp Asp Ser Pro Val Ala Gln Lys Lys Lys Lys Gly
225 230 235 240

Glu Thr Val Arg Met Val Lys Lys Ala Lys Asn Gly Trp Leu Glu Phe
245 250 255

Gly Leu Thr Asn Gly Val Ile Gly Tyr Ile Pro Asn Ser Ala Lys Tyr
260 265 270

Val Lys Lys Lys
275

<210> 9

<211> 795

5 <212> PRT

<213> Bacteriófago P100

<400> 9

Met Thr Thr Val Lys Arg Met Pro Glu Phe Asp Leu Lys Phe Val Thr
1 5 10 15

Glu Lys Asn Asp Tyr Leu Ile Arg Tyr Asp Ala Arg Asn Pro Ser Ser
20 25 30

Asp Thr Leu Ala Glu Lys Val Ile Ser Val Thr Thr Lys Asn Ala Met
35 40 45

Ser Asp Asp Ser Ala Val Phe Ser Ile Val Val Ala Gly Asp Met Glu
50 55 60

Trp Asp Lys Ile Leu Asp Ser Asn Asp Val Val Ile Leu Lys Ile Tyr
65 70 75 80

Pro Asn Leu Arg Val Met Met Pro Asp Asn Val Val Val Leu Val Gly
85 90 95

Leu Ile Ser Glu Val Arg Arg Glu Gly Asp Tyr Ser Asn Asn Ser Ile
100 105 110

Ile Tyr Arg Ile Thr Gly Gln Ser Phe Ala Lys Ser Phe Met Gln Phe
115 120 125

Gln Leu Gly Val Ile Gln Glu Val Ser Val Val Ile Thr Asp Ile Gly
130 135 140

Trp Leu Pro Asp Ser Lys Ala Asp Gly Val Glu Phe Thr Gly Lys Thr
145 150 155 160

Ala Ala Glu Ile Gly Lys Ser Ile Thr Asp Arg Phe Lys Lys Tyr Met
165 170 175

10

ES 2 577 830 T3

Lys Tyr Asn Phe 180 Asn Arg Glu Tyr Thr 185 Met Glu Asn Phe 190 Leu Asp Tyr
 Ser Phe Ser 195 Ser Trp Lys Asp Tyr 200 Glu Lys Leu Ala Asp 205 Pro Thr Pro
 Phe Ile 210 Asn Tyr Glu Gly Ser 215 Leu Lys Gln Leu Leu 220 Asp Asp Val Thr
 Ala Lys Pro Phe Asn Glu 230 Leu Phe Phe Glu Ser 235 Thr Ser Asp Glu Lys 240
 Cys Lys Met Ile Met 245 Arg Arg Thr Pro Phe 250 Asn Lys Glu Asp Trp 255 Asp
 Lys Leu Pro Ser 260 Tyr Lys Ile Ser Thr 265 Glu Ala Val Ile Ser 270 Asp Ser
 Leu Ala Lys 275 Gly Asp Thr Glu Ala Tyr Ser Ile Phe Asn 285 Val Thr Ser
 Gly Asn Met Ala Gly Ala Thr 295 Ser Val Asp Leu Asn 300 Ser Phe Pro Gln
 Tyr His Gln Ala Leu Val 310 Asp Lys Tyr Gly Tyr 315 Lys Lys Leu Glu Val 320
 Asp Asn Arg Tyr Leu Phe Glu Ser Ser Thr 330 Asp Gly Ser Ser Thr 335 Thr
 Glu Lys Ala Asp 340 Val Gly Ser Lys Glu 345 Lys Thr Lys Thr Val 350 Ile Thr
 Tyr Ser Lys 355 Phe Asn Ser Phe Met 360 Arg Ser Tyr Thr Ser 365 Asp Gln Val
 Arg Met Asn Gln Ser Ser Ile 375 Ala Lys Ser Leu Val 380 Asp Ser Tyr Asp
 Lys Leu Thr Thr Ser Gln Ala Asn Gln Leu Leu 395 Ala Lys Tyr Ser Ala 400
 Val Gly Ala Ile Ser 405 Glu Ala Asp Phe Lys 410 Lys Ile Val Gly Asp 415 Ile
 Ala Glu Gly Asp 420 Asn Thr Gly Thr Ala 425 Thr Leu Asp Phe Asp 430 Ser Val
 Asn Ser Trp 435 Phe Ser Leu Asn Tyr 440 Ser Ser Leu Ser Glu 445 Val Ser Thr

ES 2 577 830 T3

Asn Arg Asp Ala Thr Ile Lys Ala Phe Val Lys Asn Phe Ala Asn Thr
 450 455 460
 Asp Glu Asp Gln Ala Thr Lys Ile Val Ala Leu Tyr Ile Ser Ser Gln
 465 470 475 480
 Gly Val Met Thr Lys Glu Lys Phe Asp Ala Ile Ile Lys Glu Ser Thr
 485 490 495
 Ser Ser Ser Thr Lys Asp Pro Asp Asn Thr Thr Gly Asn Ser Ser Ser
 500 505 510
 Ala Leu Gln Tyr Phe Ser Lys Thr Ile Tyr Asn Trp Tyr Ser Glu Asn
 515 520 525
 Ala Asn Phe Tyr Ala Gly Asp Ile Lys Val Ile Gly Ser Pro Val Tyr
 530 535 540
 Arg Leu Gly Ser Lys Leu Leu Val Glu Asp Lys Gln Gln Gly Asp Glu
 545 550 555 560
 Trp Glu Phe Tyr Ile Glu Ser Val Ser His Glu Tyr Ser Tyr Thr Ala
 565 570 575
 Gly Tyr Thr Thr Thr Leu Gly Val Thr Arg Gly Leu Asn Asn Lys Gly
 580 585 590
 Lys Asp Arg Phe Thr His Leu Trp Gly Lys Ser Ser Asp Phe Lys Gly
 595 600 605
 Gly Leu Leu Gly Glu Lys Thr Ser Ala Glu Leu Ile Gln Glu Ala Gly
 610 615 620
 Ser Thr Ser Ser Gly Ser Asp Gly Ser Gly Asp Val Ser Ala Pro Asp
 625 630 635 640
 Val Gln Gly Ser Asp Val Ala Val Ala Ala Leu Arg Tyr Gly Leu Ala
 645 650 655
 His Lys Lys Pro Glu Lys Lys Ser Val Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Arg
 660 665 670
 Gly Ser Ser Asn Pro Met Glu Gly Lys Glu Pro Tyr Ala Met Asp Cys
 675 680 685
 Ser Ser Phe Val Trp Trp Cys Tyr Lys Ala Cys Gly Val Thr Leu Ala
 690 695 700
 Gly Ala Gln Thr Gln Ala Ile Leu Gly Asp Asp Arg Phe Asn Thr Val
 705 710 715 720

