

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 321**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/005** (2006.01)

**A61K 38/48** (2006.01)

**A01N 63/00** (2006.01)

**C12N 9/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2009 PCT/US2009/049349**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2010 WO10002959**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2009 E 09774409 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2307557**

54 Título: **Una lisina de bacteriófago quimérica con actividad contra bacterias estafilocócicas**

30 Prioridad:

**03.07.2008 US 78277 P**

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

**27.07.2017**

73 Titular/es:

**THE ROCKEFELLER UNIVERSITY (100.0%)  
1230 York Avenue  
New York, NY 10065, US**

72 Inventor/es:

**FISCHETTI, VINCENT, A.;  
DANIEL, ANU y  
EULER, CHAD**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU SLP, .**

ES 2 627 321 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

Una lisina de bacteriófago quimérica con actividad contra bacterias estafilocólicas

## Campo técnico

5 La presente descripción se refiere a la identificación y al uso de enzimas líticas quiméricas para detectar y destruir, de modo rápido y específico, bacterias estafilocólicas, que incluyen ciertas cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos.

## Antecedentes

10 *Staphylococcus aureus* es un patógeno oportunista que habita en la piel y las membranas mucosas humanas. *S. aureus* es el agente causal de una diversidad de infecciones de la piel y los tejidos blancos en seres humanos y de infecciones graves, tales como la neumonía, la meningitis, la endocarditis, y la osteomielitis. Las exotoxinas de *S. aureus* también provocan síndromes de enfermedad, tales como impétigo bulloso, síndrome de la piel escaldada, y síndrome de choque tóxico. Además, los estafilococos están también entre las causas más comunes de enfermedades causadas por alimentos en EE. UU. (Fischetti V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A. y Rood, J. I., editor., 2006, Gram-positive pathogens, 2ª ed., ASM Press). *S. aureus* también es una causa importante de infecciones extrahospitalarias y adquiridas en hospitales (nosocomiales). De los casi 2 millones de casos de infecciones nosocomiales en EE. UU., aproximadamente 230.000 casos están provocados por *S. aureus* (NNIS, 2003, informe de NNIS, resumen de los datos desde enero de 1992 hasta junio de 2003, emitido en agosto de 2003, American Journal of Infection Control, 31:481-498).

20 La aparición global de aislados clínicos resistentes a meticilina y vancomicina de *S. aureus* se ha convertido en un problema grave. En la actualidad, 40-60% de las infecciones nosocomiales de *S. aureus* son resistentes a oxacilina (Massey R.C., Horsburgh M.J., Lina G., Hook M., Recker M., 2006, The evolution and maintenance of virulence in *Staphylococcus aureus*: a role for host-to-host transmission?, Nat. Rev. Microbiol., 4(12):953-958) y más del 60% de los aislados son resistentes a meticilina (Gill S.R., Fouts D.E., Archer G.L., Mongodin E.F., Deboy R.T., Ravel J., Paulsen I.T., Kolonay J.F., Brinkac L., Beanan M. y otros, 2005, Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain, J. Bacteriol., 187(7):2426-2438). El tratamiento de infecciones provocadas por *S. aureus* resistente a fármacos cada vez es más difícil y, por tanto, es un problema importante para los profesionales de la salud. Para combatir este desafío, se están buscando con ahínco nuevos y eficaces antibióticos que pertenecen a diferentes clases. Se han introducido una serie de nuevos agentes antimicrobianos, tales como linezolid, quinupristina-dalfopristina, daptomicina, tigeclina, nuevos glicopéptidos y ceftobiprol o bien están en desarrollo clínico (Aksoy D.Y., Unal S., 2008, New antimicrobial agents for the treatment of Gram-positive bacterial infections, Clin. Microbiol. Infect., 14(5):411-420.). Sin embargo, ya se han indicado aislados clínicos de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) con resistencia a estas nuevas clases de antibióticos (Tsiodras S., Gold H.S., Sakoulas G., Eliopoulos G.M., Wennersten C., Venkataraman L., Moellering R.C., Ferraro M.J., 2001, Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*, Lancet, 358(9277):207-208; Mangili A., Bica I., Snyderman D.R., Hamer D.H., 2005, Daptomycin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia, Clin. Infect. Dis., 40(7): 1058-1060; Skiest D.J., 2006, Treatment failure resulting from resistance of *Staphylococcus aureus* to daptomycin, J. Clin. Microbiol., 44(2):655-656). En consecuencia, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos agentes terapéuticos o antibióticos alternativos contra MRSA.

40 Las endolisinas de bacteriófagos (lisinas) son una de estas nuevas clases de agentes antimicrobianos que están surgiendo como agentes nuevos para el tratamiento profiláctico y terapéutico de infecciones bacterianas. Las lisinas son hidrolasas de la pared celular que son producidas durante el ciclo de infección de bacteriófagos (o fagos) de ADN bicatenario que posibilitan la liberación de la progenie de viriones. Generalmente, las lisinas presentan dos dominios funcionales diferenciados que consisten en un dominio catalítico para la hidrólisis de peptidoglicanos, y un dominio de unión para el reconocimiento de restos de la superficie sobre las paredes celulares bacterianas. Los dominios catalíticos están relativamente conservados entre las lisinas. Las actividades de las lisinas pueden clasificarse en dos grupos basados en la especificidad de enlace dentro del peptidoglicano: las glicosidasas, que hidrolizan enlaces dentro de los restos de aminoazúcar, y las amidasas, que hidrolizan enlaces amida de péptidos troncales de entrecruzamiento. Sin embargo, los dominios de unión no están conservados entre las lisinas. Por tanto, el dominio de unión imparte una especificidad de especie y de cepa debido a que las dianas de unión, a menudo carbohidratos asociados con el peptidoglicano, muestran una distribución específica de especie o de cepa (Fischetti V.A., Nelson D., Schuch R., 2006, Reinventing phage therapy: are the parts greater than the sum?, Nat. Biotechnol., 24(12):1508-1511). La arquitectura modular de las lisinas es una característica importante con respecto a su desarrollo como agentes antimicrobianos. Esto permite la creación de quimeras intercambiando los dominios de la lisina y, por tanto, alterando la especificidad de unión o la actividad enzimática o ambas (Sheehan M.M., García J.L., López R., García P., 1996, Analysis of the catalytic domain of the lysin of the lactococcal bacteriophage Tuc2009 by chimeric gene assembling, FEMS Microbiol. Lett., 140(1):23-28; López R.G.E., García P., García J.L., 1997, The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins?, Microb. Drug Res., 3:199-211; Croux C., Ronda C., López R., García J.L., 1993, Interchange of functional domains switches enzyme specificity: construction of a chimeric pneumococcal-clostridial cell wall lytic enzyme, Mol. Microbiol., 9(5):1019-1025;

Donovan D.M., Dong S., Garrett W., Rousseau G.M., Moineau S., Pritchard D.G., 2006, Peptidoglycan hydrolase fusions maintain their parental specificities, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(4):2988-2996).

5 Cuando se aplican de modo exógeno, las lisinas nativas o recombinantes son capaces de degradar la pared celular de bacterias susceptibles y provocar una lisis rápida de la célula (Nelson D., Loomis L., Fischetti V.A., 2001, Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(7):4107-4112). Se han desarrollado lisinas contra una serie de patógenos Gram-positivos, que incluye estreptococos del grupo A (Nelson D., Loomis L., Fischetti V.A., 2001, Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(7):4107-4112), *S. pneumoniae* (Loeffler J.M., Nelson D., Fischetti V.A., 2001, Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase, *Science*, 294(5549):2170-2172), *Bacillus anthracis* (Schuch R., Nelson D., Fischetti V.A., 2002, A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*, *Nature*, 418(6900):884-889), enterococos (Yoong P., Schuch R., Nelson D., Fischetti V.A., 2004, Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, *J. Bacteriol.*, 186(14):4808-4812), estreptococos del grupo B (Cheng Q., Nelson D., Zhu S., Fischetti V.A., 2005, Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49(1):111-117), y *Staphylococcus aureus* (Rashel M., Uchiyama J., Ujihara T., Uehara Y., Kuramoto S., Sugihara S., Yagyu K., Muraoka A., Sugai M., Hiramatsu K. y otros, 2007, Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11, *J. Infect. Dis.*, 196(8):1237-1247). Las actividades de la mayoría de estas lisinas se han demostrado *in vitro* y en modelos *in vivo*. Varias características exclusivas de las lisinas hacen que sean unos candidatos antibacterianos atractivos contra patógenos Gram-positivos. Estas incluyen i) una rápida actividad antibacteriana *in vitro* e *in vivo*; ii) un espectro lítico muy estrecho (específico de especie y de cepa); iii) una afinidad de unión muy fuerte, generalmente en el intervalo nanomolar; iv) muy pocas probabilidades de desarrollar resistencia puesto que los epitopos de unión existen fundamentalmente para la viabilidad; v) seguridad; y vi) facilidad relativa para la modificación mediante ingeniería genética (Fischetti V.A., Nelson D., Schuch R., 2006, Reinventing phage therapy: are the parts greater than the sum?, *Nat. Biotechnol.*, 24(12):1508-1511).

Aunque se han desarrollado lisinas contra una serie de patógenos Gram-positivos, siguen siendo necesarias lisinas específicas de *S. aureus*. Diversos laboratorios han intentado, sin éxito, obtener una lisina estafilocócica. Se ha intentado la expresión de más de veinte lisinas estafilocócicas diferentes empleando una diversidad de técnicas, sin éxito. Estas incluye la expresión de genes de lisina en *E. coli* empleando diferentes vectores de expresión y condiciones, la expresión en sistemas de *Bacillus*, levaduras y mamíferos, la expresión en presencia de chaperonas, la expresión de versiones truncadas, etc. Por lo que saben los inventores, solo existe un informe del desarrollo con éxito de una lisina específica de *S. aureus* denominada MV-L (Rashel M., Uchiyama J., Ujihara T., Uehara Y., Kuramoto S., Sugihara S., Yagyu K., Muraoka A., Sugai M., Hiramatsu K. y otros, 2007, Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11, *J. Infect. Dis.*, 196(8):1237-1247). La lisina MV-L está formada por dos dominios catalíticos (un dominio de endopeptidasa y un dominio de amidasa) unidos a un único dominio dirigido a la pared celular (CWT), un tipo de dominio de unión.

El documento WO 2009/024327 (Profos AG) se refiere a un polipéptido denominado ply-pitti26 y sus usos, en concreto para el tratamiento o la profilaxis de un sujeto infectado o expuesto a estafilococos.

40 A menos que se indique lo contrario, las referencias en la presente a un "dominio de unión" incluyen un dominio CWT. El dominio CWT de MV-L, al igual que la enzima estafilolítica lisostafina, muestra homología con dominios similares a SH3b. Los dominios similares a SH3b se unen al puente de entrecruzamiento de péptidos (la pentaglicina) en la pared celular estafilocócica. Existen informes de cepas estafilocócicas que desarrollan resistencia a frecuencias de 10<sup>sup</sup>.-6 frente a la lisostafina mediante la alteración de sus puentes de entrecruzamiento de péptidos. Por tanto, los inventores prevén que los estafilococos desarrollarán resistencia con mayor frecuencia contra las lisinas que contienen dominios CWT similares a SH3b que incluyen MV-L. Son necesarias enzimas líticas capaces de unirse específicamente a bacterias estafilocócicas sin las frecuencias indeseablemente elevadas de resistencia a lisostafina, tales como lisinas específicas de *S. aureus*, sin dominios CWT similares a SH3b.

## Sumario

50 Esta descripción describe nuevas lisinas estafilocócicas, así como métodos para fabricarlas y utilizar las lisinas. En un ejemplo, se describe la ingeniería genética de una nueva lisina quimérica, denominada ClyS ("chimeric lysin for staphylococci", lisina quimérica para estafilococos). La ClyS es específicamente activa contra estafilococos susceptibles y resistentes a fármacos, y fue construida condensando el dominio catalítico de una lisina de fago específica de *Staphylococcus* con un dominio de unión exclusivo de otra lisina de fago específica de *Staphylococcus* que no tiene homólogos conocidos. La ClyS es una lisina específica de estafilococos soluble sin un dominio CWT similar a SH3b, pero sí contiene un dominio CWT que se cree que reconoce un carbohidrato de la superficie específico de estafilococos. En consecuencia, la frecuencia con la que las cepas estafilocócicas desarrollarán resistencia a ClyS puede reducirse. La invención se refiere a una lisina de bacteriófago quimérica que un dominio catalítico de una primera lisina de fago específica de *Staphylococcus* y un dominio de unión de una segunda lisina de fago específica de *Staphylococcus*, en la que el dominio de unión no es un dominio dirigido a la pared celular similar a SH3b. Además, la caracterización bioquímica de ClyS revela que el pH y el espectro salino de ClyS es muy

diferente de las lisinas convencionales, lo cual proporciona propiedades exclusivas a esta lisina quimérica.

