

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 279**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/86** (2006.01)  
**C12N 15/55** (2006.01)  
**C12N 15/75** (2006.01)  
**A61K 38/46** (2006.01)  
**C12N 1/21** (2006.01)  
**A61P 1/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2011 PCT/FI2011/050450**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO11148041**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2011 E 11786185 (6)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2576776**

54 Título: **Beta-lactamasas modificadas y métodos y usos relacionados con las mismas**

30 Prioridad:

**24.05.2010 FI 20105572**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**31.10.2016**

73 Titular/es:

**SYNTHETIC BIOLOGICS, INC. (100.0%)**  
**9605 Medical Center Dr., Suite 270**  
**Rockville, MD 20850, US**

72 Inventor/es:

**KOSKI, PERTTI;**  
**AIRAKSINEN, ULLA y**  
**VÄLIMÄKI, KATJA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 588 279 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Beta-lactamasas modificadas y métodos y usos relacionados con las mismas.

### 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a productos farmacéuticos y beta-lactamasas modificadas. Específicamente, la invención se refiere a beta-lactamasas recombinantes novedosas y composiciones farmacéuticas que comprenden las beta-lactamasas.

10

Además, la presente invención se refiere a métodos para modificar una beta-lactamasa y producir la beta-lactamasa. Adicionalmente, la presente invención se refiere a la beta-lactamasa para su uso como un medicamento y al uso de la beta-lactamasa en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir los efectos adversos inducidos por los antibióticos betalactámicos.

15

Aún adicionalmente, la invención se refiere a un polinucleótido y una célula huésped que comprende el polinucleótido.

### Antecedentes de la invención

20

Los antibióticos betalactámicos están caracterizados por un anillo beta-lactámico en su estructura molecular. La integridad anillo beta-lactámico es esencial para la actividad biológica, que da como resultado la activación de un conjunto de transpeptidasas que catalizan las reacciones de entrecruzamiento finales de la síntesis del peptidoglicano. Los miembros de la familia de los antibióticos betalactámicos comprenden penicilinas, cefalosporinas, clavamas (u oxapenamas), cefamicinas y carbapenemas.

25

Las beta-lactamasas son enzimas defensivas bacterianas que hidrolizan los antibióticos betalactámicos. La producción de beta-lactamasas es un mecanismo predominante para conferir resistencia beta-lactámica a las bacterias Gram-negativas. Las beta-lactamasas catalizan muy eficientemente la hidrólisis irreversible del enlace amida del anillo beta-lactámico, dando como resultado uno o más productos biológicamente inactivos.

30

Debido a la diversidad de las características enzimáticas de los diferentes tipos de beta-lactamasas, se han propuesto varios sistemas de clasificación para su categorización. Las clasificaciones se basan en dos enfoques principales, que son las clasificaciones funcional y molecular.

35

El esquema de clasificación funcional de las beta-lactamasas propuesto por Bush y col., (1995, Antimicrob. Agents Chemother. 39: 1211-1233) define cuatro grupos de beta-lactamasas, que se basan en su perfiles de sustrato e inhibidor. El grupo 1 consiste en cefalosporinas que no se inhiben bien por el ácido clavulánico. El grupo 2 consiste en penicilinas, cefalosporinas y beta-lactamasas de amplio espectro que se inhiben generalmente por inhibidores de beta-lactamasa dirigidos a sitio activo. El grupo 3 consiste en metalo-beta-lactamasas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas, y que se inhiben de forma deficiente por casi todas las moléculas que contienen beta-lactama. El grupo 4 consiste en penicilinas que no se inhiben bien por el ácido clavulánico. También se han definido subgrupos de acuerdo con los índices de hidrólisis de la carbenicilina o la cloxacilina (oxacilina) por las penicilinas del grupo 2.

45

La clasificación usada más ampliamente es la clasificación de Ambler que divide las beta-lactamasas en cuatro clases (A, B, C, D) y se basa en sus secuencias aminoacídicas (Ambler 1980, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 289: 321-331). Las clases A, C y D reúnen a nivel evolutivo distintos grupos de enzimas de serina beta-lactamasa, y la clase B las enzimas de dependientes beta-lactamasa dependientes de cinc ("inhibidas por EDTA") (Ambler R.P. y col., 1991, Biochem J. 276: 269-270). Las clases A, C y D pertenecen a las serina beta-lactamasas, en las que la hidrólisis de la beta-lactama está mediada por serina en un sitio activo. Las serina beta-lactamasas están relacionadas con las DD peptidasas (D-alanil-D-alanina carboxipeptidasas), la enzima diana de las beta-lactamas. Se cree que el mecanismo por el que las serina beta-lactamasas hidrolizan los antibióticos betalactámicos sigue una ruta de tres etapas, incluyendo un complejo de Henri-Michaelis no covalente, un intermedio acil-enzima covalente y desacilación (Matagne y col., 1998, Biochem J 330: 581-598). El mecanismo de acilación se considera como un mecanismo común para todos los grupos de serina beta-lactamasa mientras que, sobre la base de cálculos teóricos, los mecanismos de desacilación de sustrato de serina beta-lactamasa de las clases A, C y D parecen diferir entre sí. Los mecanismos de desacilación tienen procesos elementales comunes y específicos de grupos (Hata M y col., 2006, Biol Pharm Bull. 29: 2151-2159).

50

55

- Las serina beta-lactamasas de *Bacillus spp.* y las familias TEM-1, SHV-1 y CTX-M se han clasificado principal como beta-lactamasas de clase A y como penicilinasas que poseen buena capacidad de hidrolizar, por ejemplo, penicilina y ampicilina. Las beta-lactamasas de clase A se identifican en primer lugar en *St. aureus* resistente a penicilina en la década de 1940. Se descubrió un gen resistente a la penicilina transportado por plásmido, TEM-1, en *E. coli* 20 años después. Más tarde, las serina beta-lactamasas también demostraron evolucionar la capacidad de hidrolizar la mayor parte de las cefalosporinas y especializarse adicionalmente en la hidrolización de un subconjunto específico de cefalosporinas. La mayor parte de estas beta-lactamasas de espectro extendido (ESBL) son derivados de las enzimas TEM-1, TEM-2 o SHV-1. Recientemente, hay un número creciente de informes que describen la gran aparición de enzimas CTX-M, un nuevo grupo de ESBL de clase A. Hoy en día, las enzimas CTX-M son las ESBL más frecuentemente observadas y se sub-clasifican en cinco familias principales. Las enzimas CTX-M tienen una amplia gama amplia de sustrato incluyendo la penicilina y las cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación (Bonnet, R. 2004. Antimicrob Agents Chemother. 48: 1-14).
- 15 Aunque la similitud de secuencia entre las beta-lactamasas de clase A (TEM, SHV, CTX-M, beta-lactamasas de *Bacillus spp.*) es moderada, las estructuras cristalinas de todas las serina beta-lactamasas muestran una similitud particularmente alta (Matagne y col., 1998, Biochem J 330: 581-598; Tranier S. y col., 2000, J Biol Chem, 275: 28075-28082; Santillana E. y col., 2007, Proc Natl Acad Sci. USA, 104: 5354-5359). Las enzimas están compuestas por dos dominios. Un dominio consiste en una lámina beta de cinco hebras empaquetada contra tres hélices alfa, mientras que el segundo dominio, un dominio alfa, está compuesto por ocho hélices alfa. El bolsillo de sitio activo es parte de la interfaz entre estos dos dominios y se elimina por el bucle omega. El bucle omega es un elemento estructural conservado de todas las beta-lactamasas de clase A y está implicado básicamente en la reacción catalítica (figura 1).
- 25 Se han identificado varias secuencias (elementos) peptídicas conservadas relacionadas con la catálisis o el reconocimiento del sustrato en las beta-lactamasas de clase A. El primer elemento conservado 70-Ser-X-X-Lys-73 (clasificación de Ambler) incluye el residuo de serina activo en la ubicación 70 en la hélice alfa<sub>2</sub> y lisina en la posición 73. El segundo elemento conservado es un bucle SXN en un dominio alfa (en las posiciones entre 130 y 132 de acuerdo con la clasificación de Ambler), donde forma un lado de una cavidad catalítica. El tercer elemento conservado (en las posiciones entre 234 y 236 de acuerdo con la clasificación de Ambler) está en la hebra interna de la lámina beta<sub>3</sub> y forma el otro lado de la cavidad catalítica. El tercer elemento conservado normalmente es KTG. Sin embargo, en algunos casos excepcionales, la lisina (K) puede reemplazarse por histidina (H) o arginina (R), y en varias beta-lactamasas, la treonina (T) puede sustituirse por serina (S) (Matagne y col., 1998. Biochem J 330: 581-598).
- 35 La resistencia mediada por beta-lactamasas a las beta-lactamas está ampliamente extendida entre la microbiota patógeno y comensal, debido al abundante uso de las beta-lactamas en las últimas décadas. De hecho, la resistencia a los antibióticos es un problema clínico bien conocido en medicina humana y veterinaria, y se han purificado y caracterizado cientos de beta-lactamasas diferentes obtenidas a partir de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en la bibliografía científica. Dado que el uso de antimicrobianos no ha reducido y, además, la resistencia antimicrobiana se ha convertido en parte de la vida diaria, se requieren invariable y urgentemente nuevos enfoques para resolver estos problemas médicos.
- 45 La microbiota intestinal de los seres humanos es una comunidad bacteriana compleja que tiene una función importante en la salud humana, por ejemplo, estimulando el sistema de respuestas inmunes, facilitando la digestión de alimentos e impidiendo el sobrecrecimiento de bacterias patógenas potenciales. Se sabe que los agentes antimicrobianos, por ejemplo, las beta-lactamas, tienen un efecto sobre la microbiota normal. La eficacia de los agentes antimicrobianos para promover cambios de la microbiota intestinal normal está asociada a varios factores, incluyendo la dosificación de fármacos, ruta de administración y farmacocinética/dinámica y propiedades de los antibióticos (Sullivan Á. y col., 2001, Lancet 1: 101-114). Aunque la microbiota intestinal tiene tendencia a invertir a normal después de la finalización del tratamiento con antibióticos, se ha indicado una persistencia a largo plazo de las bacterias comensales resistentes seleccionadas (Sjölund M. y col., 2003, Ann Intern Med. 139: 483-487). Dicha persistencia y el intercambio de los genes de resistencia antibiótica hacen de la microbiota comensal una reserva putativa de genes de resistencia antibiótica.
- 55 Ciertas beta-lactamas administradas por vía parenteral, como ampicilina, ceftriaxona, cefoperazona y piperacilina, son en parte eliminadas a través de excreción biliar en la parte proximal del intestino delgado (duodeno). Las beta-lactamas no absorbidas residuales en el tracto intestinal pueden causar un efecto no deseado sobre el equilibrio ecológico de la microbiota intestinal normal, dando como resultado diarrea asociada a antibióticos, sobrecrecimiento

de bacterias patógenas, tales como enterococos resistentes a vancomicina (VRE), bacilos Gram-negativos productores de beta-lactamasa extendida (ESBL), *Clostridium difficile*, y hongos, y una selección de cepas resistentes a antibióticos tanto entre la microbiota intestinal normal como bacterias patógenas potenciales.

- 5 El fin terapéutico de las beta-lactamasas es la inactivación de antibióticos no absorbidos en el tracto gastrointestinal (GIT), manteniendo de esta manera una microbiota intestinal normal e impidiendo su sobrecrecimiento con microorganismos potencialmente patógenos (documento WO 93/13795).

- Hay al menos tres requisitos para los productos farmacológicos de beta-lactamasa, que son adecuados para la  
 10 terapia dirigida al GIT. El primer requisito es conservar la actividad enzimática en condiciones predominantes en el GIT. La resistencia contra la descomposición proteolítica mediante diversas proteasas secretadas de diversas glándulas en el GIT es una condición previa básica para la viabilidad de la terapia de beta-lactamasa. Otra consideración importante es el intervalo de valores de pH predominantes en los diferentes compartimentos del intestino delgado. Estos valores de pH normalmente varían entre 5 (duodeno) y 7,5 (íleon). Por lo tanto, para  
 15 cualificar como candidatos para el fin terapéutico pretendido, una beta-lactamasa necesita mostrar una elevada actividad enzimática sobre el intervalo de pH 5-7,5.