ES 2 577 830 T3

Ser Ser Arg Gly Ser Lys Ser Lys Glu Ile Phe Lys Lys Met Gln Val
725 730 735

Gly Asp Leu Val Tyr Phe Tyr Asp Asn Asn Thr His Ile Gly Met Tyr
740 745 750

Ala Gly Glu Gly Lys Phe Leu Gly Cys Asn Gly Asp Gly Ser Trp Asp
755 760 765

Thr Asn Gly Gly Val Gln Leu Lys Pro Met Asp Ser Gly Tyr Trp Trp
770 775 780

Thr Gln Phe Gln Gly His Val Ile Arg Phe Val
785 790 795

<210> 10

<211> 590

5 <212> PRT

<213> *Listeria monocytogenes*

<400> 10

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

Lys Lys Asn Lys Lys Ser Lys Lys Phe Lys Thr Gly Ala Thr Ile Ala
20 25 30

Gly Val Thr Ala Ile Ala Thr Ser Ile Thr Val Pro Gly Ile Glu Val
35 40 45

Ile Val Ser Ala Asp Glu Thr Ala Pro Ala Asp Glu Ala Ser Lys Ser
50 55 60

Ala Glu Ala Asn Thr Thr Lys Glu Ala Ser Ala Thr Ala Thr Pro Glu
65 70 75 80

Asn Thr Ala Lys Gln Thr Val Gly Pro Gln Gln Thr Glu Thr Lys Glu
85 90 95

Gln Thr Lys Thr Pro Glu Glu Lys Gln Ala Ala Thr Asn Gln Val Glu
100 105 110

Lys Ala Pro Ala Glu Pro Ala Thr Val Ser Asn Pro Asp Asn Ala Thr
115 120 125

Ser Ser Ser Thr Pro Ala Thr Tyr Asn Leu Leu Gln Lys Ser Ala Leu
130 135 140

10 Arg Ser Gly Ala Thr Val Gln Ser Phe Ile Gln Thr Ile Gln Ala Ser
145 150 155 160

ES 2 577 830 T3

Ser Ser Gln Ile Ala Ala Glu Asn Asp Leu Tyr Ala Ser Val Met Ile
165 170 175

Ala Gln Ala Ile Leu Glu Ser Ala Tyr Gly Thr Ser Glu Leu Gly Ser
180 185 190

Ala Pro Asn Tyr Asn Leu Phe Gly Ile Lys Gly Ala Tyr Asn Gly Gln
195 200 205

Ser Tyr Thr Lys Gln Thr Leu Glu Asp Asp Gly Lys Gly Asn Tyr Tyr
210 215 220

Thr Ile Thr Ala Lys Phe Arg Lys Tyr Pro Ser Tyr His Gln Ser Leu
225 230 235 240

Glu Asp Tyr Ala Gln Val Ile Arg Lys Gly Pro Ser Trp Asn Pro Asn
245 250 255

Tyr Tyr Ser Lys Ala Trp Lys Ser Asn Thr Thr Ser Tyr Lys Asp Ala
260 265 270

Thr Lys Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Thr Asp Thr Ala Tyr Ala Thr
275 280 285

Lys Leu Asn Asp Leu Ile Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Gln Tyr Asp Ser
290 295 300

Gly Lys Thr Thr Gly Gly Asn Ser Gly Ser Thr Gly Asn Ser Ser Asn
305 310 315 320

Thr Gly Asn Thr Asn Thr Ser Asn Ala Lys Ile Tyr Thr Val Val Lys
325 330 335

Gly Asp Ser Leu Trp Arg Ile Ala Asn Asn His Lys Val Thr Val Ala
340 345 350

Asn Leu Lys Ala Trp Asn Asn Leu Lys Ser Asp Phe Ile Tyr Pro Gly
355 360 365

Gln Lys Leu Lys Val Ser Ala Gly Ser Thr Thr Ser Asp Thr Asn Thr
370 375 380

Ser Lys Pro Ser Thr Gly Thr Ser Thr Ser Lys Pro Ser Thr Gly Thr
385 390 395 400

Ser Thr Asn Ala Lys Val Tyr Thr Val Val Lys Gly Asp Ser Leu Trp
405 410 415

Arg Ile Ala Asn Asn Asn Lys Val Thr Ile Ala Asn Leu Lys Ala Trp
420 425 430

ES 2 577 830 T3

Asn Asn Leu Lys Ser Asp Phe Ile Tyr Pro Gly Gln Lys Leu Lys Val
 435 440 445

Ser Ala Gly Ser Thr Ser Asn Thr Asn Thr Ser Lys Pro Ser Thr Asn
 450 455 460

Thr Asn Thr Ser Lys Pro Ser Thr Asn Thr Asn Thr Asn Ala Lys Val
 465 470 475 480

Tyr Thr Val Ala Lys Gly Asp Ser Leu Trp Arg Ile Ala Asn Asn Asn
 485 490 495

Lys Val Thr Ile Ala Asn Leu Lys Ala Trp Asn Asn Leu Lys Ser Asp
 500 505 510

Phe Ile Tyr Pro Gly Gln Lys Leu Lys Val Ser Ala Gly Ser Thr Thr
 515 520 525

Asn Thr Asn Thr Ala Lys Pro Ser Thr Asn Asn Pro Ser Asn Ser Thr
 530 535 540

Val Lys Thr Tyr Thr Val Lys Lys Gly Asp Ser Leu Trp Ala Ile Ser
 545 550 555 560

Arg Gln Tyr Lys Thr Thr Val Asp Asn Ile Lys Ala Trp Asn Lys Leu
 565 570 575

Thr Ser Asn Met Ile His Val Gly Gln Lys Leu Thr Ile Lys
 580 585 590

<210> 11
 <211> 774
 <212> PRT
 <213> *Listeria monocytogenes*

5

<400> 11

Met Ile Asn Lys Lys Trp Met Lys Ile Val Met Ile Pro Met Leu Val
 1 5 10 15

Val Pro Met Tyr Gly Leu Thr Thr Val Gly Gly Gln Leu Gln Asp Ser
 20 25 30

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

Ala Ser Gln Gln Ala Phe Ile Asp Lys Ile Ala Pro Ala Ala Gln Ala
 50 55 60

Ser Gln Glu Lys Tyr His Leu Leu Ser Ser Ile Thr Leu Ala Gln Ala
 65 70 75 80

10

Ile Leu Glu Ser Gly Trp Gly Lys Ser Gly Leu Ala Thr Gln Gly Tyr

ES 2 577 830 T3

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

ES 2 577 830 T3

355 360 365
 Asp Ser Ile Ile Ser Ser Lys Asn Val Asn Leu Asp Gly Gln Ile Thr
 370 375 380
 Asn Pro Thr Gly Asn Gly Ile Trp Thr Lys Ala Tyr Lys Leu Glu Gly
 385 390 395
 Thr Thr Ser Val Ala Gln Ala Thr Lys Tyr Ala Asn Lys Asp Val Lys
 405 410 415
 Ile Ser Gln Gln Ile Glu Thr Gln His Gly Thr Tyr Tyr Asn Ile Ser
 420 425 430
 Ile Asp Gly Lys Ala Ile Gly Trp Leu Asp Arg Asn Ala Ile Thr Leu
 435 440 445
 Tyr Asp Gln Glu Glu Tyr Asn Lys Thr Val Ala Ile Asp Ala Val Val
 450 455 460
 Lys Asn Val Lys Gly Asn Ala Val Trp Thr Glu Pro Tyr Arg Thr Val
 465 470 475 480
 Gly Thr Lys Leu Ile Gly Pro Ala Glu Thr Tyr Leu Asn Lys Glu Val
 485 490 495
 Glu Val Val Arg Glu Ala Lys Thr Pro Lys Gly Thr Tyr Tyr Gln Phe
 500 505 510
 Lys Ser Gly Gly Lys Val Ile Gly Trp Leu Asp Lys Lys Ala Phe Asp
 515 520 525
 Val Tyr Asp Asn Ile Asn Tyr Asn Lys Ala Val Asn Leu Asp Ala Val
 530 535 540
 Val Glu Asn Val Thr Gly Asn Ala Val Trp Thr Ala Pro Tyr Lys Ser
 545 550 555 560
 Lys Gly Val Lys Leu Val Thr Ser Ala Ala Thr Tyr Lys Gly Lys Ala
 565 570 575
 Thr Lys Ile Thr Arg Glu Ala Gln Thr Ser Arg Gly Thr Tyr Tyr Glu
 580 585 590
 Phe Ser Val Asp Gly Lys Val Ile Gly Trp Leu Asp Lys Lys Ala Phe
 595 600 605
 Asp Val Tyr Asp Asn Ile Asn Tyr Asn Lys Ala Val Asn Leu Asp Ala
 610 615 620
 Val Val Glu Asn Val Thr Gly Asn Ala Val Trp Thr Ala Pro Tyr Lys