### Breve descripción de los dibujos

5 La figura 1 es un diagrama esquemático de una lisina phiNM3 que muestra los dominios CHAP putativo ("cysteine- and histidine-dependent amidohydrolase/peptidase", amidohidrolasa/peptidasa dependiente de cisteína e histidina) y CWT. Los números representan las posiciones de aminoácidos y los límites del dominio. El dominio CWT de ClyS se indica en el diagrama.

10 La figura 2A es un gel que muestra la purificación de CWT de phiNM3. Se muestra una SDS-PAGE de un gel teñido con azul de Coomassie de CWT de phiNM3 purificado mediante una cromatografía de intercambio aniónico en el carril marcado como "CWT." Los marcadores de peso molecular de proteínas en kilodaltons (kDa) se muestran en el carril marcado como "M."

La figura 2B muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de proteína de CWT de phiNM3 (SEQ ID NO:1).

15 La figura 3 muestra una serie de micrografías que muestran la unión específica de CWT de phiNM3 a estafilococos. El CWT de phiNM3 purificado se marcó con FITC y se expuso a 1) *S. aureus*; 2) *B. cereus*; 3) *S. epidermidis*; 4) *E. coli*; 5) *Streptococcus* del grupo A, y 6) una suspensión mixta de células de *S. aureus* y *B. cereus*. "P" indica la imagen de contraste de fase y "F" indica la imagen fluorescente.

20 La figura 4 es un diagrama esquemático que ilustra el desarrollo de la lisina quimérica. En particular, la figura 4 proporciona diagramas esquemáticos de diversas lisinas quiméricas que muestran sus respectivos dominios y la correspondiente expresión y solubilidad de la proteína y la actividad contra células de *S. aureus*. Se muestran dominios similares con el mismo tono y también se marcan. PlyB-cat indica el dominio catalítico de la lisina PlyB específica de *Bacillus* (y se marca con un "4" en la figura); Sa-aa indica 16 restos aminoácidos específicos de lisinas estafilocócicas (y se marcan con un "5" en la figura); PlyB-CWT indica el dominio CWT de PlyB (y se marca con un "6" en la figura); Twort-CWT indica el dominio CWT de la lisina Twort de fago de *S. aureus* (y se marca con un "8" en la figura); Lisostafina CWT indica el dominio CWT de lisostafina (y se marca con un "10" en la figura); y Se autolisina amidasa indica un dominio amidasa de la autolisina de *S. epidermidis* (y se marca con un "12" en la figura).

25 La figura 5A muestra la secuencia de la proteína de ClyS. La secuencia de proteína predicha de la proteína de ClyS quimérica muestra el dominio catalítico de endopeptidasa de Twort y el dominio CWT de phiNM3.

La figura 5B muestra la secuencia de aminoácidos de la molécula quimérica AD127, descrita con respecto a la figura 4.

La figura 5C muestra la secuencia de aminoácidos de la lisina Twort nativa (no modificada) (SEQ ID NO:12).

30 La figura 6 es un gel que muestra la purificación de ClyS. La ClyS se expresó en células de *E. coli* DH5α y se purificó mediante una cromatografía de intercambio catiónico, seguido de una cromatografía de hidroxipatito. Se separó una muestra purificada (10 microgramos) mediante SDS-PAGE y se tiñó con azul de Coomassie (carril de la derecha). Los marcadores de peso molecular de proteínas en kilodaltons (kDa) se muestran en el carril de la izquierda.

35 La figura 7 es una gráfica que muestra la actividad de ClyS contra *S. aureus in vitro*. Se resuspendieron células de *S. aureus* de la cepa 8325-4 en tampón fosfato 20 mM (pH 7,4), se incubaron con 50 U de ClyS y se controló la DO600 (triángulos negros) con un espectrofotómetro. Se realizaron experimentos control (cuadrados negros) bajo las mismas condiciones solo con tampón. Se determinó la viabilidad (rombos negros) de las células, mostrada como unidades formadoras de colonias/ml, mediante una dilución en serie y un cultivo en placa de las células.

40 La figura 8 es una serie de micrografías que demuestran que ClyS provoca la alteración de la pared celular y, en último término, la lisis de las células 8325-4. Las figuras 8A-8C (A-C) son micrografías de transmisión de electrones de sección delgada (barras, 200 nm) de *S. aureus* tres minutos después de la exposición a 50 U de ClyS. Las flechas indican extrusiones de la membrana citoplásmica a través de agujeros generados en la pared celular por ClyS. La lisis finalmente produce "células fantasma" (D) después de la pérdida de los contenidos citoplásmicos (barra, 500 nm).

45 Las figuras 9A y 9B son gráficas que muestran la actividad de ClyS en diversas condiciones de pH y concentración salina. La figura 9A es una gráfica de la actividad de ClyS (50 U) ensayada contra *S. aureus* de la cepa 8325-4 en tampones con unos valores de pH que varían de 4 a 10 en ensayos de 15 minutos. Se midió la densidad óptica (cuadrados negros) y la viabilidad (rombos negros) como se describe en la leyenda de la figura 6. Se calculó la destrucción, en número de veces, en el ensayo de viabilidad dividiendo el número de bacterias viables después del tratamiento con tampón a un pH concreto entre el número después de la exposición a la enzima ClyS al mismo pH. Las lecturas de pH final para cada reacción se registran en el eje de abscisas. La figura 9B es una gráfica de la actividad de ClyS (50 U) ensayada contra *S. aureus* de la cepa 8325-4 en tampón fosfato 20 mM (pH 7,4) en presencia de diferentes concentraciones de NaCl. Después de 15 minutos, las muestras se ensayaron para la densidad óptica y se calculó la viabilidad como se indicó anteriormente.

La figura 10 es una gráfica de barras que demuestra que ClyS produce la destrucción específica de estafilococos. Cultivos en fase logarítmica de diferentes bacterias fueron expuestos a 50 U de ClyS durante 15 minutos. Se calculó la destrucción en número de veces como se describe en la leyenda de la figura 8.

5 La figura 11 muestra una gráfica de las CFU de MRSA de ratones individuales infectados con MRSA después de ser administrados con disolución salina tamponada con fosfato a pH 7,3 (control) o ClyS (630 µg).

La figura 12 muestra las curvas de supervivencia de Kaplan Meier que muestran el efecto de ClyS para evitar la muerte en ratones inyectados con MRSA comparado con el control de tampón fosfato.

10 La figura 13 muestra un isoblograma para el estudio de microdilución de caldo de cultivo de tablero de ajedrez del efecto de la vancomicina sobre VISA ("vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*", *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina) u oxacilina sobre MRSA con cantidades crecientes de ClyS.

La figura 14 muestra las curvas de supervivencia de Kaplan Meier que muestran el efecto de la oxacilina por sí sola o en combinación con ClyS.

15 La figura 15 muestra una fotografía de un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie del desarrollo en el tiempo, durante 5 días, a 21 °C de ClyS en ausencia (gel arriba a la izquierda) o en presencia de DTT 5 mM (gel arriba a la derecha), y pClyS en ausencia (gel abajo a la izquierda) o en presencia de DTT 5 mM (gel abajo a la derecha). Se cargaron aproximadamente 20 microgramos de proteína en cada carril del gel. El gel abajo a la derecha muestra una cantidad mucho mayor de pClyS intacta en presencia de DTT 5 mM después de 5 días, comparado con la ClyS intacta en presencia de DTT 5 mM después de 5 días.

## Descripción detallada

### 20 Definiciones

A menos que se indique lo contrario, ciertos términos y expresiones empleados en la presente y su aplicabilidad a la presente descripción se definen a continuación.

25 El término "aislado" significa al menos parcialmente purificado a partir de un material de partida. El término "purificado" significa que el material biológico ha aumentado, de modo mensurable, en concentración por medio de cualquier proceso de purificación que incluye, pero no se limita a una cromatografía en columna, HPLC, precipitación, electroforesis, etc., eliminado con ello, parcial, sustancial o completamente, las impurezas, tales como precursores u otros productos químicos implicados en la preparación del material. Por tanto, un material que sea homogéneo o sustancialmente homogéneo (por ejemplo, que produce una única señal de proteína en un procedimiento de separación, tal como una electroforesis y una cromatografía) se incluye dentro del significado de  
30 aislado y purificado. Los expertos en la técnica apreciarán que la cantidad de purificación necesaria dependerá del uso del material. Por ejemplo, las composiciones previstas para la administración a seres humanos normalmente deben estar muy purificadas según las normas de regulación.

La expresión "enzima lítica genéticamente codificada por un bacteriófago" se refiere a un polipéptido que tiene al menos algo de actividad lítica contra la bacteria hospedante.

35 Los variantes de la "lisina de bacteriófago quimérica" se incluyen en la definición de lisinas de bacteriófago quiméricas, e incluyen una lisina de bacteriófago quimérica funcionalmente activa con una actividad de destrucción de *Staphylococcus aureus* que tenga al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, o incluso al menos 99,5% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia descrita en la presente. Por ejemplo, un aspecto de la presente invención incluye lisinas de bacteriófagos quiméricas que tienen al  
40 menos 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, o incluso al menos 99,5% e identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia del polipéptido de SEQ ID NO:2.

45 El "porcentaje (%) de identidad de secuencia del polipéptido" con respecto a las secuencias de polipéptidos de enzimas líticas identificadas en la presente se define como el porcentaje de restos aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos aminoácidos en la secuencia del polipéptido de la enzima lítica específica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia y sin considerar las sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencia. Los métodos para el alineamiento para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se describen a continuación.

### Lisinas estafilocócicas

50 En la presente se describen lisinas de bacteriófagos quiméricas con actividad de destrucción de *S. aureus*. En un aspecto de la invención, la lisina de bacteriófago quimérica presenta actividad de destrucción contra *Staphylococcus aureus*, tales como cepas resistentes a metilicina y sensibles a metilicina de *S. aureus*. En otro aspecto de la invención, la lisina quimérica presenta actividad de destrucción contra múltiples especies estafilocócicas, tales como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Las lisinas en general aparecen en forma de una estructura

modular. La figura 1 es un diagrama esquemático de una lisina phiNM3 que muestra el dominio CHAP putativo 110 y el dominio CWT 120. Los números representan las posiciones de aminoácidos y los límites del dominio. El dominio CWT de ClyS se muestra como un rectángulo oscuro 120. El módulo N-terminal consiste en un dominio catalítico que se cree que posee la capacidad de degradar la pared celular bacteriana de ciertas bacterias. Las actividades enzimáticas que a menudo se asocian con el dominio catalítico son amidasas, endopeptidasas, glucosamidasas y muramididasas. El módulo C-terminal consiste en un dominio de unión que se cree que tiene afinidad por un epitopo de carbohidrato sobre la pared celular de la bacteria diana. Se cree que el dominio de unión determina la especificidad de la lisina. Se cree que el puente de entrecruzamiento de péptidos dentro del peptidoglicano estafilocócico actúa como receptor para el dominio CWT de la lisostafina, una enzima estafilolítica producida por *Staphylococcus simulans*. El dominio CWT de la lisostafina presenta homología con el dominio SH3b, lo cual sugiere que dichas lisinas también podrían utilizar el puente de entrecruzamiento de péptidos como receptor.

En una realización, se proporcionan moléculas de unión específicas de *Staphylococcus* que comprenden un dominio CWT dentro de lisinas estafilocócicas que no tienen homólogos de dominio conocidos. Preferiblemente, se proporciona dicho dominio CWT para reconocer un epitopo diferente, tal como un carbohidrato asociado a la pared celular, en lugar del puente de entrecruzamiento de péptidos en la pared celular estafilocócica.

En otra realización, la lisina ClyS puede utilizarse para digerir la pared celular de cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, lo cual, a su vez, permitiría acceder al material genético y citoplásmico, tal como ADN y ARN endógeno, para después identificar y secuenciar la cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus*. También se liberarán moléculas asociadas con la membrana y asociadas con la pared para objetivos de diagnóstico.

Lo más preferiblemente, la molécula de unión es un dominio de unión soluble de una lisina bacteriana que comprende un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que proporciona una unión específica a *S. aureus*, tal como SEQ ID NO:1 (dominio CWT de phiNM3). Por ejemplo, la lisina preferiblemente incluye la secuencia polipeptídica de la lisina phiNM3 de fago de *S. aureus* (SEQ ID NO:1) (n.º de registro de la proteína YP\_908849). El dominio CWT de la lisina phiNM3 (SEQ ID NO:1) que se corresponde con los restos aminoácidos 158-251 se clonó y se expresó. La proteína de aproximadamente 10 kDa de SEQ ID NO:1 es muy soluble y se purificó mediante una cromatografía de intercambio aniónico en una sola etapa hasta la homogeneidad. La figura 2A es un gel de intercambio aniónico que muestra la proteína de SEQ ID NO:1 en una segunda columna junto a un conjunto de proteínas de marcadores en una primera columna. La figura 2B muestra la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. Para determinar si el dominio peptídico de SEQ ID NO:1 muestra unión específica de *Staphylococcus*, la proteína purificada se marcó con FITC y se expuso a *S. aureus*, *S. epidermidis* y una población mixta de *S. aureus* y *Bacillus* en fase logarítmica. Se emplearon estreptococos del grupo A, *E. coli* y *Bacillus cereus* como controles. Más preferiblemente, el dominio CWT de phiNM3 marcado con FITC se une específicamente a células de *S. aureus* (figura 3-1) y *S. epidermidis* (figura 3-3) cuando están presentes en poblaciones individuales o mixtas (figura 3-6), mientras que no se observa unión a estreptococos (figura 3-5), *Bacillus* (figura 3-2) ni *E. coli* (figura 3-4). La lisina phiNM3 se une específicamente a células de *S. aureus* (figura 3-1) y *S. epidermidis* (figura 3-2) cuando están presentes en poblaciones individuales o mixtas (figura 3-4), mientras que no se observa unión a estreptococos (figura 3-4), *Bacillus* (figura 3-5) ni *E. coli* (figura 3-6).