- El segundo requisito de una beta-lactamasa o un producto de la misma, es hidrolizar beta-lactama eficientemente. La concentración de un antibiótico betalactámico en el bolo alimenticio del intestino delgado durante un episodio de  
 20 tratamiento con antibióticos está relacionada en mayor parte con la eliminación de la beta-lactama particular a través de la excreción biliar. Una beta-lactamasa adecuada ha de tener parámetros cinéticos que la permitan hidrolizar de forma eficaz concentraciones betalactámicas en el GIT inferior por debajo de niveles que causen alteraciones en la microbiota intestinal. El conjunto ideal de parámetros cinéticos consiste en un valor numérico bajo para la constante de Michaelis  $K_M$ , combinado con un valor numéricamente alto para la velocidad de reacción máxima  $V_{m\acute{a}x}$ . Se  
 25 requiere un alto valor  $V_{m\acute{a}x}$  para proporcionar un grado suficiente de capacidad de descomposición, mientras que es necesario un bajo valor  $K_M$  para asegurar la actividad de degradación de la beta-lactama a bajas concentraciones de sustrato.

- El tercer requisito de una beta-lactamasa, o un producto de la misma, es tolerar las condiciones, tales como  
 30 temperaturas relativamente altas, en la fabricación de composiciones farmacéuticas. Además, en el proceso de producción, la dispersión de mezcla de excipiente acuoso y la sustancia farmacológica requiere un alto grado de solubilidad a un pH adecuado.

- Se está desarrollando una terapia enzimática, denominada Ipsat P1A, para la prevención de los efectos adversos de  
 35 los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en el intestino. El sistema de administración de Ipsat P1A se ha diseñado para inactivar por vía parenteral determinadas beta-lactamas del grupo de penicilina (por ejemplo, penicilina, amoxicilina, ampicilina y piperacilina) con o sin inhibidores de la beta-lactamasa (por ejemplo, tazobactam, sulbactam, ácido clavulánico) excretados a través del sistema biliar (documento WO 2008065247; Tarkkanen, A.M. y col., 2009, Antimicrob Agents Chemother. 53: 2455-2462). La enzima P1A es una forma recombinante de la beta-lactamasa exo pequeña de  
 40 *Bacillus licheniformis* 749/C (documento WO 2008065247) que pertenece a la clase A y se agrupa en el subgrupo 2a en la clasificación funciona. La beta-lactamasa de *B. licheniformis* y su derivado P1A se consideran como penicilinasas que tienen alta capacidad hidrolítica para degradar, por ejemplo, penicilina, ampicilina, amoxicilina o piperacilina (Tabla 1) y se inhiben generalmente por inhibidores de beta-lactamasa dirigidos a sitio activo, tales como ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam (Bush K. y col., 1995, Antimicrob Agents Chemother 39: 1211-1233).

- 45 Sin embargo, la enzima P1A tiene únicamente una capacidad muy limitada para inactivar los antibióticos betalactámicos que pertenecen al grupo de cefalosporinas o el grupo carbapenem. Dado que las beta-lactamasas empleadas poseen una deficiente actividad para las cefalosporinas, no pueden aplicarse junto con terapia de cefalosporina parenteral para la inactivación de la beta-lactama no absorbida en el tracto del intestino delgado.

- 50 Por lo tanto, son indispensables nuevas beta-lactamasas o derivados de P1A con un perfil de sustrato extendido, por ejemplo, como se observa en las metalo-beta-lactamasas.

- La presente invención proporciona derivados adaptados genéticamente novedosos de la beta-lactamasa P1A y  
 55 además, métodos novedosos para modificar y producir beta-lactamasas.

#### Breve descripción de la invención

Los nuevos derivados recombinantes de la beta-lactamasa P1A de la invención cumplen los tres requisitos que se

han mencionado anteriormente de las beta-lactamasas adecuadas (es decir, tener capacidades para conservar la actividad enzimática, hidrolizar beta-lactamas de forma eficiente y tolerar las condiciones en la fabricación de las composiciones farmacéuticas) y además, tienen perfiles de sustrato extendidos. Las beta-lactamasas de la invención también pueden usarse junto con terapia de cefalosporina parenteral para inactivar la beta-lactama eliminada de forma biliar en el tracto del intestino delgado.

La presente invención destaca los estudios preliminares y preclínicos de una nueva proteína farmacéutica Ipsat P3A (un derivado sustituido con D276N de P1A) y presenta una única dosis de medicamento.

10 La presente invención permite métodos rápidos y eficientes para modificar las beta-lactamasas y para producirlas. Además, mediante la presente invención, se encuentran disponibles tratamientos más eficaces y específicos.

Las enzimas de la invención son adecuadas para una fabricación a gran escala para un medicamento para tratar o prevenir los efectos adversos inducidos por diversos grupos de antibióticos betalactámicos.

15

El objeto de la presente invención es proporcionar beta-lactamasas novedosas, especialmente beta-lactamasas de *B. licheniformis*, y proporcionar productos, métodos y usos relacionados con las beta-lactamasas. También se presentan mediante la invención herramientas para desarrollos adicionales en la industria farmacéutica.

20 La presente invención se refiere a una beta-lactamasa como se define en la reivindicación 1.

La presente divulgación se refiere a una beta-lactamasa que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y que tiene un residuo aminoacídico hidrófilo en una posición de la SEQ ID NO: 1 correspondiente a la posición 276 de acuerdo con la clasificación de Ambler, o una variante o fragmento del mismo.

25

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende la beta-lactamasa de la invención.

La presente invención se refiere a un método de modificación de una beta-lactamasa como se define en la reivindicación 2.

30

La divulgación también se refiere a un método de modificación de una beta-lactamasa que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, donde un aminoácido de la beta-lactamasa en una posición de la SEQ ID NO: 1 correspondiente a la posición 276 de acuerdo con la clasificación de Ambler se reemplaza con un aminoácido hidrófilo.

35

Además, la divulgación se refiere a un método de producción de la beta-lactamasa, donde el método comprende las siguientes etapas:

40 i) proporcionar un gen que codifica la beta-lactamasa de la invención;

ii) transformar una célula huésped con el gen;

iii) obtener una célula huésped que produce la beta-lactamasa;

45

iv) recuperar la beta-lactamasa.

Además, la invención se refiere a un método para tratar o prevenir efectos adversos inducidos por antibióticos betalactámicos en el tracto gastro-intestinal administrando la beta-lactamasa de la invención simultánea o secuencialmente con un antibiótico betalactámico a un sujeto.

50

Aún adicionalmente, la presente invención se refiere a la beta-lactamasa de la invención para su uso como un medicamento.

55 Aún adicionalmente, la presente invención se refiere a un uso de la beta-lactamasa de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir los efectos adversos inducidos por los antibióticos betalactámicos en el tracto gastro-intestinal.

Aún adicionalmente, la invención se refiere a un polinucleótido, que comprende una secuencia de una cualquiera de

las SEQ ID NO:s 2 o 4 o una degeneración de la misma, o codifica la beta-lactamasa de la invención. La invención también se refiere a una célula huésped que comprende el polinucleótido.

### Breve descripción de las figuras

- 5 La figura 1 muestra la estructura tridimensional de la beta-lactamasa de beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis* (forma exo pequeña de PenP). Se marcan los residuos aminoacídicos conservados y los residuos de cadenas laterales de R-244 y D-278. El diagrama se generó usando el programa MolSof-Browser.
- 10 La figura 2 muestra las secuencias nucleotídica y aminoacídica deducida del gen de beta-lactamasa D276N de *Bacillus licheniformis* (derivado de P1A). La secuencia aminoacídica corresponde a la secuencia SEQ ID NO: 3, donde Xaa es asparagina (Asn). La secuencia nucleotídica corresponde a la secuencia SEQ ID NO: 4, donde el triplete del nucleótido nnn es aat. El marco de lectura abierto codifica un polipéptido de 299 aminoácidos que posee una secuencia señal de 31 aminoácidos de largo (subrayado) del gen *amyQ* obtenido a partir del vector de secreción
- 15 pKTH141 (documento WO 2008/065247). El sitio de escisión de la peptidasa de señal predicho se encuentra después de la alanina (A) en la posición -1. El sitio de clonación *HindIII* que codifica una extensión NH<sub>2</sub>-QAS se expresa en negrita. La enzima mutante D276N madura empieza desde la glutamina (Q) en una posición de +1. Por lo tanto, la beta-lactamasa mutante D276N madura comprende 268 residuos aminoacídicos incluyendo la extensión NH<sub>2</sub>-QAS codificada por *HindIII*. Se localiza una única sustitución aminoacídica de ácido aspártico (D) por
- 20 asparagina (N) en la posición 280 (expresada como un carácter en negrita) correspondiente a la posición de 276 en el sistema de clasificación de Ambler y correspondiente a la posición aminoacídica 249 en la secuencia SEQ ID NO: 3.

La secuencia NH<sub>2</sub>-terminal de la enzima mutante D276N purificada se determinó por degradación de Edman automatizada en un secuenciador de proteínas. El análisis demostró que la enzima mutante D276N carece de NH<sub>2</sub>-QASKT-pentapéptido en su extremo amino deducido de una manera similar a la de su enzima P1A precursora (documento WO 2008/065247). La fracción principal de la enzima mutante D276N purificada, que se ha utilizado en los ejemplos 4 y 6 de esta solicitud, se inicia desde el ácido glutámico en la posición +6 y está compuesto por 263

25 residuos aminoacídicos con una masa molecular de 29 272.

30 La figura 3 muestra las secuencias nucleotídica y aminoacídica deducida del gen de beta-lactamasa sustituida con D276R de P1A obtenido a partir de *Bacillus licheniformis*. La secuencia aminoacídica corresponde la secuencia SEQ ID NO: 3, donde Xaa es arginina (Arg). La secuencia nucleotídica corresponde a la secuencia SEQ ID NO: 4, donde el triplete nucleotídico nnn es cgc.

35 La figura 4 muestra el efecto de los gránulos de beta-lactamasa (P3A) sustituida con D276N con revestimiento entérico administrados por vía oral sobre las concentraciones de ceftriaxona en bolo alimenticio yeyunal de perros beagle (n = 5) después de la administra intravenosa de ceftriaxona (30 mg de ceftriaxona por kg de peso corporal) (cuadrados de color negro). Los gránulos de beta-lactamasa se recibieron 10 minutos antes de la inyección de

40 ceftriaxona. Los rombos de color negro representan las concentraciones de ceftriaxona yeyunal conseguidas después de una única dosis de ceftriaxona (i.v.) sin tratamiento con beta-lactamasa.

### Descripción detallada de la invención

45 Las beta-lactamasas se han usado en la inactivación de beta-lactamas no absorbidas en el tracto gastrointestinal con el fin de prevenir los efectos adversos inducidos por la beta-lactama, incluyendo alteraciones en la microbiota intestinal normal y el sobrecrecimiento de bacterias resistentes a beta-lactama (documentos WO 9313795, WO 2008065247, WO 2007147945). Ahora, la presente invención proporciona una beta-lactamasa modificada de *Bacillus licheniformis*, que muestra un perfil de sustrato alterado sorprendente.

50 Como se usa en el presente documento, una beta-lactamasa se refiere a una enzima, que hidroliza beta-lactamas. La hidrólisis del enlace amida del anillo beta-lactámico hace a los agentes antimicrobianos biológicamente activos. Como se usa en el presente documento, las beta-lactamasas de clase A (clasificación de Ambler) se refieren a serina beta-lactamasas, en la que la hidrólisis de la beta-lactama está mediada por serina en el sitio activo,

55 normalmente en la posición aminoacídica 70 en la hélice alfa<sub>2</sub>. Las beta-lactamasas de clase A incluyen, pero sin limitación, Len-1, SHV-1, TEM-1, PSE-3/PSE-3, ROB-1, *Bacillus cereus*, tales como 5/B tipo 1, 569/H tipo 1 y 569/H tipo 3, *Bacillus anthracis* sp, *Bacillus licheniformis*, tales como beta-lactamasas de los tipos PenP, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus clausii*, *Staphylococcus aureus*, PC1, Sme-1, NmcA, IMI-, PER-, VEB-, GES-, KPC-, CME- y CTX-M.