ES 2 577 830 T3

625 630 635 640

Ser Lys Gly Val Lys₆₄₅ Leu Val Thr Ser Ala₆₅₀ Ala Thr Tyr Lys Asp₆₅₅ Lys

Ala Thr Lys Ile₆₆₀ Thr Arg Glu Ala Gln₆₆₅ Thr Ser Arg Gly Thr Tyr Tyr
670

Glu Phe Ser Val Asn Gly Lys Val₆₈₀ Ile Gly Trp Leu Asp₆₈₅ Lys Lys Ala

Phe Asp₆₉₀ Val Tyr Asp Ser Ile₆₉₅ Glu Tyr Asn Lys Ala₇₀₀ Ile Asn Met Thr

Gly Leu Leu Ser Asn Ala₇₁₀ Pro Gly Asn Gly Ile₇₁₅ Trp Thr Glu Pro Tyr
720

Arg Val Ile Gly Thr₇₂₅ Lys Asn Val Gly Gln₇₃₀ Ala Thr Ala Tyr Ala₇₃₅ Asn

Lys Thr Val Gln₇₄₀ Leu Ile Arg Glu Ala₇₄₅ Lys Thr Thr Arg Ala₇₅₀ Thr Tyr

Tyr Gln Met₇₅₅ Ser Val Asn Gly Lys₇₆₀ Ile Val Gly Trp Val₇₆₅ Asp Lys Arg

Ala Phe Thr Asn Val Lys
770

<210> 12
 <211> 294
 <212> PRT
 <213> *Streptomyces coelicolor*
 <400> 12

5

Met Pro Ala Tyr Ser₅ Ser Leu Ala Arg Arg₁₀ Gly Arg Arg Pro Ala Val
1 15

Val Leu Leu Gly₂₀ Gly Leu Val Ser Ala₂₅ Ser Leu Ala Leu Thr Leu Ala
30

Pro Thr Ala₃₅ Ala Ala Ala Pro Leu Ala Pro Pro Pro Gly₄₅ Lys Asp Val

Gly Pro Gly Glu Ala Tyr Met₅₅ Gly Val Gly Thr Arg Ile Glu Gln Gly
60

Leu Gly Ala Gly Pro Asp₇₀ Glu Arg Thr Ile Gly₇₅ Pro Ala Asp Thr Ser
80

Gly Val Gln Gly Ile₈₅ Asp Val Ser His Trp₉₀ Gln Gly Ser Ile Asn Trp
95

10

ES 2 577 830 T3

Ser Ser Val Lys Ser Ala Gly Met Ser Phe Ala Tyr Ile Lys Ala Thr
 100 105 110

Glu Gly Thr Asn Tyr Lys Asp Asp Arg Phe Ser Ala Asn Tyr Thr Asn
 115 120 125

Ala Tyr Asn Ala Gly Ile Ile Arg Gly Ala Tyr His Phe Ala Arg Pro
 130 135 140

Asn Ala Ser Ser Gly Thr Ala Gln Ala Asp Tyr Phe Ala Ser Asn Gly
 145 150 155 160

Gly Gly Trp Ser Arg Asp Asn Arg Thr Leu Pro Gly Val Leu Asp Ile
 165 170 175

Glu His Asn Pro Ser Gly Ala Met Cys Tyr Gly Leu Ser Thr Thr Gln
 180 185 190

Met Arg Thr Trp Ile Asn Asp Phe His Ala Arg Tyr Lys Ala Arg Thr
 195 200 205

Thr Arg Asp Val Val Ile Tyr Thr Thr Ala Ser Trp Trp Asn Thr Cys
 210 215 220

Thr Gly Ser Trp Asn Gly Met Ala Ala Lys Ser Pro Phe Trp Val Ala
 225 230 235 240

His Trp Gly Val Ser Ala Pro Thr Val Pro Ser Gly Phe Pro Thr Trp
 245 250 255

Thr Phe Trp Gln Tyr Ser Ala Thr Gly Arg Val Gly Gly Val Ser Gly
 260 265 270

Asp Val Asp Arg Asn Lys Phe Asn Gly Ser Ala Ala Arg Leu Leu Ala
 275 280 285

Leu Ala Asn Asn Thr Ala
 290

<210> 13

<211> 334

5 <212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 13

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

Ala Val Ala Ala Thr Gln Ala Asn Ala Ala Thr Thr His Thr Val Lys
 20 25 30

10

ES 2 577 830 T3

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

ES 2 577 830 T3

Val Ser Glu Met Asn Tyr Ser Ala Ala Pro Gly Ile Leu Thr Tyr Arg
 305 310 315 320

Thr Val Pro Ala Tyr Gln Val Asn Asn Tyr Arg Tyr Ile His
 325 330

5 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos diseñada para actuar como ligador
 <400> 14

15 Gly Gly Ser Lys Pro Gly Gly Thr Lys Pro Gly Gly Ser Lys Pro
 1 5 10 15

20 <210> 15
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> secuencia de nucleótidos diseñada para actuar como cebador
 <400> 15
 cacacacat ggcg 14

30 <210> 16
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> secuencia de nucleótidos diseñada para actuar como cebador
 <400> 16
 tgtgtgacta gt 12

40 <210> 17
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> secuencia de nucleótidos diseñada para actuar como cebador
 <400> 17
 tgtgtggat cc 12

50 <210> 18
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> secuencia de nucleótidos diseñada para actuar como cebador
 <400> 18
 gtttaacttt aagaaggaga tataacatgg cg 32

60 <210> 19
 <211> 29

ES 2 577 830 T3

	<212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
5	<223> secuencia de nucleótidos diseñada para actuar como cebador	
	<400> 19 cctttcgggc ttgttactg cagggatcc	29
10	<210> 20 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> secuencia de nucleótidos diseñada para actuar como cebador	
	<400> 20 gtttaacttt aagaaggaga ctgcagatgg cg	32
20	<210> 21 <211> 29 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> secuencia de nucleótidos diseñada para actuar como cebador	
30	<400> 21 cctttcgggc ttgttagtc gacggatcc	29
	<210> 22 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> secuencia de nucleótidos diseñada para actuar como cebador	
40	<400> 22 gtttaacttt aagaaggaga gtcgacatgg cg	32
	<210> 23 <211> 29 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> secuencia de nucleótidos diseñada para actuar como cebador	
50	<400> 23 cctttcgggc ttgttagat atcggatcc	29