La figura 5B proporciona la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, la muestra AD119 analizada con respecto a la figura 4. AD119 (SEQ ID NO:3) comprende el dominio de endopeptidasa de Twort unido al dominio CWT de lisostafina. Por contraste con el compuesto quimérico de SEQ ID NO:2 (AD127), que comparte el dominio de endopeptidasa de Twort pero presenta el dominio CWT de phiNM3 (SEQ ID NO:1) en lugar del dominio CWT de lisostafina, el compuesto AD127 es insoluble y muestra poca o nula actividad de destrucción contra *S. aureus*.

En otra realización, la lisina es una proteína quimérica que comprende un dominio de endopeptidasa de la lisina Twort de *S. aureus* cadena arriba del dominio CWT de phiNM3 (SEQ ID NO:1). Preferiblemente, el polipéptido quimérico es suficientemente soluble en disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Los niveles preferidos de solubilidad en PBS para las lisinas quiméricas son de al menos aproximadamente 1 mg/ml, y más preferiblemente de al menos aproximadamente 3 mg/ml en PBS. Aunque las lisinas de bacteriófagos estafilocócicos nativos generalmente son insolubles en PBS, las lisinas quiméricas que comprenden un dominio de endopeptidasa de una primera lisina (por ejemplo, lisina Twort de *S. aureus*) unidas al dominio CWT de SEQ ID NO:1 son sorprendentemente solubles en PBS (por ejemplo, al menos aproximadamente 1 mg/ml, y en general aproximadamente 3 mg/ml o más). Un ejemplo de dicha lisina se proporciona en SEQ ID NO:2 (AD127) y se muestra en la figura 5A, y consiste en el dominio de endopeptidasa de la lisina Twort unido al dominio CWT de phiNM3 (SEQ ID NO:1). El polipéptido aislado de SEQ ID NO:2 (AD 127) se construyó modificando genéticamente los dominios de amidasa de la autolisina de *S. epidermidis* y de endopeptidasa de la lisina Twort cadena arriba del dominio CWT de phiNM3, respectivamente. La quimera AD 126 no presenta expresión ni actividad, pero AD 127 es soluble y presenta una actividad muy alta pero una expresión baja. Para superar la baja expresión de la construcción AD 127, el gen quimérico completo se clonó en el vector de expresión pJML6 para generar pAD 138. La expresión, la solubilidad y la actividad de AD 127 procedente de la construcción pAD138 eran muy altas. Por tanto, esta quimera se denominó "ClyS" por "Chimeric lysin for *Staphylococcus*" (lisina quimérica para *Staphylococcus*) (figura 5A).

ClyS (SEQ ID NO:2) contiene 280 restos aminoácidos con una masa molecular deducida de 31956 Da y un punto

isoeléctrico teórico de 9,17, y fue purificada mediante una cromatografía en columna en dos etapas hasta >90% de homogeneidad. ClyS tiene una masa molecular de aproximadamente 31 kDa mediante SDS/PAGE (figura 6), que fue confirmada mediante una cromatografía de filtración en gel, lo cual sugiere que la proteína existe como un monómero y no está proteolíticamente procesada (los datos no se muestran).

5 La actividad en unidades de ClyS se define midiendo la pérdida espectrofotométrica de turbidez, que es indicativa de la lisis celular, de células de *S. aureus* 8325-4 tras añadir diluciones en serie de ClyS. En estos ensayos, 5 microgramos de ClyS se corresponden con 1 U de actividad lítica. Cuando se añaden 50 U de ClyS a células 8325-4 en crecimiento exponencial, la DO<sub>600</sub> disminuye hasta la línea de base en 5 min (figura 7). Para confirmar que la lisis celular observada se corresponde con la muerte celular, se determinó la viabilidad estafilocócica enumerando partes alícuotas de la reacción lítica en diversos momentos. Se observa una disminución en la viabilidad de aproximadamente 3 unidades logarítmicas en 30 min (figura 7).

10 El efecto lítico sobre células 8325-4 de *S. aureus* expuestas a 50 U de ClyS durante 1-3 min se visualizó mediante microscopía electrónica de transmisión. Típico de la actividad lisina observada previamente, se observó una degradación localizada de la pared celular en un solo sitio (figura 8A) o en múltiples sitios (figura 8B). Sin embargo, a diferencia de otras lisinas, los sitios de degradación en la célula no se limitan a posiciones septales o polares, sino que se distribuyeron al azar. Esto produce extrusiones y la ruptura de la membrana celular (figura 8C) y la posterior pérdida de los contenidos citoplásmicos y la formación de células fantasma (figura 8D).

15 Se determinó el efecto del pH sobre la actividad de ClyS midiendo la disminución en la DO<sub>600</sub> o la viabilidad de las células a diferentes valores de pH. Se observó que ClyS es activa a través de un amplio intervalo de valores de pH, pero es más activa entre pH 9 y 10. Sin embargo, ClyS conserva una actividad parcial, aunque significativa, a pH fisiológico (figura 9A). De modo similar, también se determinó el efecto de la concentración salina sobre la actividad de ClyS. ClyS muestra actividad en un amplio intervalo de concentraciones salinas (figura 9B). Aunque la actividad se deteriora por encima de NaCl 400 mM, ClyS funciona bien a concentraciones fisiológicas.

20 Se ensayó la actividad muralítica de ClyS en una serie de cepas bacterianas que representan una diversidad de especies que se dividieron en conjuntos (tabla 1 y figura 10). El conjunto I consiste en cepas de *S. aureus*, que incluyen *S. aureus* (MSSA) sensibles a meticilina y MRSA. ClyS es activa contra MSSA y MRSA, aunque se observaron algunas diferencias entre las cepas de *S. aureus*. El conjunto II consiste en diferentes especies de estafilococos, que incluyen *S. epidermidis*, *S. simulans* y *S. sciuri*. ClyS es activa no solo contra *S. epidermidis*, que incluye la cepa formadora de biopelícula RP62A, sino que también es activa contra *S. simulans* y *S. sciuri*, lo cual sugiere que ClyS reconoce un epitopo sobre la pared celular que está presente en todas las células estafilocócicas. El conjunto III consiste en una mezcla de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, que incluyen representantes de estreptococos de los grupos A, B, C y E, especies estreptocócicas orales que incluyen *S. gordonii* y *S. salivarius*, así como *S. uberis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli*. ClyS no muestra actividad contra ninguno de estos organismos.

25 En otra realización, un péptido quimérico comprende un polipéptido aislado que comprende un dominio de endopeptidasa de la lisina Twort de *S. aureus* cadena arriba del dominio CWT de lifostafina. Un ejemplo de una lisina de este tipo se proporciona en SEQ ID NO:3 (AD119).

30 En otra realización, las composiciones líticas pueden comprender una mezcla de dos o más lisinas. La mezcla puede incluir un primer polipéptido y un segundo péptido, en la que uno o ambos polipéptidos pueden carecer del nivel deseado de actividad lítica, pero la mezcla proporciona una actividad lítica deseablemente específica y eficaz contra una bacteria de interés. Por ejemplo, una composición puede incluir un primer polipéptido aislado que comprende un dominio de endopeptidasa de la lisina Twort de *S. aureus* cadena arriba del dominio CWT de lifostafina, combinado con un segundo polipéptido aislado que comprende un dominio de amidasa de la autolisina de *S. epidermidis* cadena arriba del dominio CWT de lifostafina. Un ejemplo de una composición de este tipo comprende una mezcla de SEQ ID NO:3 (AD119) y SEQ ID NO:4 (AD112).

35 En algunos ejemplos, la presente descripción se refiere a enzimas líticas como tratamiento profiláctico para prevenir una infección en sujetos que probablemente hayan estado expuestos a bacterias de *S. aureus*, o como tratamiento terapéutico para aquellos sujetos que ya han enfermado como consecuencia de la infección. Las enzimas líticas asociadas a fagos descritas en la presente son específicas de bacterias de *S. aureus* y preferiblemente degradan, de forma eficaz, la pared celular de bacterias de *S. aureus*.

40 Los polipéptidos de las enzimas líticas quiméricas descritos en la presente también pueden emplearse como agente terapéutico. Los polipéptidos de las enzimas líticas de la presente invención pueden formularse según métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, en las que el producto de la enzima lítica se combina mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones que puede utilizarse para el tratamiento profiláctico y terapéutico de una infección por bacterias de *S. aureus* también incluyen la enzima reordenada y/o quimérica y un medio de aplicación (tal como un sistema vehículo o un modo de administración oral) al revestimiento mucósico de la cavidad oral y nasal, de modo que la enzima se introduce en el sistema vehículo o modo de administración oral para que alcance al revestimiento mucósico.

En un aspecto de la invención, la lisina quimérica se administra en combinación con un antibiótico, tal como vacomicina u oxacilina. Una lisina quimérica de *Staphylococcus*, tal como una lisina de SEQ ID NO:2 (ClyS), se administra en forma de una composición antibacteriana en combinación con un vehículo farmacéutico adecuado. En un aspecto de la invención, la lisina quimérica se administra mezclada con un vehículo farmacéuticamente aceptable en forma de una composición farmacéutica. En otro aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende además vancomicina u oxacilina. En ciertas realizaciones, la cantidad de lisina de bacteriófago quimérica presente es una cantidad terapéuticamente eficaz. Los "vehículos", tal como se emplean en la presente, incluyen vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero expuesto a ellos en las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una disolución acuosa con pH tamponado. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones, tales como tampón fosfato, citrato y de otros ácidos orgánicos; antioxidantes, que incluyen el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menor que aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcares, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG), y PLURONICS™. Estas composiciones antimicrobianas/farmacéuticas pueden administrarse de modo local o sistémico.

Las vías de administración incluyen la vía tópica, ocular, nasal, pulmonar, bucal, parenteral (intravenosa, subcutánea e intramuscular), oral, parenteral, vaginal y rectal. También es posible la administración desde implantes. Los compuestos de la invención también pueden administrarse por vía tópica a la piel o las mucosas, es decir, por vía dérmica o transdérmica. Las formulaciones típicas para este objetivo incluyen geles, hidrogeles, lociones, disoluciones, cremas, ungüentos, polvos secantes, vendajes, espumas, películas, parches dérmicos, obleas, implantes, esponjas, fibras, vendas y microemulsiones. También pueden emplearse liposomas. Los vehículos típicos incluyen alcohol, agua, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, glicerina, polietilenglicol y propilenglicol. Pueden incorporarse potenciadores de la penetración [véase, por ejemplo, J. Pharm. Sci., 88 (10), 955-958, de Finin y Morgan (octubre de 1999)].

Los compuestos de la invención también pueden administrarse directamente a la corriente sanguínea, al músculo o a un órgano interno. Los medios adecuados para la administración parenteral incluyen la administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intramuscular y subcutánea. Los dispositivos adecuados para la administración parenteral incluyen inyectores con aguja (que incluyen microagujas), inyectores sin aguja y técnicas de infusión. Los compuestos de la invención también pueden administrarse por vía intranasal u oral mediante inhalación, generalmente en forma de un aerosol. Así, en un aspecto de la invención, se formula una composición farmacéutica que comprende una lisina de la invención mezclada con un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración tópica o para la administración intranasal u oral mediante inhalación.

Las formas de preparaciones antimicrobianas adecuadas son, por ejemplo, gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos revestido, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, microemulsiones, definidas como sistemas termodinámicamente estables ópticamente isotrópicos que consisten en agua, aceite y tensioactivo, fases cristalinas líquidas, definidas como sistemas que se caracterizan por una ordenación de largo alcance pero un desorden de corto alcance (los ejemplos incluyen fases laminares, hexagonales y cúbicas, continuas en agua o en aceite), o sus homólogos dispersados, geles, ungüentos, dispersiones, suspensiones, cremas, aerosoles, gotas o una disolución inyectable en forma de ampolla, y también preparaciones con una liberación prolongada de los compuestos activos, en cuya preparación se emplean habitualmente excipientes, diluyentes, adyuvantes o vehículos, tal como se describió anteriormente. La composición farmacéutica también puede proporcionarse en vendas o en suturas o similares.