**Identidad de secuencia de péptidos y polinucleótidos**

- Las secuencias aminoacídicas de la beta-lactamasa mutante de la presente invención (D276X, derivado P1A) se exponen como la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 3. Las secuencias nucleotídicas correspondientes se exponen como la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4. La SEQ ID NO: 1 describe la secuencia aminoacídica que participa en la formación de la estructura secundaria de la beta-lactamasa. La SEQ ID NO: 3 describe la secuencia aminoacídica de longitud completa de la proteína, incluyendo la secuencia señal de 31 aminoácidos de largo.
- 10 Una beta-lactamasa de la divulgación puede comprender una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 30, 35, 40, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,8, 99,9 o un 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 o 3.
- 15 De acuerdo con una realización específica de la divulgación, el péptido tiene al menos un 30, 35, 40, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,8, 99,9 o un 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 o 3.
- 20 En una realización preferida de la divulgación, la beta-lactamasa de la invención comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. En otra realización preferida de la invención la beta-lactamasa tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 3.
- 25 En una realización de la divulgación, la beta-lactamasa que comprende una secuencia aminoacídica que tiene cualquier identidad de secuencia que se ha mencionado anteriormente con la SEQ ID NO: 1, tiene un aminoácido hidrófilo seleccionado de un grupo que consiste en arginina (R), histidina (H), lisina (K), asparagina (N), glutamina (Q), serina (S) y treonina (T) en una posición de la SEQ ID NO: 1 correspondiente a la posición 276 de acuerdo con la clasificación de Ambler.
- 30 En una realización preferida de la divulgación, el péptido tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 o 3. En una realización de la divulgación, la beta-lactamasa tiene la secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o 3, donde un residuo aminoacídico hidrófilo en una posición correspondiente a la posición 276 de acuerdo con la clasificación de Ambler (marcado como Xaa en la SEQ ID NO: 1 o 3) es una arginina (R, Arg). En otra realización de la invención, la beta-lactamasa tiene la secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o 3, donde un residuo aminoacídico hidrófilo en una posición correspondiente a la posición 276 de acuerdo con la clasificación de Ambler (marcado como Xaa en la SEQ ID NO: 1 o 3) es una asparagina (N, Asn).
- 35 La identidad de cualquier secuencia con la secuencia de esta invención se refiere a la identidad con toda la secuencia de la presente invención. La identidad de secuencia puede determinarse por cualquier método bioinformático convencional, por ejemplo, usando BLAST (herramientas de búsqueda de alineamiento local básico) o FASTA (FAST-All).
- La presente divulgación también se refiere a cualquier variante o fragmento de las beta-lactamasas novedosas.
- 45 Como se usa en el presente documento, un fragmento o variante de la beta-lactamasa se refiere a cualquier parte o variante, que tenga una función biológica, es decir, que sea enzimáticamente activa. Una variante se refiere a un péptido que tiene pequeñas alteraciones en la secuencia peptídica, por ejemplo, mutaciones, pequeñas deleciones o inserciones. Los fragmentos y variantes deben incluir el aminoácido hidrófilo en una posición correspondiente a la posición 276 de acuerdo con la clasificación de Ambler. El aminoácido hidrófilo es típicamente distinto de ácido aspártico (D).
- 50 Existen diversas formas cortas de la beta-lactamasa, que pueden obtenerse a partir de la SEQ ID NO: 3 y que se secretan fuera de la célula. Estas se denominan exoformas. Las exoformas son el resultado de la actividad catalítica de las proteasas en la pared celular o el medio de cultivo.
- 55 El derivado P1A o P3A D276X, D276N, D276R, de forma mutante, como se usa en el presente documento, incluye cualquier fragmento activo de beta-lactamasa y/o variante de la SEQ ID NO: 3, o una variante que comprende la secuencia aminoacídica dada explícitamente (SEQ ID NO: 1). Especialmente, la beta-lactamasa de la invención es una forma truncada de NH<sub>2</sub>, lo que significa que se ha truncado en el extremo amino. Además del truncamiento de

NH<sub>2</sub>, puede comprender una o más deleciones, sustituciones y/o inserciones de aminoácidos adicionales, siempre que tenga actividad beta-lactamasa. Dichas modificaciones pueden ser variaciones o mutantes de origen natural, o modificaciones artificiales introducidas, por ejemplo, por tecnología génica.

- 5 Se han descubierto en formas truncadas aminoterminalmente de forma diferente en el medio de crecimiento de *B. licheniformis*. Dichas exoformas se incluyen también en el presente documento. Matagne y col. han descrito diversas extensiones de microheterogeneidad en las formas extracelulares producidas por el huésped natural *B. licheniformis* 749/C (Matagne A. y col., 1991. Biochem J. 273: 503-510). Se identificaron las siguientes cinco exoformas secretadas diferentes con diferentes residuos aminoacídicos N-terminal:

10

**SQPAEKNEKTEMKDD..... KALNMNGK**

**EKTEMKDD..... KALNMNGK**

- 15 **KTEMKDD..... KALNMNGK**

**EMKDD..... KALNMNGK**

**MKDD..... KALNMNGK**

20

Los residuos aminoacídicos iniciales se presentan en negrita. Los residuos aminoacídicos C-terminales se indican a la derecha. La exoforma que parte de serina (S) se denomina la "forma secretada grande" de beta-lactamasa de *B. licheniformis*, y la única que parte de lisina (K) se denomina la "forma secretada pequeña".

- 25 La primera hélice alfa (hélice  $\alpha_1$ ) empieza en ácido aspártico (D) (presentado en cursiva) y el final de la última hélice alfa (hélice  $\alpha_{11}$ ) termina en asparagina (N) (presentada en cursiva). De acuerdo con una realización de la divulgación, la beta-lactamasa comprende al menos los aminoácidos 1-258 de la SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos 7-264 de la SEQ ID NO: 3, que participan en la estructura secundaria de la proteína (Knox J.R. y col., 1991. J. Mol Biol. 220: 435-455). De acuerdo con otra realización de la divulgación, uno o más de dichos aminoácidos 1-258 de la SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos 7-264 de la SEQ ID NO: 3 se han eliminado o reemplazado.

30

De acuerdo con otra realización más de la divulgación, el terminal amino de la beta-lactamasa comienza con NH<sub>2</sub>-KTEMKDD (aminoácidos 4-10 de la SEQ ID NO: 3). Esta exoforma denominada ES-betaL puede carecer adicionalmente de hasta 21 residuos contiguos como se describe por Gebhard y col. (Gebhard L.G. y col., 2006, J. Mol. Biol. 21: 358(1)280-288). De acuerdo con otra realización de la divulgación, el terminal amino comienza con ácido glutámico (E) de la SEQ ID NO: 3, y especialmente comienza con NH<sub>2</sub>-EMKDD (aminoácidos 6-10 de la SEQ ID NO: 3), o como alternativa, comienza con NH<sub>2</sub>-MKDD (aminoácidos 7-10 de la SEQ ID NO: 3 o aminoácidos 1-4 de la SEQ ID NO: 1).

35

- 40 La región variable en la secuencia amino terminal de la beta-lactamasa no tiene una estructura rígida que justifique la constancia de los parámetros enzimáticos de diversas formas de beta lactamasa.

Los cuatro últimos aminoácidos en el extremo carboxílico de la beta-lactamasa, MNGK-COOH (aminoácidos 265-268 de la SEQ ID NO: 3), no forman parte de la estructura secundaria y, por lo tanto, pueden también eliminarse sin perder actividad. En otra realización, pueden eliminarse hasta nueve aminoácidos C-terminales. Las formas C-truncadas de la proteína se han descrito por Santos y col. (Santos J. y col., 2004. Biochemistry 43: 1715-1723).

45

Todas las diferentes formas de la beta-lactamasa que se han expuesto anteriormente se incluyen por la presente divulgación, junto con otras formas de la proteína que tienen actividad beta-lactamasa.

50

Un polinucleótido de la invención puede comprender o tener una secuencia de una cualquiera de la SEQ ID NO: 2 o 4, o una degeneración de la misma. Un polinucleótido que es una degeneración de una secuencia mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NO:s 2 o 4, se refiere a un polinucleótido que tiene uno o más nucleótidos diferentes en comparación con las SEQ ID NO:s 2 o 4, pero codifica el mismo aminoácido. Preferiblemente, el triplete nucleotídico nnn de la SEQ ID NO: 2 o 4 codifica un aminoácido hidrófilo, mucho más preferiblemente N o R. Un "polinucleótido", como se usa en el presente documento, es una secuencia de nucleótidos tales como una secuencia de ADN o ARN, y puede ser un ácido polinucleico monocatenario o bicatenario. El término polinucleótido incluye ADN genómico, ADNc y ARNm.

55

De acuerdo con una realización específica de la invención, el polinucleótido tiene al menos un 30, 35, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,8 o un 99,9 % de identidad con respecto a una cualquiera de las secuencias nucleotídicas de la SEQ ID NO: 2 o 4, o fragmentos de las mismas.

5

En una realización específica de la invención, el polinucleótido tiene una secuencia mostrada en una cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 2 o 4.

**Aminoácidos en la posición 276 (Ambler) de beta-lactamasas de clase A**

10

La asparagina (Asn, N) en la posición aminoacídica 276 está presente en una amplia diversidad de beta-lactamasas de clase A. La función de Asn276 se ha estudiado extensamente en beta-lactamasas TEM y SHV, en las que Asn276 forma enlaces de hidrógeno con el grupo guanidino de la arginina (Arg, R) 244 y, por lo tanto, limita la movilidad de la cadena lateral Arg244.

15

Las sustituciones de asparagina (Asn, N) en las enzimas TEM o SHV se han reconocido como un contribuyente principal a la resistencia a inhibidores de serina beta-lactamasa, tales como ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam. Las variantes de sustitución N276D (Asp) de beta-lactamasa TEM-1 están presentes en las beta-lactamasas resistentes a inhibidores (enzimas IRT tales como TEM-35 y TEM-36). Una variante N276D es más resistente a ácido clavulánico y tazobactam que la enzima TEM-1 de tipo silvestre, pero concomitantemente, las eficiencias catalíticas (kcat/Km) de la variante N276D para diversas penicilinas son menores del 50 % de las de la enzima de tipo silvestre TEM-1. Las eficiencias catalíticas de la variante N276D con respecto a cefalosporinas se reducen en comparación con las de TEM-1 de tipo silvestre (Saves I y col., 1995, J Biol Chem. 270: 18240-18245).

20

25

De forma similar a TEM-1, la sustitución N276D en la beta-lactamasa SHV-1 o SHV-5 mejora la resistencia a inhibidores de serina beta-lactamasa pero reduce sus eficiencias hidrolíticas con respecto a la mayor parte de las beta-lactamas (Giakkoupi P. y col., 1999, J Antimicrobiol Chemother, 43: 23-29). Además, la sustitución N276D en las enzimas SHV-1 o SHV-5 mejora moderadamente su capacidad para degradar cefalosporinas de "cuarta generación", cefpiroma y cefepima.

30

En la beta-lactamasa de tipo SHV OHIO-1, un mutante N276G (Gly) ha demostrado ser altamente resistente a ácido clavulánico, mientras que un mutante N276G derivado de TEM-1 posee únicamente una resistencia moderada a ácido clavulánico (Bonomo RA y col., 1995, Biochim Biophys Acta. 1247: 121-125).