REIVINDICACIONES

1. Método de examen para un polipéptido quimérico lítico que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un dominio de unión a células (CBD) y una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un dominio activo enzimático (EAD) y opcionalmente una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un CBD y al menos un EAD, en el que el EAD se selecciona del grupo que consiste en
 - (i) el dominio lítico de una lisina de bacteriófago,
 - (ii) el dominio lítico de una bacteriocina,
 - (iii) el dominio lítico de una autolisina bacteriana; y
 - (iv) una proteína asociada a cola de bacteriófago que tiene actividad lítica;
 - (b) amplificar una secuencia de primer (1^{er}) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir diferentes sitios de restricción en el extremo 5' y en el extremo 3', y un marcaje con etiqueta en el extremo 5' o en el extremo 3';
 - (c) amplificar una secuencia de segundo (2^o) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir:
 - (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del 1^{er} dominio, y en el extremo 3' un sitio de restricción diferente de los sitios de restricción introducidos en la secuencia de 1^{er} dominio,
 - (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del 1^{er} dominio, y en el extremo 5' un sitio de restricción diferente de los sitios de restricción introducidos en la secuencia de 1^{er} dominio;
 - (d) amplificar una secuencia de tercer (3^{er}) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir:
 - (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del 2^o dominio anterior, y en el extremo 3' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 5' del 1^{er} dominio,
 - (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del 2^o dominio anterior, y en el extremo 5' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 3' del 1^{er} dominio
 en el que el par de cebadores se diseña además de manera que los sitios de restricción sean diferentes en el extremo 5' y en el extremo 3' de la secuencia de 3^{er} dominio;
 - (e) opcionalmente amplificar una o más secuencias de dominio adicionales seleccionadas de las secuencias de dominio de (a) para ampliar la serie de secuencias de dominio según las etapas (b) a (d), usando para cada una de dicha una o más secuencias de dominio adicionales un par de cebadores diseñados siguiendo el principio de las etapas (c) y (d) para introducir:
 - (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del dominio anterior, y en el extremo 3' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 5' del 1^{er} dominio,
 - (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del dominio anterior, y en el extremo 5' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 3' del 1^{er} dominio;
 en el que el par de cebadores se diseña además de manera que los sitios de restricción sean diferentes en el extremo 5' y en el extremo 3' de cada una de dicha una o más secuencias de dominio adicionales;
 - (f) realizar una digestión de restricción de las secuencias de dominio amplificadas de cualquiera de las etapas (b) a (e) con enzimas de restricción que seleccionan como diana los sitios de restricción introducidos en cualquiera de las etapas (b) a (e), en el que no se realiza una digestión de restricción en el sitio de restricción introducido en un extremo que porta un marcaje con etiqueta;
 - (g) ligar las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio digeridas obtenidas en la etapa (f) para obtener un producto de ligación que comprende las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio;

- (h) unir el producto de ligación de la etapa (g) a un soporte sólido usando el marcaje de etiqueta de la secuencia de 1^{er} dominio para obtener un producto de ligación unido que comprende las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio;
- 5 (j) ligar la secuencia de 3^{er} dominio digerida de (d) obtenida en la etapa (f) al producto de ligación unido de la etapa (h) para obtener un producto de ligación unido que comprende las secuencias de 1^{er}, 2^o y 3^{er} dominio;
- (k) ligar opcionalmente una o más secuencias de dominio digeridas de (e) obtenidas en la etapa (f) al producto de ligación unido de la etapa (j) para obtener un producto de ligación unido que comprende una o más secuencias de dominio adicionales de (e);
- 10 (l) liberar el producto de ligación obtenido en cualquiera de las etapas (h) a (k) del soporte sólido;
- (m) clonar el producto de ligación obtenido en la etapa (l) en un vector de expresión;
- (n) introducir el vector obtenido en la etapa (m) en un hospedador de expresión, preferiblemente en un hospedador de expresión bacteriano;
- 15 (o) cultivar el hospedador de expresión de la etapa (n) que porta el vector obtenido en la etapa (m) en condiciones adecuadas para permitir la expresión de un polipéptido lítico codificado por las secuencias de dominio del producto de ligación clonado;
- (p) seleccionar y aislar un clon de expresión que expresa un polipéptido lítico según la etapa (o) usando la actividad lítica del polipéptido; y
- 20 (q) caracterizar el polipéptido lítico expresado por el clon de expresión aislado de la etapa (p) e identificar un polipéptido quimérico lítico.
2. Método de generación de un polipéptido quimérico que tiene al menos un dominio de unión a células (CBD) y al menos un dominio activo enzimático (EAD), comprendiendo el método las etapas de:
- 25 (a) proporcionar una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un CBD y una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un EAD, y opcionalmente una o más secuencias de ADN que codifican cada una al menos un CBD y al menos un EAD, en el que el EAD se selecciona del grupo que consiste en
- (i) el dominio lítico de una lisina de bacteriófago;
- (ii) el dominio lítico de una bacteriocina;
- (iii) el dominio lítico de una autolisina bacteriana; y
- 30 (iv) una proteína asociada a cola de bacteriófago que tiene actividad lítica.
- (b) amplificar una secuencia de primer (1^{er}) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir diferentes sitios de restricción en el extremo 5' y en el extremo 3', y un marcaje con etiqueta en el extremo 5' o en el extremo 3';
- 35 (c) amplificar una secuencia de segundo (2^o) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir:
- (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del primer dominio, y en el extremo 3' un sitio de restricción diferente de los sitios de restricción introducidos en la secuencia de 1^{er} dominio,
- 40 (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del 1^{er} dominio, y en el extremo 5' un sitio de restricción diferente de los sitios de restricción introducidos en la secuencia de 1^{er} dominio;
- (d) amplificar una secuencia de tercer (3^{er}) dominio seleccionada de las secuencias de dominio de (a) usando un par de cebadores diseñados para introducir:
- 45 (i) en el caso del marcaje en el extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del 2^o dominio anterior, y en el extremo 3' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 5' del 1^{er} dominio,
- (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del 2^o dominio anterior, y en el extremo 5' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 3' del 1^{er} dominio,

en el que el par de cebadores se diseña además de manera que los sitios de restricción sean diferentes en el extremo 5' y en el extremo 3' de la secuencia de 3^{er} dominio;