Muchos cirujanos ortopédicos consideran que los seres humanos con articulaciones prostéticas podrían ser considerados para una profilaxis con antibióticos. La infección profunda tardía por *S. aureus* es una complicación grave que a veces conduce a la pérdida de la articulación prostética y viene acompañada de una morbilidad y mortalidad significativas. Por tanto, es posible extender el uso de la lisina de bacteriófago quimérica descrita en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO:2) como sustituto de antibióticos profilácticos, o para su uso en combinación con estos, en esta situación. La lisina de bacteriófago quimérica puede administrarse mediante inyección con un vehículo adecuado directamente al sitio del dispositivo ortopédico *in situ* para eliminar la infección, o sobre una superficie del dispositivo antes de la implantación. Pueden utilizarse otras vías de inyección, tales como la vía subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. Otros medios alternativos para la administración incluyen la administración transcutánea y transdérmica empleando penetrantes, tales como sales biliares o ácidos fusídicos u otros detergentes. Además, si un polipéptido u otro compuesto de la presente invención puede formularse en una formulación entérica o encapsulada, también es posible la administración oral. La administración de estos compuestos también puede ser tópica y/o localizada, en forma de bálsamos, pastas, geles y similares.

Antes o al mismo tiempo que la enzima se introduce en el sistema vehículo o modo de administración oral, puede resultar deseable administrar o formular un péptido quimérico descrito en la presente en un entorno de tampón estabilizante, que mantiene un intervalo de pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 7,5. Antes o al

mismo tiempo que el péptido quimérico se introduce en el sistema vehículo o modo de administración oral, la enzima puede estar en un entorno de tampón estabilizante para mantener un intervalo de pH adecuado, tal como entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0, que incluye un pH de aproximadamente 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 o cualquier intervalo de pH de 0,05 entre ellos, o cualquier intervalo que sea un múltiplo de 0,05 entre ellos, que incluyen unos valores de pH de 5,2, 6,5, 7,4, 7,5 y 8,5.

Existen una serie de ventajas en utilizar enzimas líticas para tratar infecciones bacterianas. El diseño modular de las lisinas, con sus dominios catalíticos y de unión diferenciados, las convierte en ideales para experimentos de intercambio de dominios, en los que las especificidades bacterianas y las actividades catalíticas pueden mejorar o adaptarse para su uso contra patógenos alternativos. Puesto que las dianas catalíticas y de unión de las lisinas (peptidoglicanos y carbohidratos asociados, respectivamente) son en gran medida fundamentales para la viabilidad, la resistencia a la lisina será rara.

El "tratamiento" se refiere al tratamiento terapéutico y a las medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o frenar (disminuir) el trastorno o afección patológica diana. Los sujetos que necesitan tratamiento incluyen los sujetos que ya presentan el trastorno, así como los sujetos que son propensos a padecer el trastorno o los sujetos en los que el trastorno debe prevenirse.

Un "mamífero", para los objetivos de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, que incluye seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, de uso deportivo o mascotas, tales como perros, gatos, ganado vacuno, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Las formulaciones que se van a utilizar para la administración *in vivo* preferiblemente son estériles. Esto se logra con facilidad mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de una liofilización y reconstitución. Las composiciones terapéuticas de la presente en general se introducen en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa para disoluciones intravenosas o un vial que tiene un tapón que puede ser atravesado por una aguja de inyección hipodérmica.

La vía de administración está de acuerdo con los métodos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional, administración tópica o por medio de sistemas de liberación sostenida. Cuando se trata una infección o exposición bacteriana, la enzima lítica puede administrarse de cualquier forma adecuada, que incluye por vía parenteral o a través de la cavidad oral o nasal.

Las dosificaciones y concentraciones de fármaco deseadas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo del uso concreto previsto. La determinación de la dosificación o vía de administración deseadas está dentro del conocimiento de los expertos en la técnica médica. Los experimentos con animales proporcionan una orientación fiable para la determinación de las dosis eficaces para la terapia humana. Puede realizarse una conversión interespecífica de las dosis eficaces siguiendo los principios indicados por Mordenti, J. y Chappell, W., "The use of interspecies scaling in toxicokinetics", en *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi *et al.*, eds., Pergamon Press, Nueva York, 1989, pp. 42-96.

Cuando se emplea la administración *in vivo* de un péptido de lisina quimérica, las cantidades de dosificación normales pueden variar de aproximadamente 10 ng/kg hasta 1000 mg/kg de peso corporal del mamífero o más diarios, o de aproximadamente 1 µg/kg/día hasta 10000 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. A continuación también se proporciona una orientación con respecto a las dosificaciones y los métodos de administración concretos, que también pueden obtenerse en la bibliografía. Se prevé que diferentes formulaciones serán eficaces para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes trastornos, y la que la administración que se dirige a un órgano o tejido, por ejemplo, puede necesitar un transporte diferente que el empleado para otro órgano o tejido.

Las cantidades o proporciones de dosificaciones eficaces del péptido quimérico para ser administradas por vía parenteral y la duración del tratamiento dependerán, en parte, de la gravedad de la infección, del peso del paciente, de la duración de la exposición del receptor a la bacteria infecciosa, de la gravedad de la infección y de una diversidad de otras variables. La composición puede aplicarse de una a varias veces diarias, y puede aplicarse durante un periodo de tiempo corto o largo. La utilización puede durar días o semanas. Cualquier forma de dosificación empleada debe proporcionar un número mínimo de unidades para una cantidad mínima de tiempo. La concentración de las unidades activas de un péptido quimérico que se cree que proporcionan una cantidad o dosificación eficaz de una enzima puede estar en el intervalo de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 unidades/ml hasta aproximadamente 10.000.000 unidades/ml de la composición, en un intervalo de aproximadamente 1000 unidades/ml a aproximadamente 10.000.000 unidades/ml, y de aproximadamente 10.000 a 10.000.000 unidades/ml.

Además, pueden emplearse una serie de métodos para ayudar a transportar la enzima a través de la membrana celular. La enzima puede ser transportada en un liposoma, "insertándose" la enzima en los liposomas por medio de técnicas conocidas. De modo similar, la enzima puede estar dentro de una micela inversa. La enzima también puede

pegilarse, uniendo el polietilenglicol a la parte no activa de la enzima. Como alternativa, pueden emplearse moléculas hidrófobas para transportar la enzima a través de la membrana celular. Por último, puede emplearse la glicosilación de la enzima para el transporte dirigido a receptores de internalización específicos sobre la membrana de la célula.

- 5 Otra realización preferida proporciona una composición que comprende una proteína de unión bacteriana de lisina quimérica de *Staphylococcus*, tal como una lisina de SEQ ID NO:2 (ClyS), junto con otras enzimas líticas que son útiles para desinfectar o descontaminar superficies porosas, por ejemplo, tejidos, alfombras. Además, la composición de enzimas líticas puede emplearse para descontaminar áreas de examen o quirúrgicas veterinarias, cuando se crea que dichas áreas alojen organismos infecciosos susceptibles para la actividad bacteriostática o bactericida.
- 10 En otra realización preferida, una lisina quimérica de *Staphylococcus*, tal como una lisina de SEQ ID NO:2 (ClyS), puede combinarse con otros agentes bacteriostáticos o bactericidas útiles para la descontaminación de superficies sólidas inanimadas que se sospecha que contienen bacterias infecciosas, o para la descontaminación de superficies porosas.

### Ejemplos

#### 15 **Ejemplo 1: Identificación de péptidos de unión específica y desarrollo de lisinas quiméricas**

Los inventores realizaron búsquedas de dominios conservados de secuencias de proteínas de lisina de fagos y profagos específicas de *Staphylococcus* en la base de datos de the National Center for Biotechnology Information. Las lisinas se clasificaron basándose en la homología con dominios conocidos en la base de datos. Se identificaron varias lisinas, que incluyen la lisina phiNM3 del fago de *S. aureus* (n.º de registro de la proteína YP\_908849), la amidasa phi13 de profago de *S. aureus* (n.º de registro NP\_803402), la amidasa MW2 del profago de *S. aureus* (n.º de registro NP\_646703.1 ), etc., que comparten 100% de identidad de secuencia entre sí y que presentan un dominio CHAP conservado dentro de su dominio catalítico. Sin embargo, el dominio C-terminal de estas lisinas no muestra homología con ninguno de los dominios conocido en la base de datos (figura 1).

Puesto que los intentos por expresar una lisina estafilocócica nativa no tuvieron éxito, los inventores decidieron desarrollar lisinas quiméricas aprovechando la naturaleza modular de las lisinas. Tradicionalmente, las lisinas específicas de *Bacillus* se expresan a niveles elevados y son solubles en *E. coli*. Por tanto, el primer intento de los inventores consistió en modificar un péptido de 16 aminoácidos (4) que está conservado en varias lisinas específicas de *S. aureus* (Lu J.Z., Fujiwara T., Komatsuzawa H., Sugai M., Sakon J., 2006, Cell wall-targeting domain of glycyglycine endopeptidase distinguishes among peptidoglycan cross-bridges, (Lue *et al.* (2006), J. Biol. Chem., 281(1):549-558). Se empleó el dominio catalítico de la lisina PlyB específica de *Bacillus* para generar la quimera AD 103 (figura 4) (SEQ ID NO:13). Las quimeras se ensayaron para la expresión, la solubilidad y la actividad. Después, el dominio CWT C-terminal completo de PlyB (6) fue reemplazado por el dominio C-terminal putativo de la lisina Twort del fago de *S. aureus* (8) para obtener AD 105 (SEQ ID NO:14). Esta quimera no es activa, de modo que se modificó el dominio CWT de lisostafina (10) cadena abajo del dominio catalítico de PlyB (2) para obtener AD 107 (SEQ ID NO:15). Aunque esta quimera sí presenta expresión, su solubilidad es mala y no tiene actividad. La siguiente etapa consistió en modificar un dominio de amidasa de la autolisina de *S. epidermidis* (12) cadena arriba del dominio CWT de lisostafina (10) para obtener AD 112 (SEQ ID NO:4). AD 112 se expresa muy bien y además la proteína también es muy soluble, pero no presenta actividad lítica. Sin embargo, se observó que las células de *S. aureus* se agrupan cuando se exponen a AD 112. Puesto que el dominio catalítico de lisostafina (una amidasa) (10) en AD 112 es de origen bacteriano, se intentó modificar un dominio catalítico derivado de fago cadena arriba del CWT de lisostafina. Para esto, se empleó el dominio de endopeptidasa en la lisina Twort (14) para construir la quimera AD 119 (SEQ ID NO:3). Se observó una mala expresión para AD 119 pero la quimera era soluble. Aunque en los ensayos líticos realizados por los inventores AD 119 por sí sola no mostró una actividad significativa, cuando se combina con la quimera AD 112 la actividad aumenta significativamente. Puesto que los inventores identificaron el dominio CWT de phiNM3 a partir de sus búsquedas de dominios conservados y además observaron que CWT de phiNM3 muestra una unión específica de *Staphylococcus*, se construyeron las quimeras AD 126 (SEQ ID NO:16) y AD 127 (SEQ ID NO:2) modificando el dominio de amidasa de la autolisina de *S. epidermidis* (12) y el dominio de endopeptidasa de la lisina Twort (14) cadena arriba del dominio CWT de phiNM3 (2) (SEQ ID NO:1), respectivamente. La quimera AD 126 no presenta expresión ni actividad, pero AD 127 es soluble y presenta una actividad muy alta pero una expresión baja (figura 4). Para superar la baja expresión de la construcción AD 127, el gen quimérico completo se clonó en el vector de expresión pJML6 para generar pAD 138. La expresión, la solubilidad y la actividad de AD 127 procedente de la construcción pAD138 son muy altas. Por tanto, esta quimera se denominó 'ClyS' por "Chimeric lysin for *Staphylococcus*" (lisina quimérica para *Staphylococcus*). La secuencia de aminoácidos de ClyS (es decir, SEQ ID NO:2) se proporciona en la figura 5A.

#### 55 **Ejemplo 2: Construcción de la lisina quimérica ClyS**

Se conservaron cepas bacterianas (tabla 1) a -80 °C y se cultivaron del modo habitual a 37 °C. Las cepas estafilocócicas empleadas en este estudio se cultivaron en medio de caldo de cultivo de triptacasa-soja (TSB), las cepas estafilocócicas se cultivaron en medio THY (caldo de cultivo de Todd-Hewitt, extracto de levadura al 1% en p/vol), *B. cereus* y *P. aeruginosa* se cultivaron en medio BHI (infusión de cerebro-corazón), mientras que *E. coli* se

cultivó en medio LB (Luria Bertani).