35

En la familia de las enzimas CTX-M, la arginina (Arg, R) está típicamente presente en la posición 276 (Bonnet R., 2004, Antimicrob Agents Chemother, 48: 1-14) y las mutaciones de Arg276 afectan a la extensión de la actividad enzimática. La velocidad de hidrólisis relativa de las enzimas CTX-M contra cefotaxima se reduce moderadamente por la sustitución de Arg276. Además, las enzimas mutantes Arg276Trp, Arg276Cys, Arg276Ser y Arg276Gly CTX-M no afectan al nivel de resistencia del inhibidor de beta-lactamasa (Bonnet R., 2004, Antimicrob Agents Chemother, 48: 1-14; Perez-Llarena F.J. y col., 2008, J Antimicrobiol Chemother, 61: 792-797).

40

**Tabla 1. Residuos aminoacídicos situados en la posición 276 (clasificación de Ambler) entre las beta-lactamasas de clase A (Matagne A y col., 1998, Biochem J 330: 581-598; Tranier S. y col., 2000, J Biol Chem, 275: 28075-28082)**

45

Beta-lactamasa típica	Residuo aminoacídico típico en la posición 276
Len-1, SHV-1, TEM-1, PSE-3/PSE-3, ROB-1	Asn (N)
<i>Bacillus cereus</i> 5/B tipo 1	
<i>Bacillus cereus</i> 569/H tipo 1	
<i>Bacillus anthracis</i> sp	
Beta-lactamasa de <i>Bacillus licheniformis</i> PenP	Asp (D)
Beta-lactamasa de <i>Bacillus cereus</i> 569/H tipo 3	
Beta-lactamasa de <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	
Beta-lactamasa de <i>Bacillus clausii</i>	
Beta-lactamasa de <i>Staphylococcus aureus</i> PC1	
Beta-lactamasas Sme-1 NmCA IMI-1	
Enzimas CTX-M	Arg (R)
Beta-lactamasas PER-1, VEB-1, CME-1	Glu (E)

Ahora, en la presente divulgación, las beta-lactamasas que comprenden una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 (derivado PenP de *Bacillus licheniformis*, es decir, derivado P1A) y que tiene un residuo aminoacídico hidrófilo en una posición de la SEQ ID NO: 1 correspondiente a la posición 276 de acuerdo con la clasificación de Ambler, muestran un espectro de beta-lactama extendido, así como mejores efectos catalíticos sobre las beta-lactamas.

Anteriormente, la función de las sustituciones aminoacídicas de ácido aspártico (D) en la posición 276 en la resistencia a los inhibidores de serina beta-lactamasa o en las propiedades catalíticas a diversas beta-lactamas no se había estudiado entre beta-lactamasas de *Bacillus* spp., específicamente beta-lactamasa de *B. licheniformis*.

Como se usa en el presente documento, el residuo aminoacídico 276 de acuerdo con la clasificación de Ambler corresponde a la posición aminoacídica 243 de la SEQ ID NO: 1 y la posición aminoacídica 249 de la SEQ ID NO: 3.

Típicamente, las beta-lactamasas de la presente invención tienen un aminoácido hidrófilo en una posición correspondiente a la posición 276 de la clasificación de Ambler distinto de ácido aspártico (D). Los aminoácidos se clasifican en base a las propiedades químicas y/o estructurales de sus cadenas laterales. Los grupos de clasificación de aminoácidos incluyen aminoácidos hidrófilos, que se dividen en los siguientes grupos: aminoácidos hidrófilos polares y cargados positivamente; aminoácidos hidrófilos polares y de carga neutra; aminoácidos hidrófilos polares y cargados negativamente; aminoácidos hidrófilos aromáticos, polares y cargados positivamente. Como se usa en el presente documento, "aminoácido hidrófilo" incluye todos los grupos de aminoácidos hidrófilos que se han mencionado anteriormente, es decir, se refiere a aminoácidos hidrófilos polares y cargados positivamente, a aminoácidos hidrófilos polares y de carga neutra, a aminoácidos hidrófilos polares y cargados negativamente y/o a aminoácidos hidrófilos aromáticos, polares y cargados positivamente (<http://www.biomed.curtin.edu.au/biochem/tutorials/AAs/AA.html>). "Un aminoácido hidrófilo polar y cargado positivamente" se refiere a arginina (R) o lisina (K). "Un aminoácido hidrófilo polar y de carga neutra" se refiere a asparagina (N), glutamina (Q), serina (S) o treonina (T). "Un aminoácido hidrófilo polar y cargado negativamente" se refiere a aspartato (D) o glutamato (E). "Un aminoácido hidrófilo aromático, polar y cargado positivamente" se refiere a histidina (H).

En una realización de la invención, el aminoácido hidrófilo es un aminoácido hidrófilo neutro o cargado positivamente seleccionado del grupo que consiste en arginina (R), histidina (H), lisina (K), asparagina (N), glutamina (Q), serina (S) y treonina (T) en una posición de la Seq ID No 1 correspondiente a la posición 276 de acuerdo con la clasificación de Ambler.

En una realización preferida de la invención, el aminoácido hidrófilo de la beta-lactamasa en una posición de la SEQ ID NO: 1 correspondiente a la posición 276 de acuerdo con la clasificación de Ambler se selecciona de entre aminoácidos hidrófilos polares y cargados positivamente del grupo que consiste en arginina (R), histidina (H) y lisina (K). Mucho más preferiblemente, el aminoácido en la posición de la SEQ ID NO: 1 correspondiente a la posición 276 de acuerdo con la clasificación de Ambler es arginina.

En otra realización preferida de la invención, el aminoácido hidrófilo se selecciona de entre aminoácidos hidrófilos polares y de carga neutra del grupo que consiste en asparagina (N), glutamina (Q), serina (S) y treonina (T). Mucho más preferiblemente, el aminoácido en la posición de la SEQ ID NO: 1 correspondiente a la posición 276 es asparagina.

En una realización preferida adicional de la invención, el aminoácido hidrófilo en la posición de la SEQ ID NO: 1 correspondiente a la posición 276 se sitúa en una hélice alfa. Una hélice alfa es un motivo de estructura secundaria proteica, parecido a una conformación en espiral. Las hélices alfa pueden tener un significado particular en los motivos de unión a ADN (por ejemplo, motivos hélice-giro-hélice, de cremallera de leucina y dedo de cinc). En una realización preferida de la invención, el residuo aminoacídico 276 se localiza al final de la hélice alfa<sub>11</sub> (figura 1). Esta hélice alfa<sub>11</sub> no se conserva entre las beta-lactamasas de clase A.

#### Características específicas de las beta-lactamasas de clase A

Una característica específica de las beta-lactamasas de clase A es un grupo guanidinio de Arg278. Las enzimas CTX-M tienen Arg278, Arg244 o Arg220, que se encuentra en posiciones equivalentes en las estructuras tridimensionales. Se muestra que la arginina en la posición 220 o 244 es esencial para las propiedades catalíticas de beta-lactamasa TEM-1 (Leu220 y Arg244) y de *Streptococcus albus* G (Arg220 y Asn244). Se propone un grupo

guanidinio básico de arginina 244 o arginina 220 para contribuir a la unión de beta-lactama o la química de inactivación de los inhibidores "suicidas", tal como ácido clavulánico (Matagne y col., 1998, Biochem J. 330: 582-598; Perez-Llarena y col., 2008, J Antimicrobiol Chemother, 61: 792-797). En *B. licheniformis* PenP, el residuo Arg-244 forma un enlace de sal con ácido aspártico 276 (Herzberg, O. 1991, J Mol Biol. 217: 701-719; Knox, J.R., y P.C. Moews, 1991, J Mol Biol. 220: 435-555).

En una realización preferida de la invención, la beta-lactamasa comprende adicionalmente al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu220 y Arg244 de acuerdo con la clasificación de Ambler, que corresponde a Leu189 y Arg212, respectivamente de la SEQ ID NO: 1.

10

### Beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis* (PenP, P1A)

La beta-lactamasa de la invención se origina a partir de la cepa 749/C de *Bacillus licheniformis*. La beta-lactamasa de *B. licheniformis* 749/C (PenP; penicilina amido-beta-lactamhidrolasa, EC3.5.2.6) pertenece a un subgrupo 2a en la clasificación funcional de beta-lactamasas de clase A (Bush K. y col., 1995, Antimicrob Agents Chemother 39: 1211-1233). La beta-lactamasa de *B. licheniformis* puede considerarse como una penicilinas, que tiene una elevada capacidad hidrolítica para degradar, por ejemplo, penicilina, ampicilina, amoxicilina o piperacilina, y se inhibe generalmente por los inhibidores de beta-lactamasa dirigidos al sitio activo, tales como ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam (Bush K. y col., 1995, Antimicrob Agents Chemother. 39: 1211-1233).

20

La beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis* 749/C se expresa como una pre-proteína de 307 residuos aminoácidos. Después de la traslocación y la eliminación de su secuencia señal de 26 residuos aminoácidos de largo, se convierte en una lipoproteína anclada a membrana en la que la cisteína aminoterminal (C27) forma un enlace tioéter con una diacilglisérída. La beta-lactamasa de *B. licheniformis* también se encuentra como formas secretadas (extracelulares) que son productos proteolíticos de la forma de lipoproteína (Izui K. y col., 1980, Biochemistry 19: 1882-1886; Matagne A. y col., 1991, Biochem J, 273: 503-510). La región del gen de beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis* 749/C que codifica la forma secretada pequeña (forma exo pequeña; P1A) de los residuos aminoácidos 43-307 se ha escogido como un fragmento de ADN para la adaptación del sistema de producción de *Bacillus subtilis* del vector huésped (documento WO 2008065247).

30

### Función

Las beta-lactamasas hidrolizan los antibióticos betalactámicos que comprenden un anillo beta-lactámico, tales como penicilinas, cefalosporinas, clavamas (u oxapenamas), cefamicinas y carbapenemas. En una realización preferida de la invención, la beta-lactamasa hidroliza penicilinas y/o cefalosporinas. Las "penicilinas" se refieren a varias variantes naturales o semisintéticas de penicilina, que se obtienen originariamente de *Penicillium*. Las penicilinas incluyen, pero sin limitación, amoxicilina, ampicilina, azlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, hetacilina, oxacilina, mezlocilina, penicilina G, penicilina V, y piperacilina.

En las cefalosporinas, el anillo beta-lactámico se condensa con un anillo dihidrotiazina de seis miembros en lugar de con el anillo tiazolidina de cinco miembros encontrado en las penicilinas. En base a su actividad biológica, las cefalosporinas se dividen en seis generaciones, pero algunas cefalosporinas no se han agrupado en una generación particular. En una realización específica de la invención, la beta-lactamasa tiene una mejor eficiencia catalítica sobre las cefalosporinas en comparación con las beta-lactamasas de tipo silvestre. De acuerdo con la presente invención, la beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, en la que el ácido aspártico (Asp, D) en la posición 276, numerado de acuerdo con la clasificación de Ambler, está sustituido con un residuo aminoácido hidrófilo, tal como una asparagina (N) o arginina (R), muestra una actividad extendida a antibióticos betalactámicos, tales como cefalosporinas.

En una realización de la invención, las cefalosporinas se seleccionan del grupo que consiste en cefoperazona, ceftriaxona y cefazolina.

Como se usa en el presente documento, la eficiencia catalítica de las beta-lactamasas se refiere a la capacidad para hidrolizar antibióticos betalactámicos. La eficiencia catalítica mejorada puede medirse mediante cualquier método *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* convencional a partir de cualquier muestra biológica o un sujeto.

### Métodos para producir y modificar beta-lactamasas

La beta-lactamasa de la invención puede producirse modificando la enzima con cualquier método convencional de

ingeniería genética. Pueden utilizarse en la producción métodos, tales como diseño racional, mutagénesis aleatoria, barajado de ADN (recombinación aleatoria), visualización de fagos, barajado del genoma completo, heteroduplexación, quimeragénesis aleatoria en un conjunto de plantillas transitorias de oligonucleótidos diseñados, reensamblado mutagénico y unidireccional, barajado de exones, barajado de bloqueo basado en ligadura Y, 5 recombinación no homóloga, diseño racional de combinación con evolución dirigida. Además, las enzimas mutantes pueden obtenerse empleando mutagénesis dirigida a sitio y splicing mediante técnicas de extensión de solapamiento.