- 5 (e) opcionalmente amplificar una o más secuencias de dominio adicionales seleccionadas de las secuencias de dominio de (a) para ampliar la serie de secuencias de dominio según las etapas (b) a (d), usando para cada una de dicha una o más secuencias de dominio adicionales un par de cebadores diseñados siguiendo el principio de las etapas (c) y (d) para introducir:
- (i) en el caso del marcaje del extremo 5' del 1^{er} dominio: en el extremo 5' el mismo sitio de restricción que en el extremo 3' del dominio anterior, y en el extremo 3' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 5' del 1^{er} dominio,
- 10 (ii) en el caso del marcaje del extremo 3' del 1^{er} dominio: en el extremo 3' el mismo sitio de restricción que en el extremo 5' del dominio anterior, y en el extremo 5' un sitio de restricción que es diferente al de en el extremo 3' del 1^{er} dominio;
- en el que el par de cebadores se diseña además de manera que los sitios de restricción sean diferentes en el extremo 5' y en el extremo 3' de cada una de dicha una o más secuencias de dominio adicionales;
- 15 (f) realizar una digestión de restricción de las secuencias de dominio amplificadas de cualquiera de las etapas (b) a (e) usando enzimas de restricción que seleccionan como diana los sitios de restricción introducidos en cualquiera de las etapas (b) a (e), en el que no se realiza una digestión de restricción en el sitio de restricción introducido en un extremo que porta un marcaje con etiqueta;
- 20 (g) ligar las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio digeridas obtenidas en la etapa (f) para obtener un producto de ligación que comprende las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio;
- (h) unir los productos de ligación de la etapa (g) a un soporte sólido usando el marcaje de etiqueta de la secuencia de 1^{er} dominio para obtener un producto de ligación unido que comprende las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio;
- 25 (j) ligar la secuencia de 3^{er} dominio digerida de (d) obtenida en la etapa (f) al producto de ligación unido de la etapa (h) para obtener un producto de ligación unido que comprende las secuencias de 1^{er}, 2^o y 3^{er} dominio;
- (k) ligar opcionalmente una o más secuencias de dominio digeridas de (e) obtenidas en la etapa (f) al producto de ligación unido de la etapa (j) para obtener un producto de ligación unido que comprende una o más secuencias de dominio adicionales de (e);
- 30 (l) liberar el producto de ligación obtenido en una cualquiera de las etapas (h) a (k) del soporte sólido; y
- (m) caracterizar el producto de ligación obtenido en la etapa (l) e identificar polipéptidos quiméricos que tienen al menos un CBD y al menos un EAD.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además una etapa de lavado tras unir el primer producto de ligación al soporte sólido en la etapa (h) para eliminar los productos de ligación no unidos y/o las secuencias de dominio no ligadas.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las etapas (g) y (h) se sustituyen por una etapa de unir la secuencia de 1^{er} dominio digerida a un soporte sólido usando el marcaje de etiqueta en el extremo 5' o en el extremo 3', respectivamente, y una etapa posterior de ligar la secuencia de 2^o dominio digerida de (c) obtenida en la etapa (f) a la secuencia de 1^{er} dominio unida para obtener un producto de ligación unido que comprende las secuencias de 1^{er} y 2^o dominio.
- 40 5. Método según la reivindicación 4, que comprende además una etapa de eliminar secuencias de dominio no unidas tras unir el primer producto de ligación al soporte sólido, y opcionalmente una etapa adicional de eliminar secuencias de dominio no ligadas tras ligar la segunda secuencia de dominio a la primera secuencia de dominio unida.
- 45 6. Método para examinar un polipéptido quimérico lítico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 5, que comprende además una etapa de eliminar secuencias de dominio no ligadas tras cada etapa de ligación realizada en cualquiera de las etapas (j) a (k).
7. Método para generar polipéptidos quiméricos que tienen al menos un CBD y al menos un EAD según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, que comprende además una etapa de eliminar secuencias de dominio no ligadas tras cada etapa de ligación realizada en la etapas (j) y (k).
- 50 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las secuencias de dominio de (a) se

clonan en un vector antes de la amplificación.

- 5
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la etapa de liberar el producto de ligación o productos de ligación del soporte sólido se lleva a cabo usando una enzima de restricción que selecciona como diana el sitio de restricción en el extremo del 1^{er} dominio que está portando el marcaje con etiqueta.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que en el caso de etapas de ligación repetidas opcionalmente tras cualquier etapa de ligación repetida, parte del producto de ligación unido obtenido se separa del método antes de realizar una etapa de ligación posterior.
- 10
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el soporte sólido es una partícula, una superficie de un dispositivo, una lámina metálica o un vellón.
12. Método según la reivindicación 11, en el que la partícula es una perla de sílice o una perla de polímero orgánico que es magnética.

FIGURA 1

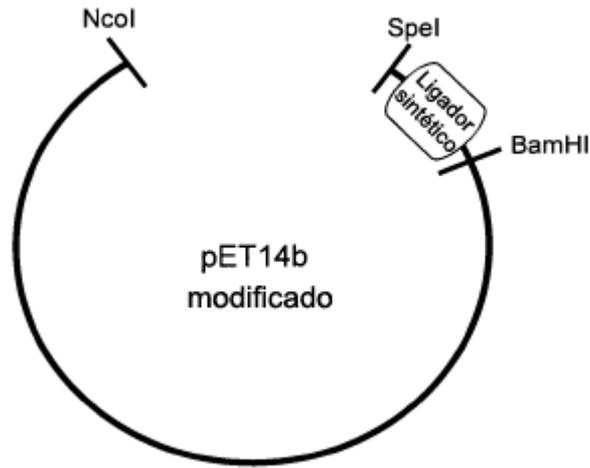


FIGURA 2

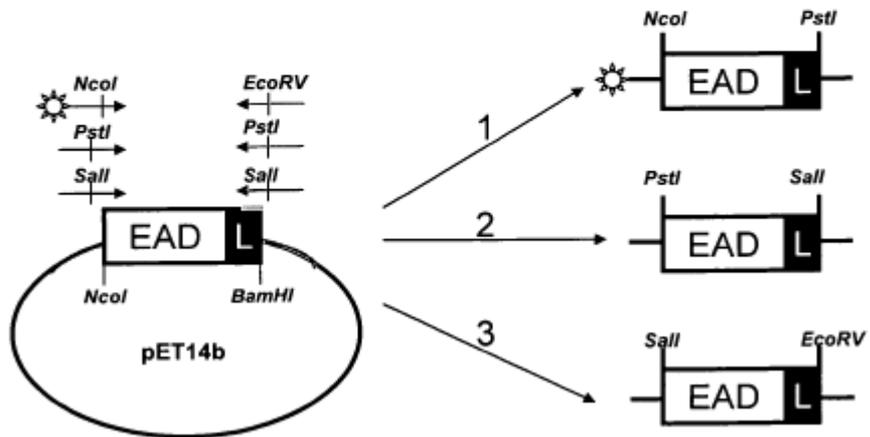


FIGURA 3

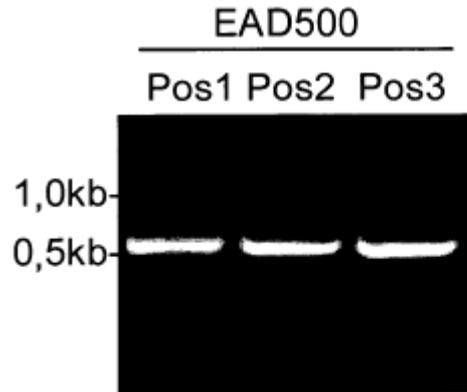


FIGURA 4

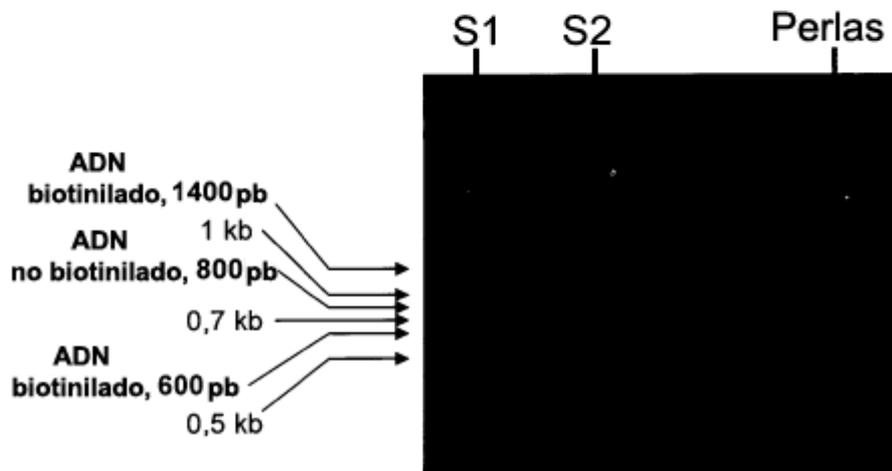


FIGURA 5

EAD	CBD
EAD511	CBD006
EAD511	CBD500
EAD511	CBD511
EAD511	CBDP40
EADP35	CBD006
EADP35	CBD500
EADP35	CBD511
EADP35	CBDP40
EADP40	CBD006
EADP40	CBD500
EADP40	CBD511
EADP40	CBDP40
EADPSA	CBD006
EADPSA	CBD500
EADPSA	CBD511
EADPSA	CBDP40