La lisina quimérica se construyó amplificando y acoplado dominios individuales procedentes de sus respectivos genes. Para esto, el dominio de endopeptidasa de Twort se amplificó con PCR a partir del plásmido pCR2.1 plyTW que contiene el gen de lisina entero (plyTW) empleando los cebadores TW-Endo-NcoI-F: 5'-CTAGCCATGGAAACCCTGAAACAAGCAG-3' (SEQ ID NO:5) y TW-Endo-PstI-R: 5'-ACATGCTGCAGAACCATATTGTAATTAATATTAGTTCTATC-3' (SEQ ID NO:6). El dominio dirigido a la pared celular (CWT) se amplificó con PCR a partir del ADN genómico de *S. aureus* de la cepa 8325 empleando los cebadores NM3-CBD-PstI-F: 5'-ACATGCTGCAGGGTAAATCTGCAAGTAAAATAACAG-3' (SEQ ID NO:7) y NM3-CBD-Hind-R: 5'-CCCAAGCTTAAAACACTTCTTTCACAATCAATCTC-3' (SEQ ID NO:8). Los dos amplicones de PCR se acoplaron empleando el sitio de endonucleasa de restricción PstI. El producto acoplado se clonó en el vector pBAD24 empleando los sitios de clonación NcoI-HindIII para generar el plásmido recombinante pAD127. En la segunda etapa, el fragmento de ADN completo que se corresponde con clyS se amplificó con PCR empleando los cebadores NM3-Lys-Xba-F: 5'-CTAGTCTAGAGGTGGAATAATGAAAACATACAGTGAAGCAAG-3' (SEQ ID NO:9) y el cebador NM3-CBD-Hind-R (SEQ ID NO:8). El producto de la PCR se clonó en el vector de expresión pJML6 para generar pAD138. La secuencia de ClyS se confirmó mediante secuenciación. El plásmido recombinante pAD138 se transformó en células de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

### Ejemplo 3: Sobreexpresión y purificación de ClyS

ClyS fue inducida durante la noche de células *E. coli* DH5 $\alpha$  (pAD138) con lactosa (concentración final de 10 g/500 ml) a 30 °C. Las células se recolectaron mediante centrifugación, se resuspendieron en tampón A (tampón fosfato (PB) 20 mM, DTT (ditiotreitól) 1 mM) y se lisaron mediante un homogeneizador de alta presión EmulsiFlex-C5 (Avestin) a 40 °C. Los lisados se aclararon mediante centrifugación (2x 50.000 x g) durante 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante se aplicó a una columna de CM-Sepharose (Amersham Pharmacia, Piscataway, N. J.). La ClyS fue eluida con tampón A + NaCl 1 M empleando un gradiente lineal de B al 0-50% en 15 volúmenes de columna. Las fracciones se analizaron para la actividad lítica tal como se ha descrito previamente (Daniel *et al.*, 2001). Las fracciones que muestran actividad lítica se reunieron y se dializaron durante la noche contra tampón B (PB, DTT 1 mM, NaCl 50 mM). La muestra dializada se aplicó a una columna de hidroxilapatito (MacroPrep Typell 40  $\mu$ m, BioRad) y se eluyó con tampón de elución (PB 500 mM + NaCl 50 mM + DTT 1 mM) empleando un gradiente lineal de B al 0-100% en 20 volúmenes de columna. Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE y para la actividad lítica. Las fracciones limpias activas de ClyS se reunieron y se dializaron contra el tampón B. Se determinó la concentración de proteínas con el método BCA (Sigma, St. Louis, MO).

### Ejemplo 4: Cuantificación de la actividad de ClyS

Se midió la actividad de ClyS tal como se ha descrito previamente (Daniel *et al.*, 2001), con algunas modificaciones. Brevemente, la cepa de *S. aureus* 8325-4 se cultivó hasta una DO<sub>600</sub> de 0,25-0,3, se centrifugó y se resuspendió en PB hasta una DO<sub>600</sub> final de 0,8-1,0. Se añadieron diluciones en serie en dos veces de ClyS purificada (100  $\mu$ l) a 100  $\mu$ l de la suspensión bacteriana en placas de 96 pocillos (Costar) y se controló la disminución de la DO<sub>600</sub> mediante un espectrofotómetro Spectramax Plus 384 (Molecular Devices) a lo largo de 30 min a 37 °C. La actividad de ClyS en unidades por mililitro se define como la recíproca de la dilución más alta de lisina que disminuye la absorbancia en 50% en 15 minutos.

### Ejemplo 5: Medición de la actividad de ClyS *in vitro*

El ensayo de viabilidad de ClyS se ensayó tal como se ha descrito previamente (Nelson *et al.*, 2001). Brevemente, cultivos en fase logarítmica de *S. aureus* de la cepa 8325-4 se resuspendieron en PB hasta una DO<sub>600</sub> de 0,8-1,0. Se añadieron 50 U de ClyS o el correspondiente volumen de PB a las células bacterianas y se retiraron partes alícuotas, se diluyeron en serie y se cultivaron a 1, 5, 10, 30 y 60 minutos para evaluar la viabilidad de las células tratadas y control. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se ensayó la actividad de ClyS en diversas cepas bacterianas al como se ha descrito previamente (Schuch *et al.*, 2002). Brevemente, células bacterianas en fase logarítmica se trataron con 50 U de ClyS a 37 °C durante 15 minutos. Las muestras se diluyeron en serie y se cultivaron en placa. Se realizaron experimentos control con la adición de tampón fosfato (pH 7,0) bajo las mismas condiciones.

### Ejemplo 6: Medición de la actividad de ClyS como función del pH y del perfil salino

Se determinó el efecto del pH sobre la actividad de ClyS tal como se ha descrito previamente empleando el sistema de tampón universal a pH 4-10 (Yoong *et al.*). Brevemente, células 8325-4 en fase logarítmica se resuspendieron en el sistema de tampón universal y se incubaron con 50 U de ClyS durante 15 minutos. El pH final de cada reacción se comprobó mediante papel tornasol. Las muestras se diluyeron en serie y se cultivaron en placa. En los controles, PB sustituye a ClyS.

De modo similar, se determinó el efecto de la concentración salina sobre la actividad lítica de ClyS incubando 50 U de ClyS con células 8325-4 en fase logarítmica en PB que contiene NaCl a una concentración final de 25-500 mM durante 15 minutos. Las muestras se diluyeron en serie y se cultivaron en placa para determinar los recuentos de viabilidad.

**Ejemplo 7: Microscopía de ClyS**

Se cultivó *S. aureus* de la cepa 8325-4 hasta la fase logarítmica, se centrifugó y se resuspendió en PBS hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 1,0. La suspensión bacteriana se incubó con 50 U de ClyS a temperatura ambiente. La reacción lítica se terminó después de 1 minuto y 5 minutos mediante la adición de glutaraldehído (concentración final del 2,5%). La suspensión se sedimentó mediante centrifugación y se cubrió con glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,4). Después las muestras se postfijaron en tetróxido de osmio al 1%, se tiñeron en bloque con acetato de uranilo y se procesaron según procedimientos convencionales en The Rockefeller University Electron Microscopy Service.

Se realizaron análisis de marcaje fluorescente y unión con CWT de phiNM3. Se empleó el ADN genómico de *S. aureus* de la cepa 8325-4 para amplificar la CWT putativa de la lisina phiNM3 empleado los cebadores NM3-FWD 5'-CATGCCATGGGTAAATCTGCAAGTAAAATAACAG-3' (SEQ ID NO:10) y NM3-REV 5'-CCCAAGCTTAAAACACTTCTTTACAATCAATCTC-3' (SEQ ID NO:11). El amplicón resultante se clonó en el vector de expresión inducible por arabinosa pBAD24. Los clones positivos que contenían el inserto se confirmaron mediante secuenciación. Se expresó la proteína CWT de phiNM3 de aproximadamente 10 kDa y la proteína se purificó mediante una cromatografía de intercambio catiónico en una etapa. La proteína purificada (1 mg/ml) se incubó con 10 µl de FITC (1 mg/ml) durante 1 hora. El exceso de FITC se retiró con una columna desaladora. La proteína marcada (50 µg) se incubó con células bacterianas durante 10 minutos, se lavó 3x con disolución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) y se observó bajo un microscopio de fluorescencia.

**Ejemplo 8: Medición de la actividad de ClyS *in vivo***

Una cepa de MRSA se cultivó hasta la fase logarítmica, se centrifugó y se resuspendió hasta alcanzar una titulación predefinida de aproximadamente 10<sup>10</sup> cfu/ml. Para la infección intranasal, ratones hembra de 6 semanas de edad C57BL/6J, Swiss exogámicos o BALB/c (intervalo de peso de 22 a 24 g, Charles River Laboratories, Wilmington, MA) se anestesiaron con una mezcla de quetamina (Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA, 1,2 mg/animal) y xilazina (Miles Inc., Shawnee Mission, KS, 0,25 mg/animal), y se inocularon con 15 µl de la suspensión bacteriana por orificio nasal (n = 10). Los animales se dividieron en 2 grupos y se les administraron diversas concentraciones de ClyS o disolución salina estéril por vía intraperitoneal seis horas después de la infección y posteriormente cada seis horas durante 3 días. La tasa de supervivencia para cada grupo se observó hasta 7 días después de la infección. Para la inyección intraperitoneal, los ratones se infectaron por vía intraperitoneal con 100 µl de la suspensión bacteriana (n = 10). Los animales se dividieron en 2 grupos y se les administraron diversas concentraciones de ClyS o disolución salina estéril por vía intraperitoneal seis horas después de la infección y posteriormente cada seis horas durante 3 días. La tasa de supervivencia para cada grupo se observó hasta 7 días después de la infección.

**Ejemplo 9: La región del conector por sí misma no confiere solubilidad a una quimera**

Puesto que la construcción de ClyS fue la única quimera que era muy soluble y activa con estafilococos, los inventores establecieron la hipótesis de que la región del conector, que comprende los restos aminoácidos 142 a 185 de ClyS, puede ser fundamental para la solubilidad. Previamente, los inventores habían clonado y expresado la lisina phiNM3 nativa y habían observado que la proteína era insoluble. Para ensayar esta hipótesis, se substituyó el dominio de endopeptidasa de ClyS por el dominio amidasa de la lisina phiNM3 cadena arriba de la región del conector de ClyS (ami-conec-ClyS) y se expresó la quimera (los datos no se muestran). Se observó que, de modo similar a la lisina phiNM3 nativa, la quimera ami-conec-ClyS es insoluble y se expresa como cuerpos de inclusión. También se ensayaron los lisados de ami-conec-ClyS para la actividad contra estafilococos y no se observó actividad lítica, lo cual confirma que la proteína es insoluble y, por tanto, inactiva. Así, es la combinación exclusiva de los dominios N- y C-terminales que son el objeto de esta patente lo que permite la aparición de un complejo soluble y que este se comporte como se describe en la presente.

**Ejemplo 10: Descolonización nasal *in vivo* de MRSA por ClyS**

El transporte de MSSA y MRSA en las fosas nasales anteriores humanas es el principal reservorio para la infección por *S. aureus*. Estudios han demostrado que aproximadamente 80% de la población puede estar colonizada nasalmente por *S. aureus*, y que la colonización puede ser un factor de riesgo mayor para desarrollar otras infecciones por *S. aureus* más graves (Kluytmans, J., A. van Belkum, 1997, Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks, Clin. Microbiol. Rev., 10(3):505-520). Por tanto, la eliminación del transporte nasal en el entorno extrahospitalario u hospitalario probablemente podría reducir el riesgo de infección y frenar la propagación de *S. aureus* resistente a fármacos (Kluytmans *et al.* (1997)). Para estudiar el potencial de ClyS para reducir la colonización de MRSA de la mucosa nasal, ratones C57BL/6J fueron inoculados por vía intranasal con aproximadamente 2 x 10<sup>7</sup> de una cepa espontáneamente resistente a estreptomina de MRSA (191-SM<sup>R</sup>). Veinticuatro horas después de la infección, los ratones recibieron tres dosis cada hora de disolución salina tamponada con fosfato (control) o ClyS (960 µg) en los conductos nasales. Una hora después del último tratamiento, los ratones fueron sacrificados y las colonias bacterianas fueron enumeradas en agar Spectra MRSA (un medio cromogénico selectivo desarrollado para detectar diagnósticamente la colonización nasal de MRSA) y agar de sangre Columbia. No se obtuvieron diferencias significativas en las CFU entre el cultivo en agar Spectra MRSA o agar de sangre Columbia (los datos no se muestran). Se realizaron tres experimentos

independientes para evaluar un total de 20 ratones para cada grupo de tratamiento (figura 11). Comparado con el control con tampón solo (promedio de 12.273 CFU/cavidad), el tratamiento con ClyS (promedio de 1.198 CFU/cavidad) redujo significativamente ( $p < 0,001$ ) el promedio de CFU en la mucosa nasal.

#### Ejemplo 11: Tratamiento con ClyS de infecciones de MRSA sistémicas

5 Para evaluar si el tratamiento con ClyS puede evitar la muerte que resulta de infecciones de MRSA sistémicas, ratones de 4 semanas de edad FVB/NJ fueron inyectados por vía intraperitoneal con aproximadamente  $5 \times 10^5$  CFU de MRSA de la cepa MW2 adquirida en un entorno extrahospitalario en mucina al 5%. Unos experimentos preliminares determinaron que  $5 \times 10^5$  CFU era 10X la dosis  $DL_{100}$  para un periodo de veinticuatro horas. Además, a las 3 horas de la inyección IP, la infección de MRSA se hizo sistémica, es decir, se recuperaron MRSA en gran número del corazón, hígado, bazo y riñón (los datos no se muestran). El tratamiento se produjo tres horas después de la infección con tampón fosfato 20 mM o con 1 mg de ClyS en tampón fosfato 20 mM inyectado IP (por vía intraperitoneal). Después los ratones se controlaron para la supervivencia a lo largo de diez días. Los resultados de tres experimentos independientes se reunieron (tratamiento con ClyS,  $n = 16$ ; tratamiento con tampón,  $n = 14$ ) y los datos de supervivencia de los ratones se representaron gráficamente con una curva de supervivencia de Kaplan Meier (figura 12). A las veinticuatro horas, todos los ratones control murieron de sepsis bacteriana, mientras que solo 2/16 de los ratones tratados con ClyS murieron a las cuarenta y ocho horas, y el resto de los ratones (14/16, 88%) sobrevivieron a lo largo de los experimentos (figura 12).