En una realización de la divulgación, un método de modificación de una beta-lactamasa comprende una etapa de 10 modificar la beta-lactamasa que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 reemplazando un aminoácido en una posición de la SEQ ID NO: 1 correspondiente a la posición 276 de acuerdo con la clasificación de Ambler con un aminoácido hidrófilo. El aminoácido hidrófilo puede ser cualquier aminoácido hidrófilo, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en arginina (R), histidina (H), lisina (K), asparagina (N), glutamina (Q), serina (S) y treonina (T).

15 En una realización de la invención, un aminoácido no hidrófilo se reemplaza con un aminoácido hidrófilo en una posición de la SEQ ID NO: 1 correspondiente a la posición 276 de acuerdo con la clasificación de Ambler.

La beta-lactamasa de la invención también puede producirse, por ejemplo, mediante métodos sintéticos, por 20 ejemplo, síntesis peptídica, o por producción recombinante en una célula huésped. En una realización preferida de la invención, la enzima es recombinante. Como se usa en el presente documento, material genético "recombinante" se refiere a un material, que es típicamente una combinación de material genético, por ejemplo, hebras de ADN de diverso origen, y se ha producido combinando o insertando las secuencias. El polinucleótido de la invención puede insertarse, por ejemplo, bajo el control de cualquier regulador endógeno o exógeno, tales como promotores. La 25 proteína recombinante se obtiene a partir del ADN recombinante.

Puede aislarse al menos un polinucleótido o fragmento polinucleotídico de interés de una célula o producirse 30 sintéticamente. Este polinucleótido o fragmento polinucleotídico puede transformarse en una célula huésped. Una célula huésped adecuada para la producción de cualquier péptido de la invención puede ser cualquier célula eucariota o procariota, preferiblemente bacterias, mucho más preferiblemente la cepa *Bacillus* spp., tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilis*, o *Bacillus amyloliquefaciens*.

Como se usa en el presente documento, "transformación" se refiere a una alteración genética de una célula por 35 material genético foráneo, preferiblemente ADN, dando como resultado la expresión de este material genético. El material genético foráneo puede introducirse como tal o según se incorpora en cualquier otro material genético, tal como vectores, plásmidos, etc. Puede usarse cualquier método de ingeniería genética o cualquier método de clonación molecular, para transformar una célula huésped con el polinucleótido de la invención. Existen diversos métodos de introducción del material foráneo en una célula eucariota. Se han usado materiales, tales como polímeros (por ejemplo, DEAE-dextrano o polietilenimina), liposomas y nanopartículas (por ejemplo, oro) como 40 vehículos para la transformación. El material genético también puede introducirse en las células usando, por ejemplo, virus o vectores como vehículos. Otros métodos para introducir material foráneo en una célula incluye, pero sin limitación, nucleofección, electroporación, conjugación, transfección, sonoporación, choque térmico y magnetofección.

45 Después de que una célula huésped haya producido el péptido de la invención en las condiciones apropiadas, el péptido puede purificarse, por ejemplo, de la célula o puede recuperarse una forma secretada del péptido, por ejemplo, del medio de cultivo. En una realización preferida de la invención, la beta-lactamasa se secreta.

### Composición farmacéutica

50 La composición farmacéutica de la invención comprende la beta-lactamasa de la invención. La composición puede comprender únicamente una beta-lactamasa o más, tal como al menos dos, tres, cuatro, etc. beta-lactamasas diferentes.

55 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden comprender cualquier otro principio activo en lugar de las beta-lactamasas de la invención.

Las composiciones farmacéuticas pueden usarse, por ejemplo, en forma sólida, semisólida o líquida, tal como en forma de comprimidos, gránulos, cápsulas, soluciones, emulsiones o suspensiones. Preferiblemente, la composición

es para administración oral o para administración enteral.

Además de al menos una beta-lactamasa de la invención o polinucleótidos o células huésped que comprenden los polinucleótidos de la invención, la composición farmacéutica puede comprender uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, adyuvantes, excipientes, excipientes auxiliares, antisépticos, agentes estabilizantes, agentes de unión, agentes de carga, agentes lubricantes, agentes de suspensión, plastificantes, colorantes, formadores de película, azúcar, alcoholes, agentes emolientes y agentes diluyentes y/o componentes que se encuentran normalmente en los productos correspondientes.

10 El producto o composición farmacéutica de la invención comprende las beta-lactamasas en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado.

Los productos o composiciones farmacéuticas pueden fabricarse mediante cualquier proceso convencional conocido en la técnica. Las beta-lactamasas pueden añadirse a cualquier producto farmacéutico o mezclarse con cualquier agente durante cualquier etapa de preparación. La beta-lactamasa de la invención también puede producirse, por ejemplo, expresando el gen beta-lactamasa en condiciones apropiadas en un producto farmacéutico o en el tejido diana después de la degradación del producto farmacéutico.

En una realización preferida de la invención, la beta-lactamasa o beta-lactamasas y el antibiótico betalactámico se administran juntos en forma de un gránulo con revestimiento entérico a un sujeto. Las formas de revestimiento de base acuosa parecen ser los materiales más favorables para los procesos de revestimiento de la proteína P1A hidrófila. Los polímeros acuosos usados habitualmente para conseguir propiedades entéricas, y también útiles en la presente invención, son los polimetacrilatos, tales como Eudragit®, polímeros a base de celulosa, por ejemplo, éteres de celulosa, por ejemplo, Duodcell®, o ésteres de celulosa, por ejemplo, Aquateric®, o copolímeros de polivinilo, por ejemplo, Opadry®.

La beta-lactamasa de la invención, o una composición farmacéutica de la invención, puede administrarse a un sujeto simultánea o secuencialmente con un antibiótico betalactámico. En una realización de la invención, la beta-lactamasa o la composición farmacéutica se administra antes de un antibiótico betalactámico, por ejemplo, de 5 a 30 minutos antes de un antibiótico betalactámico. La beta-lactamasa y un antibiótico/antibióticos betalactámicos pueden estar en la misma formulación o en diferentes formulaciones.

#### **Efectos adversos de las beta-lactamas y tratamientos**

35 Los efectos adversos, es decir, reacciones farmacológicas adversas para los antibióticos betalactámicos, pueden incluir, pero sin limitación, diarrea, náuseas, erupción cutánea, urticaria, sobreinfección, fiebre, vómitos, eritema, dermatitis, angioedema y colitis pseudo-membranosa.

En una realización preferida de la invención, los efectos adversos a tratar o prevenir se producen en el tracto gastrointestinal (GIT). Como se usa en el presente documento, tracto gastrointestinal se refiere a estructuras digestivas que se extienden desde la boca hasta el ano. El tracto gastrointestinal comprende la boca, el esófago, el estómago, el duodeno, el yeyuno, el íleon, el intestino delgado, el colon, el ciego, el recto y el ano.

La beta-lactamasa de la invención, o la composición farmacéutica de la invención, puede administrarse a un sujeto por vía oral o directamente en el tracto gastrointestinal. El producto o productos farmacológicos de las combinaciones enzimáticas están diseñados para inactivar la beta-lactama no absorbida en el GIT o en otros compartimentos corporales no deseados, tal como la piel o la cavidad vaginal. La composición farmacéutica puede ser un producto farmacológico administrado por vía oral, una formulación dermatológica, o un supositorio vaginal, y puede comprender formulaciones de dosificación líquida, de liberación inmediata, retardada o sostenida.

En una realización preferida de la invención, la beta-lactamasa o beta-lactamasas se administran por vía oral. En otra realización preferida de la invención, la beta-lactamasa o beta-lactamasas se administran directamente en el gastro-intestino de un paciente.

55 Un sujeto tratado puede ser un hombre o un animal, tal como una mascota o animal de producción, por ejemplo, un perro, gato, vaca, cerdo, pollo o caballo. En una realización preferida de la invención, el sujeto es un hombre.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes de ningún modo.

**Ejemplo 1. Construcción de las enzimas mutantes D276N y D276R**

Los mutantes D276N y D276R de beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis* se construyeron por mutagénesis de splicing de extensión por solapamiento (SOE) usando el plásmido pRSH10 que codifica la beta-lactamasa P1A como una plantilla para las reacciones PCR iniciales de acuerdo con los procedimientos publicados previamente (Horton R.M. y col., 1989, Gene 77: 61-68). Se diseñaron cebadores para proporcionar dos productos de PCR diferentes con una región de secuencia común. Después, los fragmentos se fusionaron en una amplificación por PCR posterior con la ayuda de regiones solapantes. Las mutaciones deseadas se consiguieron usando cebadores mutagénicos en PCR inicial.

Para el mutante D276N, la mutación se hizo en la posición deseada en el gel de tipo silvestre, convirtiendo un codón GAT en un codón AAT. Los cebadores utilizados en las primeras amplificaciones por PCR se presentan en la Tabla 2. El tamaño de los fragmentos amplificados en la primera PCR fue de 800 nt y 220 nt, que tienen una región solapante de 21 nt de largo.

**Tabla 2. Cebadores PCR oligonucleotídicos. Las regiones complementarias están sombreadas y los codones mutados se expresan en negrita. Se usaron los cebadores directo-1 e inverso-1 en la amplificación de un fragmento condensado en la segunda PCR.**

Tamaño del fragmento PCR (nt)	Cebadores oligonucleotídicos
800	Directo-1: 5'-CGA TTG TTT GAG AAA AGA -3' (SEQ ID NO: 5)
	D276N inverso: 5'-AAT AAG TTT <b>ATT</b> ATC ATA CTT GGC GTC CT-3' (SEQ ID NO: 6)
	D276R inverso: 5'-AAT AAG TTT <b>GCG</b> ATC ATA CTT GGC GTC CT-3' (SEQ ID NO: 7)
220	D276N directo: 5'-AAG TAT GAT <b>AAT</b> AAA CTT ATT GCA GAG G-3' (SEQ ID NO: 8)
	D276R directo: 5'-AAG TAT GAT <b>CGC</b> AAA CTT ATT GCA GAG G-3' (SEQ ID NO: 9)
	Inverso-1: 5-GTA TTT GTC ACA CCT GAT G-3' (SEQ ID NO: 10)

En la segunda reacción por PCR (reacción SOE), los dos fragmentos solapantes se fusionaron juntos en una reacción de extensión posterior. La inclusión de los cebadores externos (Directo-1 e Inverso-1) en la reacción de extensión amplifica el producto fusionado por PCR. El producto SOE purificado se digirió con la enzima de restricción *Hind*III y se ligó al vector de secreción pKTH141 escindido por *Hind*III como se describe en el documento WO 2008/065247.

Las células competentes de *Bacillus subtilis* RS303 se transformaron con una mezcla de ligadura. Los clones positivos en las placas de Luria-canamicina se cribaron suspendiendo masa bacteriana de una única colonia en una solución de nitrocefina. Los clones positivos hidrolizaron eficazmente la nitrocefina volviendo el color de la solución de nitrocefina de amarillo a rojo. El plásmido híbrido se purificó de las células en un único clon. La secuencia correcta de la región generada por PCR se verificó por secuenciación de ADN.

Para el mutante D276R, la mutación se hizo en la posición deseada convirtiendo un codón GAT en un codón CGC. La construcción de la cepa mutante D276R se realizó de forma similar a la del mutante D276N, excepto que se usaron los cebadores D276R inverso y D276R directo en la PCR inicial (véase la Tabla 2).