FIGURA 6

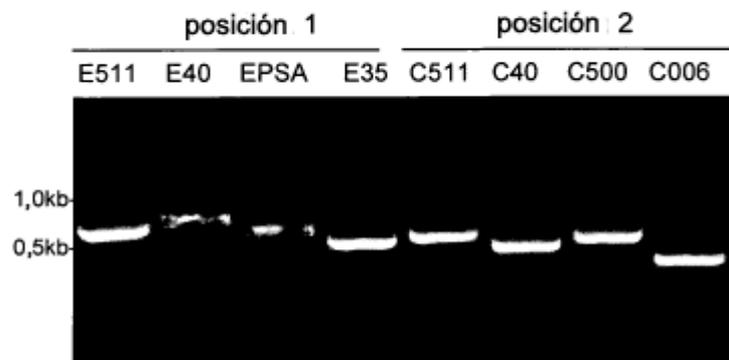


FIGURA 7

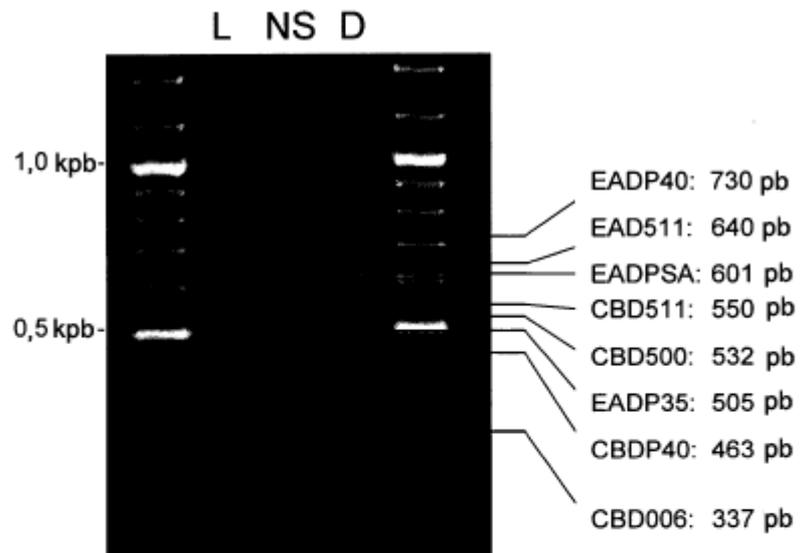


FIGURA 8

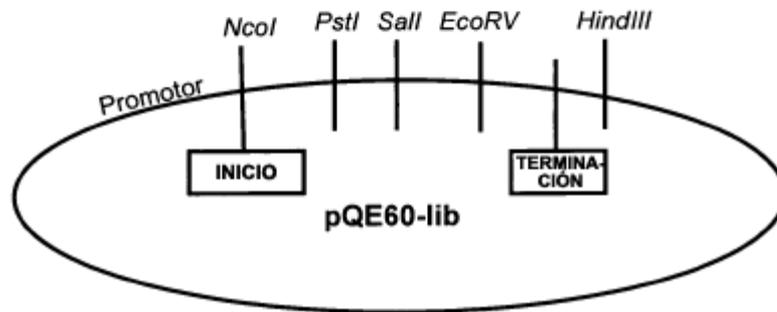


FIGURA 9

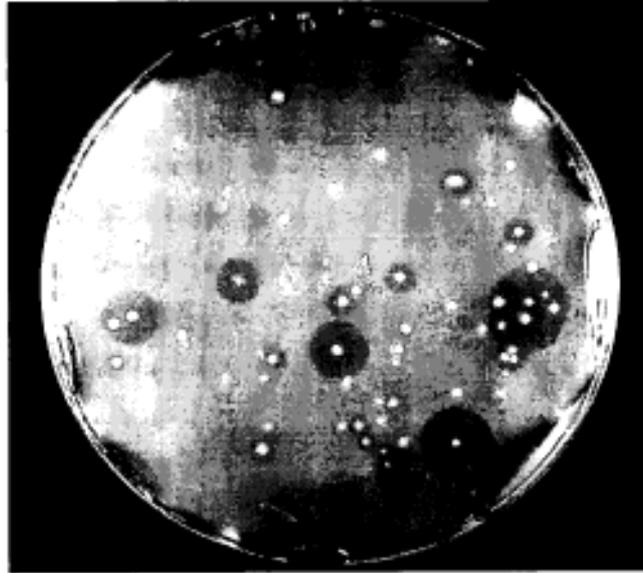


FIGURA 10

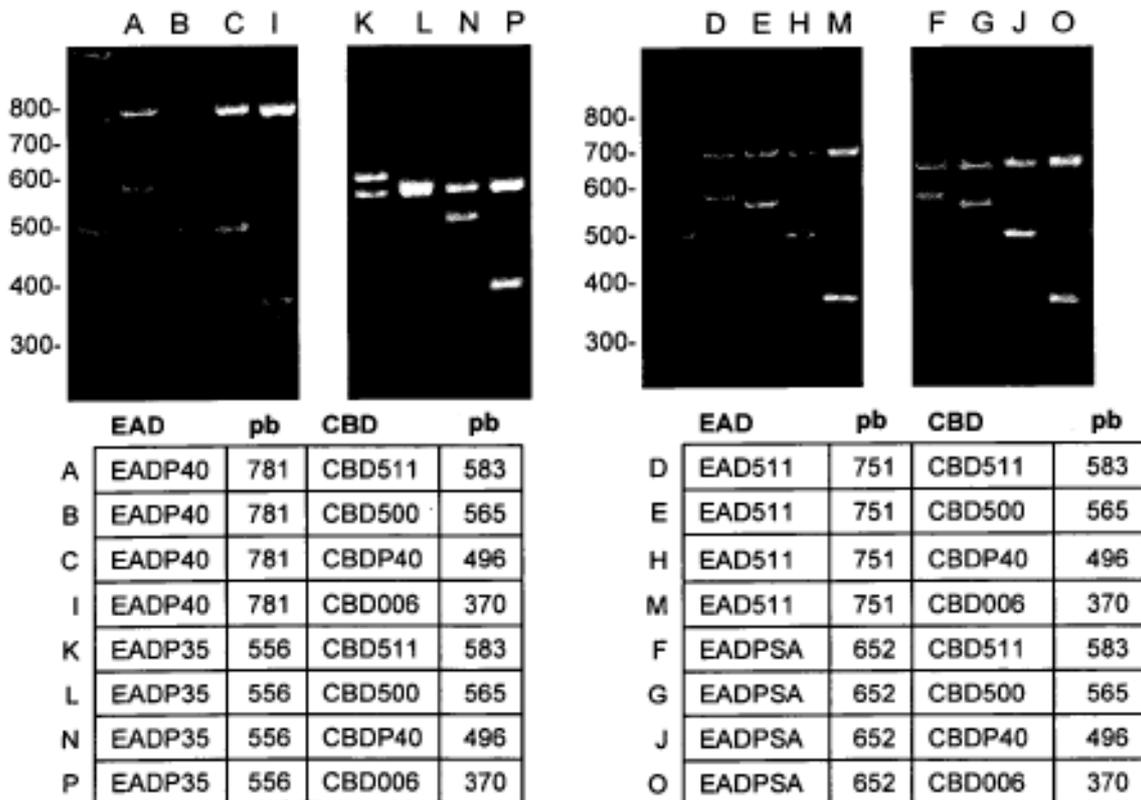
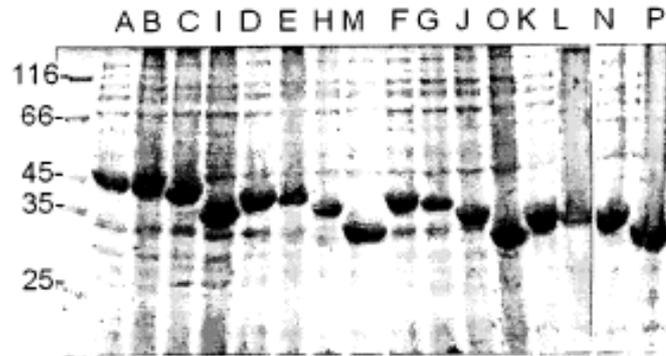