#### Ejemplo 12: ClyS muestra una interacción sinérgica con vancomicina y oxacilina

20 Se empleó el ensayo de microdilución de caldo de cultivo de tablero de ajedrez para ensayar la interacción de ClyS con vancomicina y con oxacilina. La CMI (concentración mínima inhibitoria) de vancomicina para la cepa VISA Mu50 es de 8  $\mu\text{g/ml}$  y la CMI de oxacilina para la cepa MRSA COL es de 32  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que la CMI de ClyS es de 6 y 8 U/ml para ambas cepas ensayadas (Mu50 y COL, respectivamente). Se representaron isobogramas para ClyS con vancomicina y ClyS con oxacilina transcribiendo las concentraciones enzimáticas a lo largo de la línea inhibitoria en la placa de microtitulación en un diagrama  $x/y$ . La forma de las curvas para ambas interacciones fueron características de una interacción sinérgica (figura 13) y esto también se confirmó calculando  $\Sigma\text{FICI}$  para ambas interacciones, que fue  $\leq 0,5$ .

#### Ejemplo 13: Sinergia *in vivo* de oxacilina y ClyS en el tratamiento de infecciones de MRSA sistémicas

30 Experimentos *in vitro* demostraron que ClyS actúa de modo sinérgico con oxacilina (figura 14). Para determinar si este efecto puede observarse en el modelo de infección de MRSA sistémica de los inventores, ratones FVB/NJ fueron inyectados por vía intraperitoneal con aproximadamente  $5 \times 10^5$  CFU de la cepa MRSA MW2 tal como se indicó anteriormente. Tres horas después de la infección, los ratones se trataron en paralelo con una dosis IP menor de 130  $\mu\text{g/ratón}$  de ClyS combinada con diferentes concentraciones de oxacilina (10-100  $\mu\text{g/ratón}$ ) o controles solo con tampón. Unos experimentos preliminares determinaron que una dosis  $DE_{30}$  de ClyS (130  $\mu\text{g/ratón}$ ) tiene una eficacia mínima para evaluar el efecto del tratamiento combinatorio con oxacilina (los datos no se muestran). Los ratones se controlaron para la supervivencia durante 10 días y los resultados de 5 experimentos independientes se reunieron y se representaron gráficamente con una curva de supervivencia de Kaplan Meier (figura 14). Mientras que solo 30% (6/20 vivos) al 35% (8/23 vivos) de los ratones sobrevivieron con tratamientos individuales de 130  $\mu\text{g/ratón}$  de ClyS o 100  $\mu\text{g/ratón}$  de oxacilina, respectivamente, ninguno de los casos se diferencia significativamente de la tasa de supervivencia del control solo con tampón, 13% (2/15 vivos). A la inversa, una única dosis del tratamiento combinado de ClyS inyectada por vía intraperitoneal (130  $\mu\text{g}$ ) con 0  $\mu\text{g}$  o 50  $\mu\text{g}$  de oxacilina inyectada por vía intramuscular aumentó significativamente la supervivencia de los ratones (80%, 8/10 vivos; 82%, 18/22 vivos, respectivamente), comparado con los tratamientos individuales y solo con tampón (figura 14).

#### Ejemplo 16: Modificación de ClyS

45 El resto  $G^{166}$  de ClyS (SEQ ID NO:2) se cambió a prolina mediante mutagénesis específica dirigida a sitio (creando pClyS). Cuando la molécula de pClyS purificada (SEQ ID NO:17) se sometió a unos estudios de estabilidad a 21 °C durante 5 días, se descubrió que pClyS era significativamente más estable en presencia de DTT 5 mM que la ClyS nativa con o sin DTT (figura 15).

#### Listado de secuencias

<110> The Rockefeller University Fischetti, Vincent A. Daniel, Anu Euler, Chad  
50 <120> Una lisina de bacteriófago quimérica con actividad contra bacterias estafilocócicas  
<130> 3268-1-007PCT  
<140> PCT/US 09/049349  
<141> 2009-07-01

ES 2 627 321 T3

<150> US 61/078,277  
<151> 2008-07-03

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

5 <210> 1  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> Fago phiNM3 de Staphylococcus aureus

<400> 1  
Gly Lys Ser Ala Ser Lys Ile Thr Val Gly Ser Lys Ala Pro Tyr Asn  
1 5 10 15

Leu Lys Trp Ser Lys Gly Ala Tyr Phe Asn Ala Lys Ile Asp Gly Leu  
20 25 30

Gly Ala Thr Ser Ala Thr Arg Tyr Gly Asp Asn Arg Thr Asn Tyr Arg  
35 40 45

Phe Asp Val Gly Gln Ala Val Tyr Ala Pro Gly Thr Leu Ile Tyr Val  
50 55 60

Phe Glu Ile Ile Asp Gly Trp Cys Arg Ile Tyr Trp Asn Asn His Asn  
65 70 75 80

10 Glu Trp Ile Trp His Glu Arg Leu Ile Val Lys Glu Val Phe  
85 90

<210> 2  
<211> 280  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> Producto quimérico de dominio Twort de bacteriófago de Staphylococcus aureus y dominio CWT de fago phiNM3de Staphylococcus aureus

# ES 2 627 321 T3

<400> 2

```

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

Thr Gly Thr Asp Phe Asp Gly Leu Tyr Gly Tyr Gln Cys Met Asp Leu
          20          25          30

Ala Val Asp Tyr Ile Tyr His Val Thr Asp Gly Lys Ile Arg Met Trp
          35          40          45

Gly Asn Ala Lys Asp Ala Ile Asn Asn Ser Phe Gly Gly Thr Ala Thr
50          55          60

Val Tyr Lys Asn Tyr Pro Ala Phe Arg Pro Lys Tyr Gly Asp Val Val
65          70          75          80

Val Trp Thr Thr Gly Asn Phe Ala Thr Tyr Gly His Ile Ala Ile Val
          85          90          95

Thr Asn Pro Asp Pro Tyr Gly Asp Leu Gln Tyr Val Thr Val Leu Glu
          100          105          110

Gln Asn Trp Asn Gly Asn Gly Ile Tyr Lys Thr Glu Leu Ala Thr Ile
          115          120          125

Arg Thr His Asp Tyr Thr Gly Ile Thr His Phe Ile Arg Pro Asn Phe
          130          135          140

Ala Thr Glu Ser Ser Val Lys Lys Lys Asp Thr Lys Lys Lys Pro Lys
          145          150          155          160

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

```

# ES 2 627 321 T3

Thr Asn Ile Asn Tyr Asn Met Val Leu Gln Gly Lys Ser Ala Ser Lys  
 180 185 190

Ile Thr Val Gly Ser Lys Ala Pro Tyr Asn Leu Lys Trp Ser Lys Gly  
 195 200 205

Ala Tyr Phe Asn Ala Lys Ile Asp Gly Leu Gly Ala Thr Ser Ala Thr  
 210 215 220

Arg Tyr Gly Asp Asn Arg Thr Asn Tyr Arg Phe Asp Val Gly Gln Ala  
 225 230 235 240

Val Tyr Ala Pro Gly Thr Leu Ile Tyr Val Phe Glu Ile Ile Asp Gly  
 245 250 255

Trp Cys Arg Ile Tyr Trp Asn Asn His Asn Glu Trp Ile Trp His Glu  
 260 265 270

Arg Leu Ile Val Lys Glu Val Phe  
 275 280

<210> 3

<211> 283

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Producto quimérico de dominio Twort de bacteriófago de Staphylococcus aureus y dominio CWT de metaloendopeptidasa lisestafina de Staphylococcus simulans

10 <400> 3

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

Thr Gly Thr Asp Phe Asp Gly Leu Tyr Gly Tyr Gln Cys Met Asp Leu  
 20 25 30

Ala Val Asp Tyr Ile Tyr His Val Thr Asp Gly Lys Ile Arg Met Trp  
 35 40 45

Gly Asn Ala Lys Asp Ala Ile Asn Asn Ser Phe Gly Gly Thr Ala Thr  
 50 55 60

# ES 2 627 321 T3

Val Tyr Lys Asn Tyr Pro Ala Phe Arg Pro Lys Tyr Gly Asp Val Val  
65 70 75 80

Val Trp Thr Thr Gly Asn Phe Ala Thr Tyr Gly His Ile Ala Ile Val  
85 90 95

Thr Asn Pro Asp Pro Tyr Gly Asp Leu Gln Tyr Val Thr Val Leu Glu  
100 105 110

Gln Asn Trp Asn Gly Asn Gly Ile Tyr Lys Thr Glu Leu Ala Thr Ile  
115 120 125

Arg Thr His Asp Tyr Thr Gly Ile Thr His Phe Ile Arg Pro Asn Phe  
130 135 140

Ala Thr Glu Ser Ser Val Lys Lys Lys Asp Thr Lys Lys Lys Pro Lys  
145 150 155 160

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

Thr Asn Ile Asn Tyr Asn Met Val Leu Gln Thr Pro Asn Thr Gly Trp  
180 185 190

Lys Thr Asn Lys Tyr Gly Thr Leu Tyr Lys Ser Glu Ser Ala Ser Phe  
195 200 205

Thr Pro Asn Thr Asp Ile Ile Thr Arg Thr Thr Gly Pro Phe Arg Ser  
210 215 220

Met Pro Gln Ser Gly Val Leu Lys Ala Gly Gln Thr Ile His Tyr Asp  
225 230 235 240

Glu Val Met Lys Gln Asp Gly His Val Trp Val Gly Tyr Thr Gly Asn  
245 250 255

Ser Gly Gln Arg Ile Tyr Leu Pro Val Arg Thr Trp Asn Lys Ser Thr  
260 265 270

Asn Thr Leu Gly Val Leu Trp Gly Thr Ile Lys  
275 280

<210> 4

5 <211> 643

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Producto quimérico de dominio de autolisina amidasa de Staphylococcus epidermidis y dominio CWT de metaloendopeptidasa lisoestafina de Staphylococcus simulans

# ES 2 627 321 T3

<400> 4

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

# ES 2 627 321 T3

Gly Thr Val Trp Thr His Ala Ala Ile Ser Asn Phe Leu Gly Gly Thr  
 165 170 175

Asp His Ala Asp Pro His Gln Tyr Leu Arg Ser His Asn Tyr Ser Tyr  
 180 185 190

Ala Glu Leu Tyr Asp Leu Ile Tyr Glu Lys Tyr Leu Ile Lys Thr Lys  
 195 200 205

Gln Val Ala Pro Trp Gly Thr Thr Ser Thr Lys Pro Ser Gln Pro Ser  
 210 215 220

Lys Pro Ser Gly Gly Thr Asn Asn Lys Leu Thr Val Ser Ala Asn Arg  
 225 230 235 240

Gly Val Ala Gln Ile Lys Pro Thr Asn Asn Gly Leu Tyr Thr Thr Val  
 245 250 255

Tyr Asp Ser Lys Gly His Lys Thr Asp Gln Val Gln Lys Thr Leu Ser  
 260 265 270

Val Thr Lys Thr Ala Thr Leu Gly Asn Asn Lys Phe Tyr Leu Val Glu  
 275 280 285

Asp Tyr Asn Ser Gly Lys Lys Tyr Gly Trp Val Lys Gln Gly Asp Val  
 290 295 300

Val Tyr Asn Thr Ala Lys Ala Pro Val Lys Val Asn Gln Thr Tyr Asn  
 305 310 315 320

Val Lys Ala Gly Ser Thr Leu Tyr Thr Val Pro Trp Gly Thr Pro Lys  
 325 330 335

Gln Val Ala Ser Lys Val Ser Gly Thr Gly Asn Gln Thr Phe Lys Ala  
 340 345 350

Thr Lys Gln Gln Gln Ile Asp Lys Ala Thr Tyr Leu Tyr Gly Thr Val  
 355 360 365

# ES 2 627 321 T3

Asn Gly Lys Ser Gly Trp Ile Ser Lys Tyr Tyr Leu Thr Thr Ala Ser  
 370 375 380

Lys Pro Ser Asn Pro Thr Lys Pro Ser Thr Asn Asn Gln Leu Thr Val  
 385 390 395 400

Ala Gly Gln Thr Ile His Tyr Asp Glu Val Met Lys Gln Asp Gly His  
 405 410 415

Thr Asn Asn Ser Gly Val Ala Gln Ile Asn Ala Lys Asn Ser Gly Leu  
 420 425 430

Tyr Thr Thr Val Tyr Asp Thr Lys Gly Lys Thr Thr Asn Gln Ile Gln  
 435 440 445

Arg Thr Leu Ser Val Thr Lys Ala Ala Thr Leu Gly Asp Lys Lys Phe  
 450 455 460

Tyr Leu Val Gly Asp Tyr Asn Thr Gly Thr Asn Tyr Gly Trp Val Lys  
 465 470 475 480