**Ejemplo 2. Secuencia nucleotídica del gen de beta-lactamasa mutante D276N (penP)**

La construcción de expresión se aisló de un clon positivo y la inserción se sometió a secuenciación de ADN. La secuencia nucleotídica completa y las secuencias aminoácidas deducidas del gen beta-lactamasa mutante D276N revelaron que se ha producido una sustitución de Asp por Asn correctamente en el codón deseado (figura 2). Además, la secuencia de ADN del gen beta-lactamasa mutante D276N reveló una fusión de marco entre la secuencia nucleotídica que codifica una secuencia señal de 31 aminoácidos de largo de *Bacillus amyloliquefaciens* alfa amilasa, el sitio de clonación *Hind*III y la secuencia completa del gen mutante D276N. Se predice la peptidasa señal para cortar el enlace peptídico entre la alanina (A) en la posición de -1 y la glutamina (Q) en la posición de +1. La beta-lactamasa D276N madura posee una extensión NH<sub>2</sub>-terminal de un tripéptido de NH<sub>2</sub>-QAS obtenida a partir del sitio de clonación *Hind* III en la construcción de expresión. Por lo tanto, en base a la secuencia aminoácida deducida, la beta-lactamasa mutante D276N madura está compuesta por 268 residuos aminoácidos.

**Ejemplo 3. Secuencia nucleotídica del gen de beta-lactamasa mutante D276R (penP)**

5 Para confirmar la sustitución deseada de ácido aspártico por arginina en la posición 276 (clasificación de Ambler) en el gen beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, la construcción de expresión se aisló de un clon positivo y la secuencia nucleotídica de la inserción se secuenció de manera similar al ejemplo 2. De acuerdo con la secuencia nucleotídica obtenida, la secuencia aminoacídica deducida contiene la sustitución D276R deseada y la enzima mutante D276R madura está compuesta por 268 residuos aminoacídicos (figura 3).

**10 Ejemplo 4. Análisis bioquímico de la beta-lactamasa mutante D276N (P3A)**

La pureza del preparado enzimático se estimó en más del 95 por ciento por análisis SDS-PAGE (datos no mostrados).

15 Los parámetros cinéticos de las beta-lactamasas de tipo silvestre (P1A) y D276N (P3A) mutantes de *B. licheniformis* se determinaron para la hidrólisis de diversos tipos de beta-lactamas y se resumen en la Tabla 3. Las reacciones enzimáticas se realizaron en tampón fosfato 20 mM (pH 7) a 30 °C usando una concentración enzimática apropiada y diversas concentraciones de sustratos de penicilina o cefalosporina. Los valores  $k_{cat}$  y  $K_m$  se obtuvieron con la ayuda del método de linealización de Hanes. Los resultados principales se describen a continuación.

20

**(i) Penicilinas**

El efecto de la sustitución D276N en la hidrólisis de las penicilinas (ampicilina, amoxicilina o piperacilina) no fue drástico con eficiencias enzimáticas del 51-80 por ciento de las de la enzima de tipo silvestre. En consecuencia, los valores  $k_{cat}/K_m$  de la enzima mutante D276N para las penicilinas se redujeron como un máximo de dos veces o menos.

25

**(ii) Cefalosporinas**

30 Como se esperaba, relacionada con las penicilinas, la beta-lactamasa de tipo silvestre tenía eficiencias enzimáticas deficientes para diversas cefalosporinas, incluyendo las cefalosporinas de la primera (cafazolina), la segunda (cefuroxima), y la tercera generación (ceftriaxona, cefotaxima, ceftadizima, cefoperazona y cefepima) (Tabla 1). Sorprendentemente, las eficiencias enzimáticas de la enzima mutante D276N para ciertas cefalosporinas, preferiblemente para cefoperazona y, más preferiblemente para ceftriaxona, se mejoraron básicamente en comparación con las obtenidas con las enzimas de tipo silvestre. Las constantes  $K_m$  para ceftriaxona y cefoperazona se disminuyeron y, de forma concomitante, el número de rotación ( $k_{cat}$ ) para ceftriaxona y cefoperazona se aumentó en comparación con el de la enzima de tipo silvestre (P1A). Por lo tanto, el ácido aspártico - sustitución de asparagina en la posición 276 de la beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, contribuye a la extensión del perfil de sustrato de la beta-lactama en la beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*.

40

**Tabla 3. Parámetros cinéticos para la hidrólisis de sustratos de beta-lactama mediante enzimas de tipo silvestre (P1A) y mutantes D276N de beta-lactamasas de *Bacillus licheniformis*.**

Beta-lactama	Beta-lactamasa de tipo silvestre (P1A)			Mutante D276N			Eficiencias catalíticas relativas (%) <sup>(1)</sup>
	K <sub>m</sub> (μM)	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (μM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	K <sub>m</sub> (μM)	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (μM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	
Ampicilina	157	3369	21,45	161	2160	13,42	63
Piperacilina	49	939	19,16	53	816	15,40	80
Amoxicilina	119	2956	24,84	219	2789	12,74	51
Ceftriaxona	400	0,045	0,00013	38	83	2,18	1676923
Cefotaxima	363	246	0,67	213	36	0,17	25
Ceftadizima	0	0	0	1505	2,74	0,0018	
Cefepima	0	0	0	1357	133	0,1	
Cefazolina	22	93	4,22	37	192	5,19	123
Cefoperazona	7	10	1,43	2	17	8,2	573
Cefuroxima	107	233	2,18	277	35	0,13	6

<sup>(1)</sup> Eficiencia catalítica relativa (k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>) de D276N en comparación con la de la enzima de tipo silvestre (P1A).

5

#### Ejemplo 5. Caracterización bioquímica de la enzima mutante D276R

La enzima mutante D276R se construyó para evaluar si Asp-276 tolera sustituciones y evalúa la contribución de la sustitución D276R a la extensión de la actividad de beta-lactamasa observada en la enzima D276N.

10

Las muestras de enzimas en bruto de D276R y D276N obtenidas de los sobrenadantes de cultivo, se emplearon como materiales de ensayo. La pureza y la cantidad de muestras de enzimas se estimaron realizando análisis SDS-PAGE. La tasa de hidrólisis de las enzimas mutantes D276R y D276N para diversas beta-lactamas se realizó determinando los valores V<sub>máx</sub>. Los resultados obtenidos se presentan como actividades relativas (%) en comparación con los de la enzima D276N en la Tabla 4.

15

En general, las eficiencias catalíticas de la beta-lactamasa D276R tanto para las penicilinas como para las cefalosporinas son comparables con las de la enzima D276N. En comparación con la enzima D276N, la enzima D276R tiene una actividad reducida para la ceftriaxona y una actividad mejorada para la cefoperazona. Este estudio mostró que el espectro extendido de las beta-lactamas puede conseguirse sustituyendo un residuo aminoacídico hidrófilo, tal como arginina o asparagina para ácido aspártico en la posición 276 en la beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*. También indica que puede conseguirse una modificación enzimática deseada sustituyendo otro residuo aminoacídico hidrófilo tal como glutamina (Q), lisina (K), serina (S) o treonina (T), por ácido aspártico en la posición 276.

20

25

**Tabla 4. Actividades relativas (%) de la enzima mutante D276R en comparación con las de la enzima mutante D276N**

Beta-lactama	Actividades relativas
Ampicilina	82
Piperacilina	84
Amoxicilina	71
Ceftriaxona	50
Cefotaxima	105
Ceftadizima	-
Cefepima	74
Cefazolina	84
Cefoperazona	232
Cefuroxima	99

#### 30 Ejemplo 6. Estudio *in vivo* de la beta-lactamasa D276N

La capacidad de la enzima beta-lactamasa mutante D276N de *Bacillus licheniformis* para inactivar la ceftriaxona

(CRO) que se ha excretado en el tracto gastrointestinal durante la terapia parenteral se investigó en un modelo de perro. Los beagles de laboratorio del estudio tienen una válvula tipo espiga insertada quirúrgicamente en el yeyuno aproximadamente 170 cm distal al píloro que permite la recogida de muestras para el análisis. La cirugía intestinal no alteró la motilidad intestinal. Se utilizaron cinco perros beagle en cada experimento.

5

El estudio se realizó como dos tratamientos secuenciales: En el primer tratamiento (experimento de control sin terapia de beta-lactamasa), se administró por vía intravenosa una única dosis de ceftriaxona (30 mg de ceftriaxona (CRO) por kg de peso corporal que corresponde a aproximadamente 1 gramo de dosis de CRO en seres humanos) 20 minutos después de la primera alimentación de los perros. Se recogieron muestras yeyunales en diversos puntos temporales durante diez horas. Los perros se alimentaron de nuevo cinco y cuarenta minutos después de la administración de ceftriaxona para inducir la excreción biliar de la ceftriaxona acumulada en la vesícula biliar.

10

Las muestras de bolo alimenticio yeyunal se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -20 °C para esperar el análisis. Las muestras de bolo alimenticio se trataron previamente con ácido perclórico-cítrico para precipitar las sustancias interferentes. Los precipitados se eliminaron por centrifugación. Se usó un método de cromatografía de alta presión de fase inversa con detección UV para la cuantificación de ceftriaxona en los sobrenadantes.

15

En el segundo tratamiento, la beta-lactamasa mutante D276N se proporcionó como gránulos con revestimiento entérico cargados en cápsulas de gelatina dura 10 minutos antes de la inyección de ceftriaxona. Las formas de dosificación de revestimiento entérico son comunes entre los productos orales en la industria farmacéutica. Los productos farmacológicos con revestimiento entérico están diseñados para desviarse al estómago como una forma intacta y para liberar el contenido de la forma de dosificación en el intestino delgado. Las razones de la aplicación de formulaciones sólidas entéricas son proteger la sustancia farmacológica de la acción destructora de las enzimas o el entorno de bajo pH del estómago o prevenir la irritación inducida por la sustancia farmacológica de la mucosa gástrica, las náuseas o una hemorragia, o administrar la sustancia farmacológica en forma sin diluir en un sitio diana en el intestino delgado. En base a estos criterios, los productos farmacológicos con revestimiento entérico pueden considerarse como un tipo de formas de dosificación de acción retardada. Se empleó el copolímero de ácido polimetacrílico Eudragit® L 30 D-55 para conseguir una forma de dosificación con revestimiento entérico dependiente de pH. En el segundo tratamiento se usó una única dosis de gránulos con revestimiento entérico que contenían aproximadamente 0,44 mg de beta-lactamasa D276N activa por kg de peso corporal.

20

25

30

Los resultados obtenidos de ambos tratamientos se presentan en la figura 4. El tratamiento 1 mostró que se excretaron altas concentraciones de ceftriaxona en el tracto del intestino delgado durante la terapia con ceftriaxona parenteral. La concentración yeyunal más alta (aproximadamente 1500 microgramos por gramo de bolo alimenticio yeyunal) se encontró 60 minutos después de la inyección de ceftriaxona. Los niveles de ceftriaxona yeyunal aumentados se observaron después de la segunda alimentación de los perros (en el punto temporal de 340 minutos) que indica una acumulación de excreción de bilis que contiene ceftriaxona estimulada por el alimento en la vesícula biliar.

35

El tratamiento 2 mostró que la beta-lactamasa mutante D276N administrada por vía oral es capaz de reducir los niveles de ceftriaxona yeyunal cerca del límite de cuantificación (10 microgramos de ceftriaxona por microgramo de bolo alimenticio yeyunal). Este hallazgo muestra que la beta-lactamasa mutante D276N es un potente candidato de sustancia farmacológica para reducir los efectos secundarios relacionados con un uso de ceftriaxona parenteral. Además, en base a las elevadas actividades de las penicilinas, tales como ampicilina, amoxicilina y piperacilina, las enzimas mutantes D276N o D276R pueden usarse como una sustancia farmacológica alternativa en la terapia con beta-lactamasas descrita en el documento WO 2008065247.