FIGURA 11



	EAD	CBD	kDa
A	EADP40	CBD511	43
B	EADP40	CBD500	44
C	EADP40	CBDP40	40
I	EADP40	CBD006	36
D	EAD511	CBD511	39
E	EAD511	CBD500	40
H	EAD511	CBDP40	36
M	EAD511	CBD006	32
F	EADPSA	CBD511	37
G	EADPSA	CBD500	39
J	EADPSA	CBDP40	35
O	EADPSA	CBD006	30
K	EADP35	CBD511	34
L	EADP35	CBD500	36
N	EADP35	CBDP40	32
P	EADP35	CBD006	27

FIGURA 12

	EAD	CBD	sv 6a	sv 1/2a	sv 4b
A	EADP40	CBD511	++	++	++
B	EADP40	CBD500	++		++
C	EADP40	CBDP40			
D	EAD511	CBD511	++	++	++
E	EAD511	CBD500	++		++
F	EADPSA	CBD511	(+)	+	+
G	EADPSA	CBD500	(+)		(+)
H	EAD511	CBDP40			
I	EADP40	CBD006		+	(+)
J	EADPSA	CBDP40			
K	EADP35	CBD511	(+)	+	+
L	EADP35	CBD500	(+)		+
M	EAD511	CBD006		+	
N	EADP35	CBDP40			
O	EADPSA	CBD006		+	
P	EADP35	CBD006		(+)	

Espectro de unión esperado
 CBD500: sv 4,5,6
 CBD511: todas
 CBD006: sv 1/2, 3, 7
 CBDP40: casi todas, (menos la 6a)