Gln Asp Glu Val Ile Tyr Asn Thr Ala Lys Ser Pro Val Lys Ile Asn  
 485 490 495

Gln Thr Tyr Asn Val Lys Pro Gly Val Lys Leu His Thr Val Pro Trp  
 500 505 510

Gly Thr Tyr Asn Gln Val Ala Gly Thr Val Ser Gly Lys Gly Asp Gln  
 515 520 525

Thr Phe Lys Ala Thr Lys Gln Gln Gln Ile Asp Lys Ala Thr Tyr Leu  
 530 535 540

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

Leu Gln Thr Pro Asn Thr Gly Trp Lys Thr Asn Lys Tyr Gly Thr Leu  
 565 570 575

Tyr Lys Ser Glu Ser Ala Ser Phe Thr Pro Asn Thr Asp Ile Ile Thr  
 580 585 590

Arg Thr Thr Gly Pro Phe Arg Ser Met Pro Gln Ser Gly Val Leu Lys  
 595 600 605

Val Trp Val Gly Tyr Thr Gly Asn Ser Gly Gln Arg Ile Tyr Leu Pro  
 610 615 620

Val Arg Thr Trp Asn Lys Ser Thr Asn Thr Leu Gly Val Leu Trp Gly  
 625 630 635 640

Thr Ile Lys

<210> 5  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Cebador PCR TW-Endo-NcoI-F

<400> 5  
 ctagccatgg aaaccctgaa acaagcag  
 28

10 <210> 6  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador PCR TW-Endo-PstI-R

15 <400> 6  
 acatgctgca gaaccatatt gtaattaata ttagttctat c  
 41

<210> 7  
 <211> 36  
 <212> DNA

20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador PCR NM3-CBD-PstI-F

<400> 7  
 acatgctgca gggtaaattct gcaagtaaaa taacag  
 36

25 <210> 8  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador PCR NM3-CBD-Hind-R

<400> 8  
 cccaagctta aaacatttct ttcacaatca atctc  
 35

35 <210> 9  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador PCR NM3-Lys-Xba-F

<400> 9  
 ctagtctaga ggtggaataa tgaaaacata cagtgaagca ag  
 42

40 <210> 10  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Cebador PCR NM3-FWD

# ES 2 627 321 T3

<400> 10  
 catgccatgg gtaaactctgc aagtaaaata acag  
 34

<210> 11

<211> 35

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador PCR NM3-REV

<400> 11  
 cccaagctta aaacacttct ttcacaatca atctc  
 35

10

<210> 12

<211> 467

<212> PRT

<213> Twort de fago de Staphylococcus

15

<400> 12  
 Met Lys Thr Leu Lys Gln Ala Glu Ser Tyr Ile Lys Ser Lys Val Asn  
 1 5 10 15

Thr Gly Thr Asp Phe Asp Gly Leu Tyr Gly Tyr Gln Cys Met Asp Leu  
 20 25 30

Ala Val Asp Tyr Ile Tyr His Val Thr Asp Gly Lys Ile Arg Met Trp  
 35 40 45

Gly Asn Ala Lys Asp Ala Ile Asn Asn Ser Phe Gly Gly Thr Ala Thr  
 50 55 60

Val Tyr Lys Asn Tyr Pro Ala Phe Arg Pro Lys Tyr Gly Asp Val Val  
 65 70 75 80

Val Trp Thr Thr Gly Asn Phe Ala Thr Tyr Gly His Ile Ala Ile Val  
 85 90 95

Thr Asn Pro Asp Pro Tyr Gly Asp Leu Gln Tyr Val Thr Val Leu Glu  
 100 105 110

Gln Asn Trp Asn Gly Asn Gly Ile Tyr Lys Thr Glu Leu Ala Thr Ile  
 115 120 125

Arg Thr His Asp Tyr Thr Gly Ile Thr His Phe Ile Arg Pro Asn Phe  
 130 135 140

Ala Thr Glu Ser Ser Val Lys Lys Lys Asp Thr Lys Lys Lys Pro Lys  
 145 150 155 160

Pro Ser Asn Arg Asp Gly Ile Asn Lys Asp Lys Ile Val Tyr Asp Arg  
 165 170 175

Thr Asn Ile Asn Tyr Asn Met Val Lys Arg Gly Tyr Asn Pro Val Gly

# ES 2 627 321 T3

180	185	190
Val Ile Leu His Asn Asp Ala Gly Ser Met Thr Gly Leu Gln Tyr Lys 195 200 205		
Asn Asn Leu Gln Asn Ala Gly Tyr Asn Arg Trp Ala Gln Gly Ile Ala 210 215 220		
His Ser Tyr Ile Ser Glu Gly Gln Val Trp Gln Ala Leu Gly Glu Ser 225 230 235 240		
Arg Ile Ala Trp His Cys Ala Asn Gln Trp Gly Asn Lys Asn Leu Tyr 245 250 255		
Gly Ile Glu Ile Cys Gln Ser Met Thr Ala Ser Asp Glu Gln Phe Leu 260 265 270		
Lys Asn Glu Gln Thr Ala Phe Tyr Glu Ala Ser Arg Met Leu Lys Lys 275 280 285		
Trp Gly Leu Lys Pro Asp Lys Asn Thr Val Arg Leu His Met Glu Tyr 290 295 300		
Tyr Gln Thr Ala Cys Pro His Arg Ser Met Lys Leu His Val Gly Lys 305 310 315 320		
Asp Pro Thr Lys Thr Ser Ile Thr Gln Ala Asp Ile Glu Lys Leu Lys 325 330 335		
Glu Tyr Phe Ile Lys Gln Ile Lys Met Tyr Tyr Glu Gly Lys Thr Pro 340 345 350		
Val Pro Thr Val Val Asn Gln Lys Ala Lys Thr Lys Pro Val Lys Gln 355 360 365		
Ser Ser Thr Ser Gly Trp Asn Val Asn Asn Tyr Gly Thr Tyr Tyr Lys 370 375 380		
Ser Glu Ser Ala Thr Phe Lys Cys Thr Ala Arg Gln Gly Ile Val Thr 385 390 395 400		

# ES 2 627 321 T3

Arg Tyr Thr Gly Pro Phe Thr Thr Cys Pro Gln Ala Gly Val Leu Tyr  
405 410 415

Tyr Gly Gln Ser Val Thr Tyr Asp Thr Val Cys Lys Gln Asp Gly Tyr  
420 425 430

Val Trp Ile Ser Trp Thr Thr Asn Gly Gly Gln Asp Val Trp Met Pro  
435 440 445

Val Arg Thr Trp Asp Lys Asn Thr Asp Ile Met Gly Gln Leu Trp Gly  
450 455 460

Asp Ile Tyr  
465

<210> 13

<211> 283

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Producto quimérico de lisina de fago específico de Bacillus

<400> 13

Met Gly Tyr Ile Val Asp Met Ser Lys Trp Asn Gly Ser Pro Asp Trp  
1 5 10 15

Asp Thr Ala Lys Gly Gln Leu Asp Leu Val Ile Ala Arg Val Gln Asp  
20 25 30

Gly Ser Asn Tyr Val Asp Pro Val Tyr Lys Asp Tyr Val Ala Ala Met  
35 40 45

Lys Ala Arg Asn Ile Pro Phe Gly Ser Tyr Ala Phe Cys Arg Phe Val  
50 55 60

Ser Val Glu Asp Ala Lys Val Glu Ala Arg Asp Phe Trp Asn Arg Gly  
65 70 75 80

Asp Lys Asp Ser Leu Phe Trp Val Ala Asp Val Glu Val Thr Thr Met  
85 90 95

# ES 2 627 321 T3

Ser Asp Met Arg Ala Gly Thr Gln Ala Phe Ile Asp Glu Leu Tyr Arg  
100 105 110

Leu Gly Ala Lys Lys Val Gly Leu Tyr Val Gly His His Lys Tyr Glu  
115 120 125

Glu Phe Gly Ala Ala Gln Ile Lys Cys Asp Phe Thr Trp Ile Pro Arg  
130 135 140

Tyr Gly Ala Lys Pro Ala Tyr Pro Cys Asp Leu Trp Gln Tyr Asp Glu  
145 150 155 160

Tyr Gly Gln Val Pro Gly Ile Gly Lys Cys Asp Leu Asn Arg Leu Asn  
165 170 175

Gly Asp Lys Ser Leu Asp Trp Phe Thr Gly Lys Gly Glu Glu Ala Val  
180 185 190

Gln Trp Asn Val Asn Asn Tyr Gly Thr Tyr Tyr Lys Ser Glu Ser Ala  
195 200 205

Val Phe Thr Leu Asp Arg Thr Ile Asn Leu Arg Thr Ala Pro Phe Pro  
210 215 220

Thr Ala Pro Leu Ile Ala Gln Leu Asn Ala Gly Asp Asn Val Thr Tyr  
225 230 235 240

Asp Gly Tyr Gly Tyr Glu Lys Asp Gly Tyr Val Trp Leu Arg Gln Asn  
245 250 255

Arg Gly Asn Gly Asn Tyr Gly Tyr Ile Ala Ser Gly Glu Thr Lys Asn  
260 265 270

Gly Gln Arg Ile Ser Thr Trp Gly Thr Phe Lys  
275 280

<210> 14

<211> 287

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Producto quimérico de dominio catalítico PlyB de lisina de fago específico de Bacillus y dominio Twort de bacteriófago de Staphylococcus aureus

## ES 2 627 321 T3

<400> 14

Met Gly Tyr Ile Val Asp Met Ser Lys Trp Asn Gly Ser Pro Asp Trp  
 1 5 10 15

Asp Thr Ala Lys Gly Gln Leu Asp Leu Val Ile Ala Arg Val Gln Asp  
 20 25 30

Gly Ser Asn Tyr Val Asp Pro Val Tyr Lys Asp Tyr Val Ala Ala Met  
 35 40 45

Lys Ala Arg Asn Ile Pro Phe Gly Ser Tyr Ala Phe Cys Arg Phe Val  
 50 55 60

Ser Val Glu Asp Ala Lys Val Glu Ala Arg Asp Phe Trp Asn Arg Gly  
 65 70 75 80

Asp Lys Asp Ser Leu Phe Trp Val Ala Asp Val Glu Val Thr Thr Met  
 85 90 95

Ser Asp Met Arg Ala Gly Thr Gln Ala Phe Ile Asp Glu Leu Tyr Arg  
 100 105 110

Leu Gly Ala Lys Lys Val Gly Leu Tyr Val Gly His His Lys Tyr Glu  
 115 120 125

Glu Phe Gly Ala Ala Gln Ile Lys Cys Asp Phe Thr Trp Ile Pro Arg  
 130 135 140

Tyr Gly Ala Lys Pro Ala Tyr Pro Cys Asp Leu Trp Gln Tyr Asp Glu  
 145 150 155 160

Tyr Gly Gln Val Pro Gly Ile Gly Lys Cys Asp Leu Asn Arg Leu Asn  
 165 170 175

Gly Asp Lys Ser Leu Asp Trp Phe Thr Gly Lys Gly Glu Glu Ala Val  
 180 185 190

# ES 2 627 321 T3

Gln Trp Asn Val Asn Asn Tyr Gly Thr Tyr Tyr Lys Ser Glu Ser Ala  
 195 200 205

Thr Phe Lys Cys Thr Ala Arg Gln Gly Ile Val Thr Arg Tyr Thr Gly  
 210 215 220

Pro Phe Thr Thr Cys Pro Gln Ala Gly Val Leu Tyr Tyr Gly Gln Ser  
 225 230 235 240

Val Thr Tyr Asp Thr Val Cys Lys Gln Asp Gly Tyr Val Trp Ile Ser  
 245 250 255

Trp Thr Thr Asn Gly Gly Gln Asp Val Trp Met Pro Val Arg Thr Trp  
 260 265 270

Asp Lys Asn Thr Asp Ile Met Gly Gln Leu Trp Gly Asp Ile Tyr  
 275 280 285

<210> 15

<211> 292

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Producto quimérico de Dominio cataítico PlyB de lisina de fago específico de Bacillus y dominio CWT de metaloendopeptidasa lisoestafina de Staphylococcus simulans