40

45

#### LISTA DE SECUENCIAS

50 &lt;110&gt; PrevAb

&lt;120&gt; Beta-lactamasas modificadas y métodos y usos relacionados con las mismas

&lt;130&gt; 2081907FI

55

&lt;160&gt; 10

&lt;170&gt; PatentIn versión 3.3

<210> 1  
 <211> 258  
 <212> PRT  
 <213> Bacillus licheniformis

5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (243)..(243)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10

<400> 1

```

Met Lys Asp Asp Phe Ala Lys Leu Glu Glu Gln Phe Asp Ala Lys Leu
 1          5          10          15

Gly Ile Phe Ala Leu Asp Thr Gly Thr Asn Arg Thr Val Ala Tyr Arg
 20          25          30

Pro Asp Glu Arg Phe Ala Phe Ala Ser Thr Ile Lys Ala Leu Thr Val
 35          40          45

Gly Val Leu Leu Gln Gln Lys Ser Ile Glu Asp Leu Asn Gln Arg Ile
 50          55          60

Thr Tyr Thr Arg Asp Asp Leu Val Asn Tyr Asn Pro Ile Thr Glu Lys
 65          70          75          80

His Val Asp Thr Gly Met Thr Leu Lys Glu Leu Ala Asp Ala Ser Leu
 85          90          95

Arg Tyr Ser Asp Asn Ala Ala Gln Asn Leu Ile Leu Lys Gln Ile Gly
 100         105         110

Gly Pro Glu Ser Leu Lys Lys Glu Leu Arg Lys Ile Gly Asp Glu Val
 115         120         125

Thr Asn Pro Glu Arg Phe Glu Pro Glu Leu Asn Glu Val Asn Pro Gly
 130         135         140

Glu Thr Gln Asp Thr Ser Thr Ala Arg Ala Leu Val Thr Ser Leu Arg
 145         150         155         160
    
```

Ala Phe Ala Leu Glu Asp Lys Leu Pro Ser Glu Lys Arg Glu Leu Leu  
 165 170 175

Ile Asp Trp Met Lys Arg Asn Thr Thr Gly Asp Ala Leu Ile Arg Ala  
 180 185 190

Gly Val Pro Asp Gly Trp Glu Val Ala Asp Lys Thr Gly Ala Ala Ser  
 195 200 205

Tyr Gly Thr Arg Asn Asp Ile Ala Ile Ile Trp Pro Pro Lys Gly Asp  
 210 215 220

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

Tyr Asp Xaa Lys Leu Ile Ala Glu Ala Thr Lys Val Val Met Lys Ala  
 245 250 255

Leu Asn

<210> 2

<211> 774

5 <212> ADN

<213> Bacillus licheniformis

<220>

<221> misc\_feature

10 <222> (727)..(729)

<223> n e s a , c , g o t

<400> 2

ES 2 588 279 T3

atgaaagatg attttgcaaa acttgaggaa caatttgatg caaaactcgg gatctttgca 60  
 ttggatacag gtacaaaccg gacggtagcg tatcggccgg atgagcgttt tgcttttgct 120  
 tcgacgatta aggctttaac tgtaggcgtg cttttgcaac agaaatcaat agaagatctg 180  
 aaccagagaa taacatatac acgtgatgat cttgtaaact acaaccgat tacggaaaag 240  
 cacgttgata cgggaatgac gctcaaagag cttgcggatg cttcgcttcg atatagtgac 300  
 aatgcggcac agaatctcat tcttaacaa attggcggac ctgaaagttt gaaaaaggaa 360  
 ctgaggaaga ttggtgatga ggttacaat cccgaacgat tcgaaccaga gttaaatgaa 420  
 gtgaatccgg gtgaaactca ggataccagt acagcaagag cacttgtcac aagccttoga 480  
 gcctttgctc ttgaagataa acttccaagt gaaaaacgcg agcttttaat cgattggatg 540  
 aaacgaaata ccaactggaga cgccttaatc cgtgccggtg tgccggacgg ttgggaagtg 600  
 gctgataaaa ctggagcggc atcatatgga acccggaatg acattgccat catttgccg 660  
 ccaaaaggag atcctgtcgt tcttgcaagta ttatccagca gggataaaaa ggacgccaag 720  
 tatgatnna aacttattgc agaggcaaca aaggtggtaa tgaaagcctt aaac 774

<210> 3

<211> 299

5 <212> PRT

<213> Bacillus licheniformis

<220>

<221> mat\_peptide

10 <222> (32)..(299)

<400> 3

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

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

Ala Ser Lys Thr Glu Met Lys Asp Asp Phe Ala Lys Leu Glu Glu Gln  
 5 10 15

Phe Asp Ala Lys Leu Gly Ile Phe Ala Leu Asp Thr Gly Thr Asn Arg  
 20 25 30

Thr Val Ala Tyr Arg Pro Asp Glu Arg Phe Ala Phe Ala Ser Thr Ile  
 35 40 45

Lys Ala Leu Thr Val Gly Val Leu Leu Gln Gln Lys Ser Ile Glu Asp  
 50 55 60 65

Leu Asn Gln Arg Ile Thr Tyr Thr Arg Asp Asp Leu Val Asn Tyr Asn  
 70 75 80

Pro Ile Thr Glu Lys His Val Asp Thr Gly Met Thr Leu Lys Glu Leu  
 85 90 95

Ala Asp Ala Ser Leu Arg Tyr Ser Asp Asn Ala Ala Gln Asn Leu Ile  
 100 105 110

Leu Lys Gln Ile Gly Gly Pro Glu Ser Leu Lys Lys Glu Leu Arg Lys  
 115 120 125

Ile Gly Asp Glu Val Thr Asn Pro Glu Arg Phe Glu Pro Glu Leu Asn  
 130 135 140 145

Glu Val Asn Pro Gly Glu Thr Gln Asp Thr Ser Thr Ala Arg Ala Leu  
 150 155 160

Val Thr Ser Leu Arg Ala Phe Ala Leu Glu Asp Lys Leu Pro Ser Glu  
 165 170 175

ES 2 588 279 T3

Lys Arg Glu Leu Leu Ile Asp Trp Met Lys Arg Asn Thr Thr Gly Asp  
180 185 190

Ala Leu Ile Arg Ala Gly Val Pro Asp Gly Trp Glu Val Ala Asp Lys  
195 200 205

Thr Gly Ala Ala Ser Tyr Gly Thr Arg Asn Asp Ile Ala Ile Ile Trp  
210 215 220 225

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

Lys Lys Asp Ala Lys Tyr Asp Xaa Lys Leu Ile Ala Glu Ala Thr Lys  
245 250 255

Val Val Met Lys Ala Leu Asn Met Asn Gly Lys  
260 265

<210> 4

<211> 900

5 <212> ADN

<213> Bacillus licheniformis

<220>

<221> misc\_feature

10 <222> (838)..(840)

<223> n e s a, c, g o t

<400> 4

atgattcaaa aacgaaagcg gacagtttcg ttcagacttg tgcttatgtg cacgctgtta 60  
 tttgtcagtt tgccgattac aaaaacatca gcgcaagcctt ccaagacgga gatgaaagat 120  
 gattttgcaa aacttgagga acaatttgat gcaaaaactcg ggatccttgc attggataca 180  
 ggtacaaacc ggacggtagc gtatcggccg gatgagcgtt ttgcttttgc ttcgacgatt 240  
 aaggctttta ctgtaggcgt gctttttgcaa cagaaatcaa tagaagatct gaaccagaga 300  
 ataacatata cacgtgatga tcttgtaaac tacaaccgga ttacggaaaa gcacgttgat 360  
 acgggaatga cgctcaaaga gcttgccgat gcttcgcttc gatatagtga caatgcggca 420  
 cagaatctca ttcttaaca aattggcggc cctgaaagt tgaaaaagga actgaggaag 480  
 attggtgatg aggttcaaaa tcccgaacga ttcgaaccag agttaaatga agtgaatccg 540  
 ggtgaaactc aggataccag tacagcaaga gcacttgca caagccttcg agcctttgct 600  
 cttgaagata aacttccaag tgaaaaacgc gagcttttaa tcgattggat gaaacgaaat 660  
 accactggag acgccttaat ccggtccggt gtgccggacg gttgggaagt ggctgataaa 720  
 actggagcgg catcatatgg aaccgggaat gacattgcca tcatttggcc gccaaaagga 780  
 gatcctgtcg ttcttgcaat attatccagc agggataaaa aggacgccaa gtatgatnnn 840  
  
 aaacttattg cagaggcaac aaaggtggta atgaaagcct taaacatgaa cggcaataa 900

5 <210> 5  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> oligonucleótido  
  
 <400> 5

15 cgattgttg agaaaaga 18

<210> 6  
 <211> 29  
 <212> ADN

20 <213> Artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido

25 <400> 6

aataagtta ttatcact tggcgtcct 29

<210> 7

<211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 7  
 10 aataagtttg cgatcact tggcgtct 29  
 <210> 8  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 20 <400> 8  
 aagatgata ataaacttat tgcagagg 28  
 <210> 9  
 25 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 30 <223> oligonucleótido  
 <400> 9  
 aagatgatc gcaaacttat tgcagagg 28  
 35 <210> 10  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 10  
 45 gtatttgca cacctgatg 19

## REIVINDICACIONES

1. Una beta-lactamasa que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, caracterizada por que la beta-lactamasa  
5 tiene un residuo aminoacídico hidrófilo distinto de ácido aspártico (D) en una posición correspondiente a la posición 276 de acuerdo con la clasificación de Ambler y dicho aminoácido hidrófilo se selecciona de entre arginina (R), histidina (H), lisina (K), asparagina (N), glutamina (Q), serina (S) y treonina (T), e
- 10 hidroliza penicilinas y/o cefalosporinas.
2. Un método de modificación de una beta-lactamasa que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, caracterizado por que un aminoácido de la beta-lactamasa en una posición de la SEQ ID NO: 1 correspondiente a la posición 276 de acuerdo con la  
15 clasificación de Ambler se reemplaza con un aminoácido hidrófilo distinto de ácido aspártico (D) y dicho aminoácido hidrófilo se selecciona de entre arginina (R), histidina (H), lisina (K), asparagina (N), glutamina (Q), serina (S) y treonina (T) para obtener una beta-lactamasa que hidroliza penicilinas y/o cefalosporinas.
3. La beta-lactamasa de acuerdo con la reivindicación 1, donde la beta-lactamasa comprende una  
20 secuencia aminoacídica que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1.
4. La beta-lactamasa de acuerdo con la reivindicación 1 o el método de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada por que el aminoácido en la posición de la SEQ ID NO: 1 correspondiente a la posición 276 es  
25 asparagina (N).
5. La beta-lactamasa de acuerdo con la reivindicación 1 o el método de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por que el aminoácido en la posición de la SEQ ID NO: 1 correspondiente a la posición 276 es arginina (R).
- 30 6. La beta-lactamasa, o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que el aminoácido hidrófilo en la posición de la SEQ ID NO: 1 correspondiente a la posición 276 se sitúa en una hélice alfa.
7. La beta-lactamasa, o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores,  
35 caracterizada por que la beta-lactamasa comprende adicionalmente al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu220 y Arg244 de acuerdo con la clasificación de Ambler.
8. La beta-lactamasa, o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la beta-lactamasa tiene una mejor eficiencia catalítica sobre las cefalosporinas en  
40 comparación con la beta-lactamasa de la SEQ ID NO: 1 que tiene ácido aspártico (D) en la posición correspondiente a la posición 276 de la clasificación de Ambler.
9. La beta-lactamasa de acuerdo con la reivindicación 1 o el método de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada por que las cefalosporinas se seleccionan del grupo que consiste en cefoperazona, ceftriaxona y  
45 cefazolina.
10. Un método de producción de la beta-lactamasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-9, caracterizado por que el método comprende las siguientes etapas:
- 50 i) proporcionar un gen que codifica la beta-lactamasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-9;
- ii) transformar una célula huésped con el gen;
- iii) obtener una célula huésped que produce la beta-lactamasa;
- 55 iv) recuperar la beta-lactamasa.
11. Un polinucleótido, caracterizado por que comprende una secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO:s 2 o 4 o una degeneración de la misma, o codifica la beta-lactamasa de acuerdo con una cualquiera de las

reivindicaciones 1 o 3-9.

12. Una célula huésped que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 11.

5 13. Una composición farmacéutica que comprende la beta-lactamasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-9.