FIGURA 13A

Método que usa marcaje en 5' según el primer aspecto de la invención

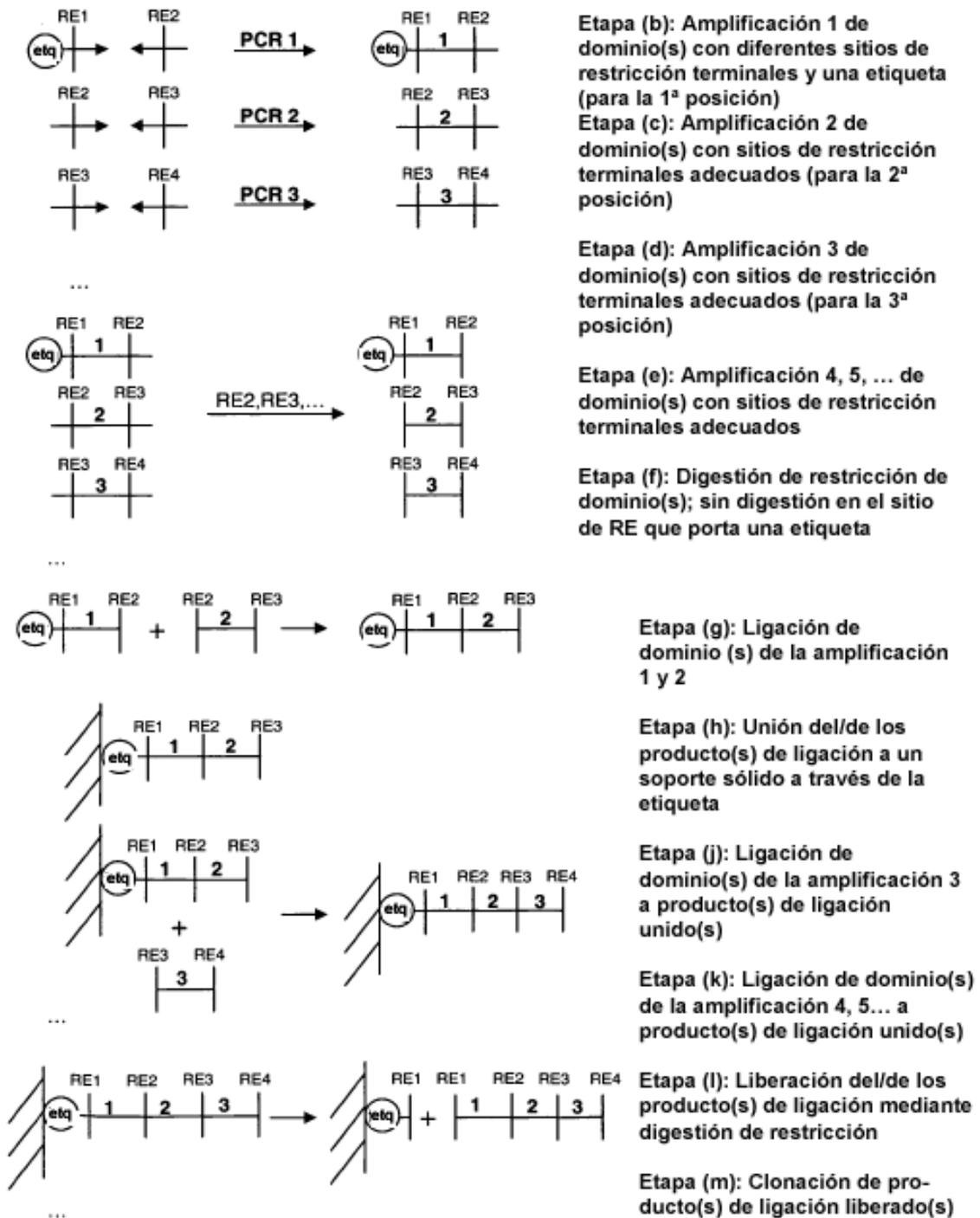


FIGURA 13B

Método que usa marcaje en 3' según el primer aspecto de la invención

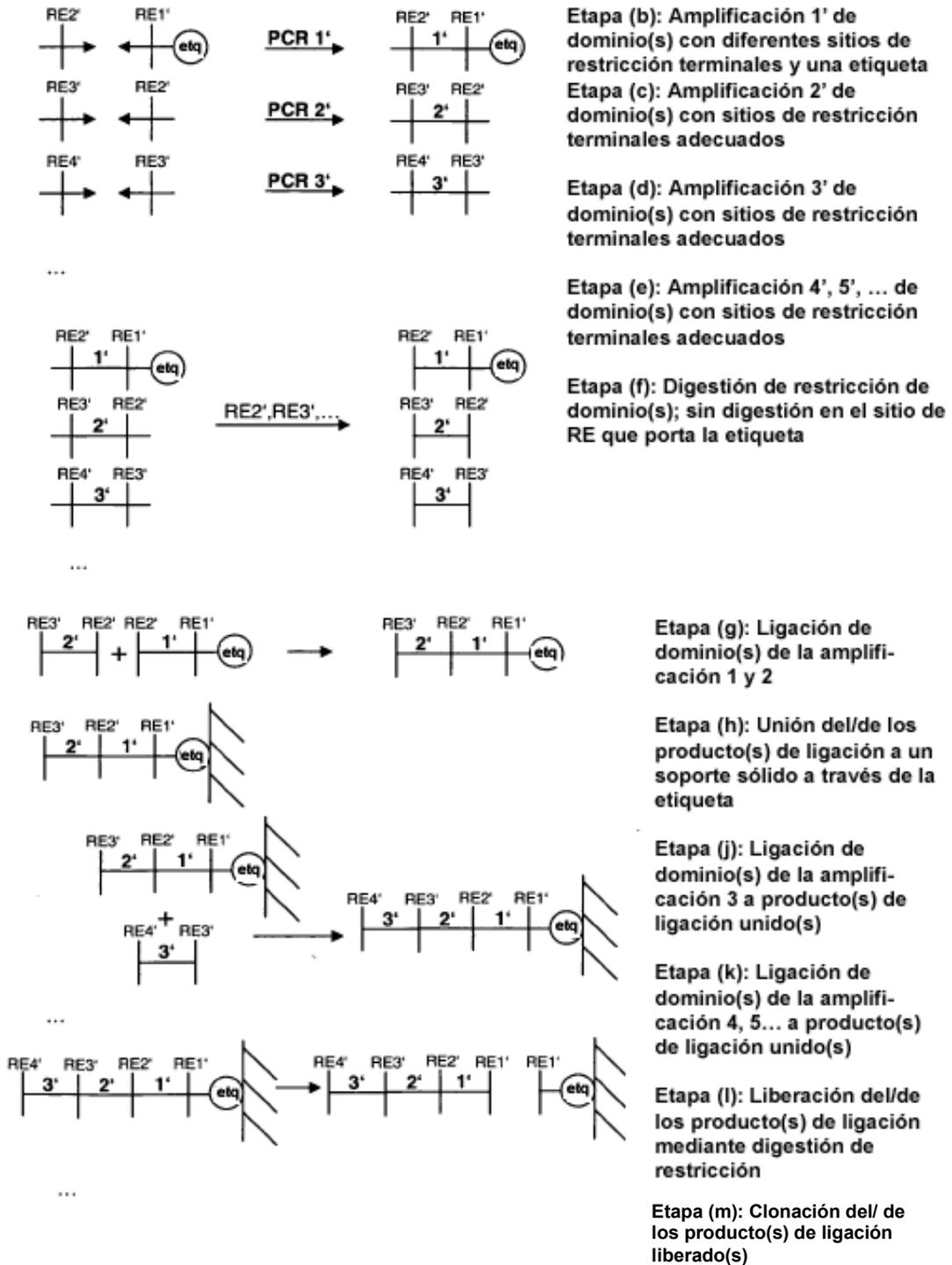


FIGURA 14A

Método que usa marcaje en 5' según el segundo aspecto de la invención

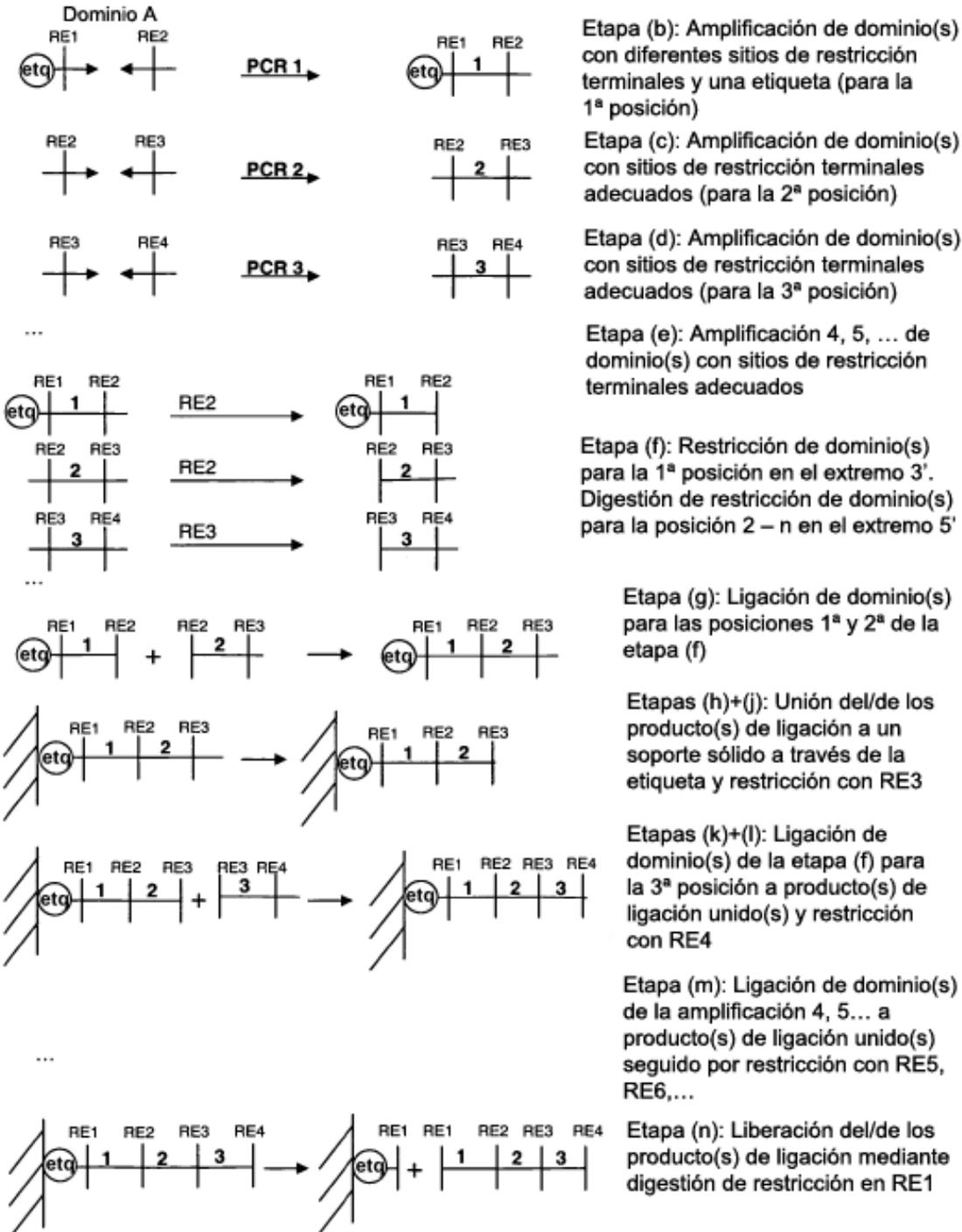


FIGURA 14B

Método que usa marcaje en 3' según el segundo aspecto de la invención