14. La beta-lactamasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-9 para su uso como un medicamento.

10

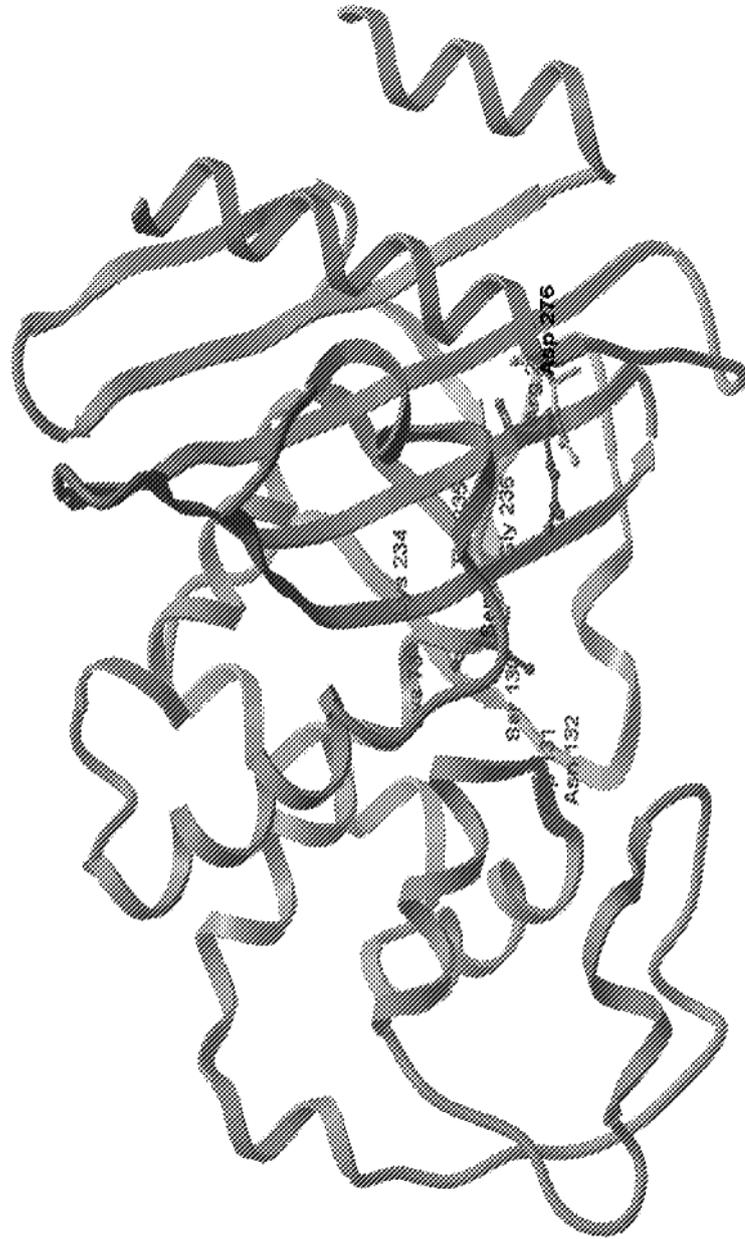
15. Uso de la beta-lactamasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-9 en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir los efectos adversos inducidos por los antibióticos betalactámicos en el tracto gastro-intestinal.

15 16. El uso de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado por que la beta-lactamasa o las beta-lactamasas se administran por vía oral.

17. El uso de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado por que la beta-lactamasa o las beta-lactamasas se administran directamente al tracto gastro-intestinal de un paciente.

20

18. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15-17, caracterizado por que la beta-lactamasa o las beta-lactamasas y el antibiótico betalactámico se administran juntos en forma de un gránulo con revestimiento entérico a un sujeto.



**Figura 1.**

atgattcaaaaacgaaagcggacagtttcggttcagacttgtgcttatgtgcacgctgtta  
M I Q K R K R T V S F R L V L M C T L L  
 Sitio *Hind*III  
 ttgtcagtttgccgattacaaaaacatcagcgc**aagcttcca**aagacggagatgaaagat  
F V S L P I T K T S A Q A S K T E M K D  
 -1 +1 +6  
 gatattgcaaaaacttgaggaacaatttgatgcaaaaactcgggatctttgcattggataca  
 D F A K L E E Q F D A K L G I F A L D T  
 ggtacaaaaccggacggtagcgtatcggccggatgagcgttttgctttgcttcgacgatt  
 G T N R T V A Y R P D E R F A F A S T I  
 aaggctttaactgtaggcgtgcttttgcaacagaaatcaatagaagatctgaaccagaga  
 K A L T V G V L L Q Q K S I E D L N Q R  
 ataacatatacacgtgatgatcttgtaaactacaacccgattacgaaaagcagcttgat  
 I T Y T R D D L V N Y N P I T E K H V D  
 acgggaatgacgctcaaagagcttgccggatgcttcgcttcgatatagtgacaatgcccga  
 T G M T L K E L A D A S L R Y S D N A A  
 cagaatctcattcttaaaacaattggcggacctgaaagtttgaaaaaggaactgaggaag  
 Q N L I L K Q I G G P E S L K K E L R K  
 attggtgatgaggttacaaatcccgaacgattcgaaccagagttaaatgaagtgaatccg  
 I G D E V T N P E R F E P E L N E V N P  
 ggtgaaactcaggataaccgtacagcaagagcacttgtcacaagccttcgagcctttgct  
 G E T Q D T S T A R A L V T S L R A F A  
 cttgaagataaactccaagtgaaaaacgcgagcttttaatcgattggatgaaacgaaat  
 L E D K L P S E K R E L L I D W M K R N  
 accactggagacgccttaatccgtgccggtgtgccggacggttgggaagtggctgataaa  
 T T G D A L I R A G V P D G W E V A D K  
 actggagcggcatcatatggaacccggaatgacattgccatcatttggccgcaaaaagga  
 T G A A S Y G T R N D I A I I W P P K G  
 gatcctgtcgttcttgagcattatccagcagggataaaaaggacgccaagtatgataat  
 D P V V L A V L S S R D K K D A K Y D **N**  
 aaacttattgcagaggcaaaaaggtgtaataatgaaagccttaaacatgaacggcaataa  
 K L I A E A T K V V M K A L N M N G K \*

**Figura 2.**

atgattcaaaaacgaaagcggacagtttcgttcagacttgtgcttatgtgcacgctgtta  
M I Q K R K R T V S F R L V L M C T L L  
tttgtcagtttgccgattacaaaaacatcagcgc**aagcttcca**agacggagatgaaagat  
F V S L P I T K T S A **Q** A S K T E M K D  
-1 +1  
gattttgcaaaacttgaggaacaatttgatgcaaaactcgggatctttgcattggataca  
D F A K L E E Q F D A K L G I F A L D T  
ggtacaaaccggacggttagcgtatcggccggatgagcgttttgcttttgcttcgacgatt  
G T N R T V A Y R P D E R F A F A S T I  
aagcctttaactgtaggcgtgcttttgcaacagaaatcaatagaagatctgaaccagaga  
K A L T V G V L L Q Q K S I E D L N Q R  
ataacatatacacgtgatgatcttgtaaactacaacccgattacggaaaagcagcttgat  
I T Y T R D D L V N Y N P I T E K H V D  
acgggaatgacgctcaaagagcttgccggatgcttcgcttcgatatagtgacaatgcggca  
T G M T L K E L A D A S L R Y S D N A A  
cagaatctcattcttaaaacaaattggcggacctgaaagtttgaaaaaggaactgaggaag  
Q N L I L K Q I G G P E S L K K E L R K  
attggtgatgaggttacaaatcccgaacgattcgaaccagagttaaatgaagtgaatccg  
I G D E V T N P E R F E P E L N E V N P  
ggtgaaactcaggataaccagtacagcaagagcacttgtcacaagccttcgagcctttgct  
G E T Q D T S T A R A L V T S L R A F A  
cttgaagataaaacttccaagtgaaaaacgcgagcttttaatcgattggatgaaacgacgc  
L E D K L P S E K R E L L I D W M K R R  
accactggagacgccttaatccgtgccggtgtgccggacggttgggaagtggctgataaa  
T T G D A L I R A G V P D G W E V A D K  
actggagcggcatcatatggaaccggaatgacattgccatcatttgccgccttaaaagga  
T G A A S Y G T R N D I A I I W P P K G  
gatcctgtcgttcttgcagttattatccagcagggataaaaaggacgccaagtatgatcgc  
D P V V L A V L S S R D K K D A K Y D **R**  
aaacttattgcagaggcaacaaaggtggtaatgaaagccttaaacatgaacggcaataa  
K L I A E A T K V V M K A L N M N G K \*

**Figura 3.**

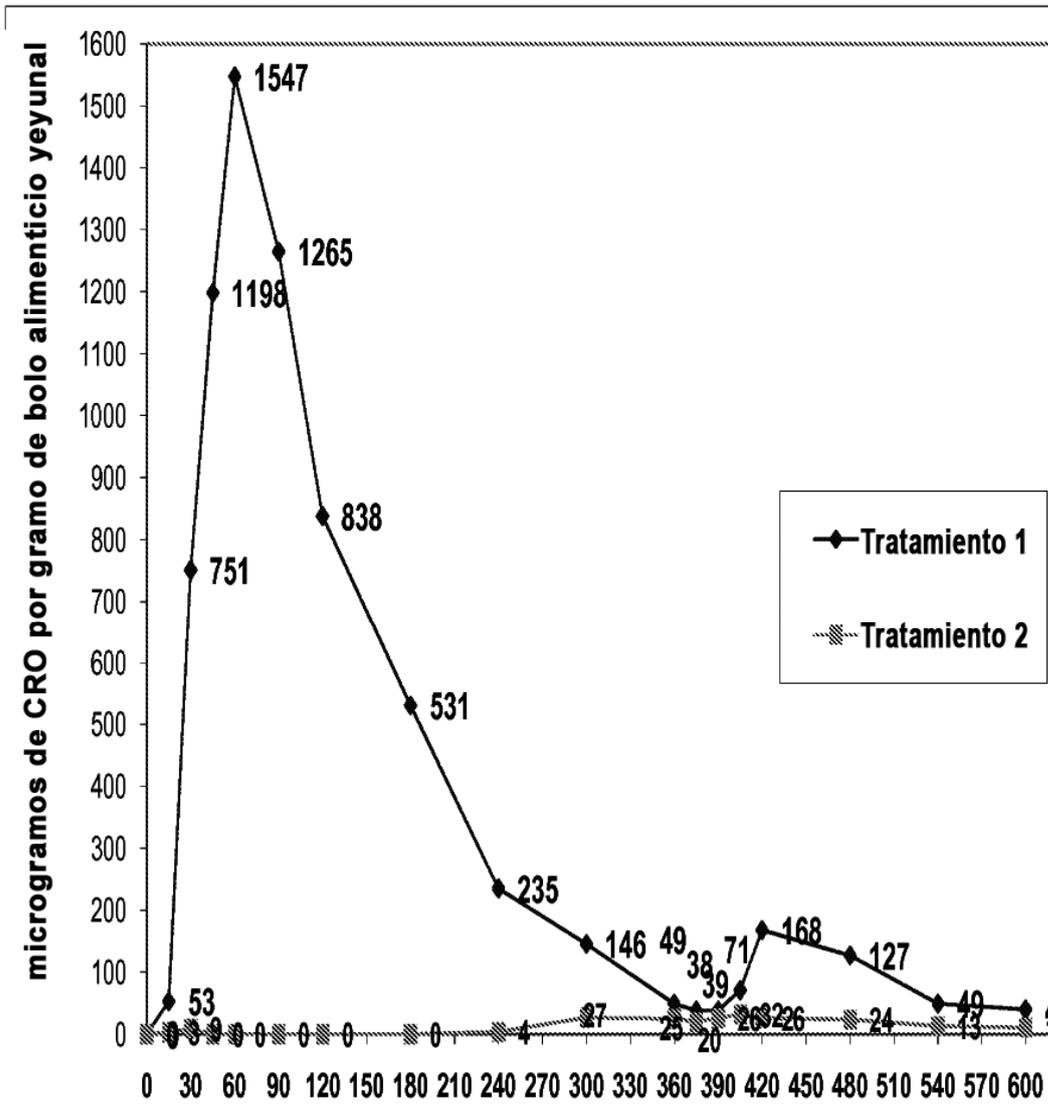


Figura 4.