10 <400> 15

Met Gly Tyr Ile Val Asp Met Ser Lys Trp Asn Gly Ser Pro Asp Trp  
 1 5 10 15

Asp Thr Ala Lys Gly Gln Leu Asp Leu Val Ile Ala Arg Val Gln Asp  
 20 25 30

Gly Ser Asn Tyr Val Asp Pro Val Tyr Lys Asp Tyr Val Ala Ala Met  
 35 40 45

Lys Ala Arg Asn Ile Pro Phe Gly Ser Tyr Ala Phe Cys Arg Phe Val  
 50 55 60

Ser Val Glu Asp Ala Lys Val Glu Ala Arg Asp Phe Trp Asn Arg Gly  
 65 70 75 80



# ES 2 627 321 T3

<400> 16

```

Met Val Ser Ser Gln Lys Thr Ser Ser Leu Pro Lys Tyr Thr Pro Lys
1          5          10          15

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

Pro Arg Ile Glu Glu Asp Tyr Thr Ser Tyr Phe Pro Lys Tyr Gly Tyr
35          40          45

Arg Asn Gly Val Gly Arg Pro Glu Gly Ile Val Val His Asp Thr Ala
50          55          60

Asn Asp Asn Ser Thr Ile Asp Gly Glu Ile Ala Phe Met Lys Arg Asn
65          70          75          80

Tyr Thr Asn Ala Phe Val His Ala Phe Val Asp Gly Asn Arg Ile Ile
85          90          95

Glu Thr Ala Pro Thr Asp Tyr Leu Ser Trp Gly Ala Gly Pro Tyr Gly
100         105         110

Asn Gln Arg Phe Ile Asn Val Glu Ile Val His Thr His Asp Tyr Asp
115         120         125

Ser Phe Ala Arg Ser Met Asn Asn Tyr Ala Asp Tyr Ala Ala Thr Gln
130         135         140

Leu Gln Tyr Tyr Asn Leu Lys Pro Asp Ser Ala Glu Asn Asp Gly Arg
145         150         155         160

```

# ES 2 627 321 T3

Gly Thr Val Trp Thr His Ala Ala Ile Ser Asn Phe Leu Gly Gly Thr  
 165 170 175

Asp His Ala Asp Pro His Gln Tyr Leu Arg Ser His Asn Tyr Ser Tyr  
 180 185 190

Ala Glu Leu Tyr Asp Leu Ile Tyr Glu Lys Tyr Leu Ile Lys Thr Lys  
 195 200 205

Gln Val Ala Pro Trp Gly Thr Thr Ser Thr Lys Pro Ser Gln Pro Ser  
 210 215 220

Lys Pro Ser Gly Gly Thr Asn Asn Lys Leu Thr Val Ser Ala Asn Arg  
 225 230 235 240

Gly Val Ala Gln Ile Lys Pro Thr Asn Asn Gly Leu Tyr Thr Thr Val  
 245 250 255

Tyr Asp Ser Lys Gly His Lys Thr Asp Gln Val Gln Lys Thr Leu Ser  
 260 265 270

Val Thr Lys Thr Ala Thr Leu Gly Asn Asn Lys Phe Tyr Leu Val Glu  
 275 280 285

Asp Tyr Asn Ser Gly Lys Lys Tyr Gly Trp Val Lys Gln Gly Asp Val  
 290 295 300

Val Tyr Asn Thr Ala Lys Ala Pro Val Lys Val Asn Gln Thr Tyr Asn  
 305 310 315 320

Val Lys Ala Gly Ser Thr Leu Tyr Thr Val Pro Trp Gly Thr Pro Lys  
 325 330 335

Gln Val Ala Ser Lys Val Ser Gly Thr Gly Asn Gln Thr Phe Lys Ala  
 340 345 350

Thr Lys Gln Gln Gln Ile Asp Lys Ala Thr Tyr Leu Tyr Gly Thr Val  
 355 360 365

Asn Gly Lys Ser Gly Trp Ile Ser Lys Tyr Tyr Leu Thr Thr Ala Ser

# ES 2 627 321 T3

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

# ES 2 627 321 T3

Ile Asp Gly Leu Gly Ala Thr Ser Ala Thr Arg Tyr Gly Asp Asn Arg  
595 600 605

Thr Asn Tyr Arg Phe Asp Val Gly Gln Ala Val Tyr Ala Pro Gly Thr  
610 615 620

Leu Ile Tyr Val Phe Glu Ile Ile Asp Gly Trp Cys Arg Ile Tyr Trp  
625 630 635 640

Asn Asn His Asn Glu Trp Ile Trp His Glu Arg Leu Ile Val Lys Glu  
645 650 655

Val Phe

<210> 17

<211> 280

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Producto quimérico de dominio Twort de bacteriófago de Staphylococcus aureus y dominio CWT de fago phiNM3 de Staphylococcus aureus

<400> 17

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

Thr Gly Thr Asp Phe Asp Gly Leu Tyr Gly Tyr Gln Cys Met Asp Leu  
20 25 30

Ala Val Asp Tyr Ile Tyr His Val Thr Asp Gly Lys Ile Arg Met Trp  
35 40 45

Gly Asn Ala Lys Asp Ala Ile Asn Asn Ser Phe Gly Gly Thr Ala Thr  
50 55 60

Val Tyr Lys Asn Tyr Pro Ala Phe Arg Pro Lys Tyr Gly Asp Val Val  
65 70 75 80

Val Trp Thr Thr Gly Asn Phe Ala Thr Tyr Gly His Ile Ala Ile Val  
85 90 95

10

# ES 2 627 321 T3

Thr Asn Pro Asp Pro Tyr Gly Asp Leu Gln Tyr Val Thr Val Leu Glu  
 100 105 110

Gln Asn Trp Asn Gly Asn Gly Ile Tyr Lys Thr Glu Leu Ala Thr Ile  
 115 120 125

Arg Thr His Asp Tyr Thr Gly Ile Thr His Phe Ile Arg Pro Asn Phe  
 130 135 140

Ala Thr Glu Ser Ser Val Lys Lys Lys Asp Thr Lys Lys Lys Pro Lys  
 145 150 155 160

Pro Ser Asn Arg Asp Pro Ile Asn Lys Asp Lys Ile Val Tyr Asp Arg  
 165 170 175

Thr Asn Ile Asn Tyr Asn Met Val Leu Gln Gly Lys Ser Ala Ser Lys  
 180 185 190

Ile Thr Val Gly Ser Lys Ala Pro Tyr Asn Leu Lys Trp Ser Lys Gly  
 195 200 205

Ala Tyr Phe Asn Ala Lys Ile Asp Gly Leu Gly Ala Thr Ser Ala Thr  
 210 215 220

Arg Tyr Gly Asp Asn Arg Thr Asn Tyr Arg Phe Asp Val Gly Gln Ala  
 225 230 235 240

Val Tyr Ala Pro Gly Thr Leu Ile Tyr Val Phe Glu Ile Ile Asp Gly  
 245 250 255

Trp Cys Arg Ile Tyr Trp Asn Asn His Asn Glu Trp Ile Trp His Glu  
 260 265 270

Arg Leu Ile Val Lys Glu Val Phe  
 275 280

## REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una lisina de bacteriófago quimérica que comprende un dominio catalítico de una primera lisina de fago específica de *Staphylococcus* y un dominio de unión de una segunda lisina de fago específica de *Staphylococcus*, en la que el dominio de unión no es un dominio dirigido a la pared celular similar a SH3b.
- 2.- La lisina quimérica de la reivindicación 1, en la que la lisina de bacteriófago quimérica presenta una actividad de destrucción contra *Staphylococcus aureus*, tal como cepas resistentes a meticilina y sensibles a meticilina de *S. aureus*.
- 10 3.- La lisina quimérica de la reivindicación 1 o 2, en la que el dominio de unión comprende la secuencia de polipéptido de SEQ ID NO:1, o uno de sus variantes que tenga al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO:1.
- 4.- La lisina quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el dominio catalítico es el dominio de endopeptidasa de Twort.
- 15 5.- La lisina quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la lisina de bacteriófago comprende la secuencia de polipéptido de SEQ ID NO:2, o uno de sus variantes que tenga al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO:2.
- 6.- La lisina quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que presenta una actividad de destrucción contra múltiples especies estafilocócicas, tales como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.
- 20 7.- La lisina quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que presenta una actividad de destrucción contra bacterias estafilocócicas a través de un intervalo de pH de aproximadamente 4-10.
- 8.- La lisina quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la lisina tiene una solubilidad de al menos aproximadamente 3 mg/ml en disolución salina tamponada con fosfato (PBS).
- 9.- Una lisina quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en el tratamiento de un mamífero con una infección estafilocócica.
- 25 10.- Una lisina quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en la prevención de una infección de un mamífero colonizado por estafilococos.
- 11.- Una lisina quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en la descolonización de *S. aureus*.
- 30 12.- Una lisina quimérica para su uso según la reivindicación 11, en la que la descolonización es una descolonización nasal.
- 13.- Una lisina quimérica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que la lisina se administra en combinación con un antibiótico.
- 14.- Una lisina quimérica para su uso según la reivindicación 13, en la que el antibiótico es vancomicina u oxacilina.
- 35 15.- Una composición farmacéutica que comprende una lisina quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 mezclada con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 16.- Una composición farmacéutica según la reivindicación 15 que comprende además vancomicina u oxacilina.
- 17.- Una composición farmacéutica según la reivindicación 15 que se formula para la administración tópica, ocular, nasal, pulmonar, bucal, parenteral, oral, vaginal o rectal.
- 40 18.- Una composición farmacéutica según la reivindicación 17 que se formula para la administración tópica o para la administración intranasal u oral mediante inhalación.
- 19.- Una composición antimicrobiana para desinfectar o descontaminar superficies porosas o no porosas que comprende una lisina de bacteriófago quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 45 20.- Un método para descontaminar superficies inanimadas sospechosas de contener bacterias infecciosas, que comprende el tratamiento de dichas superficies con una cantidad bactericida o bacteriostáticamente eficaz de la composición de la reivindicación 19.

Figura 1

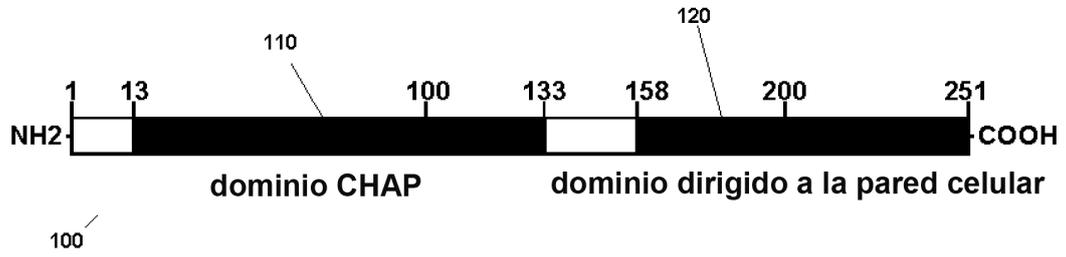
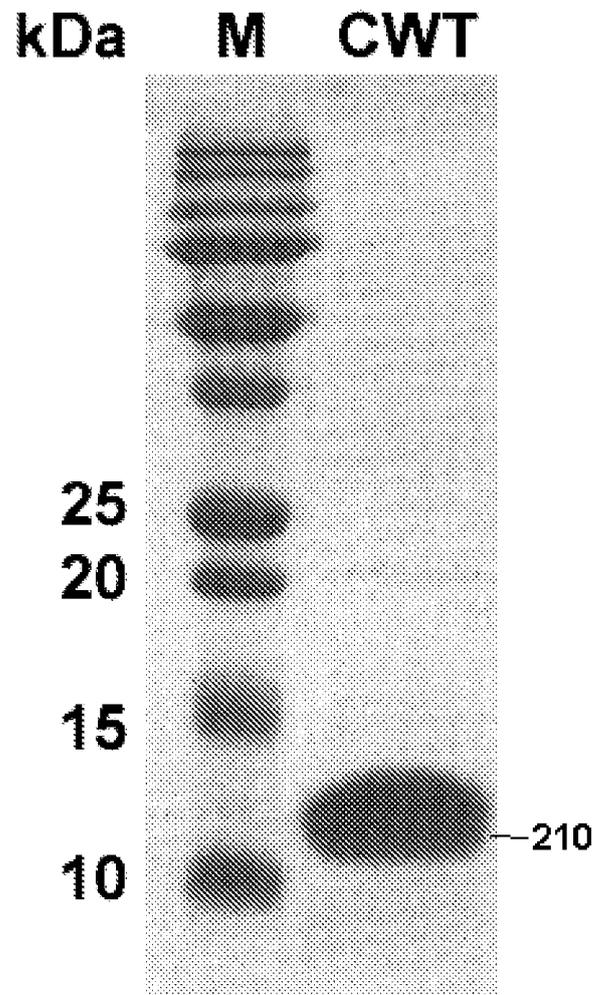


Figura 2A



**Figura 2B**

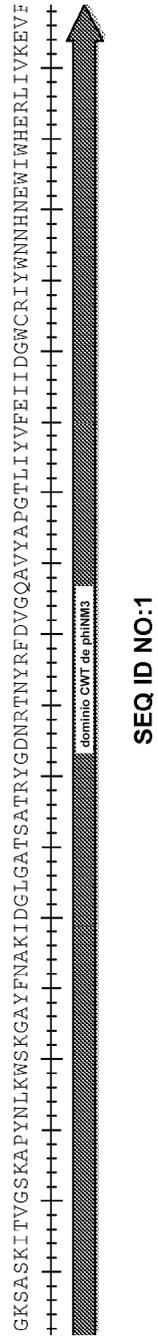


Figura 3

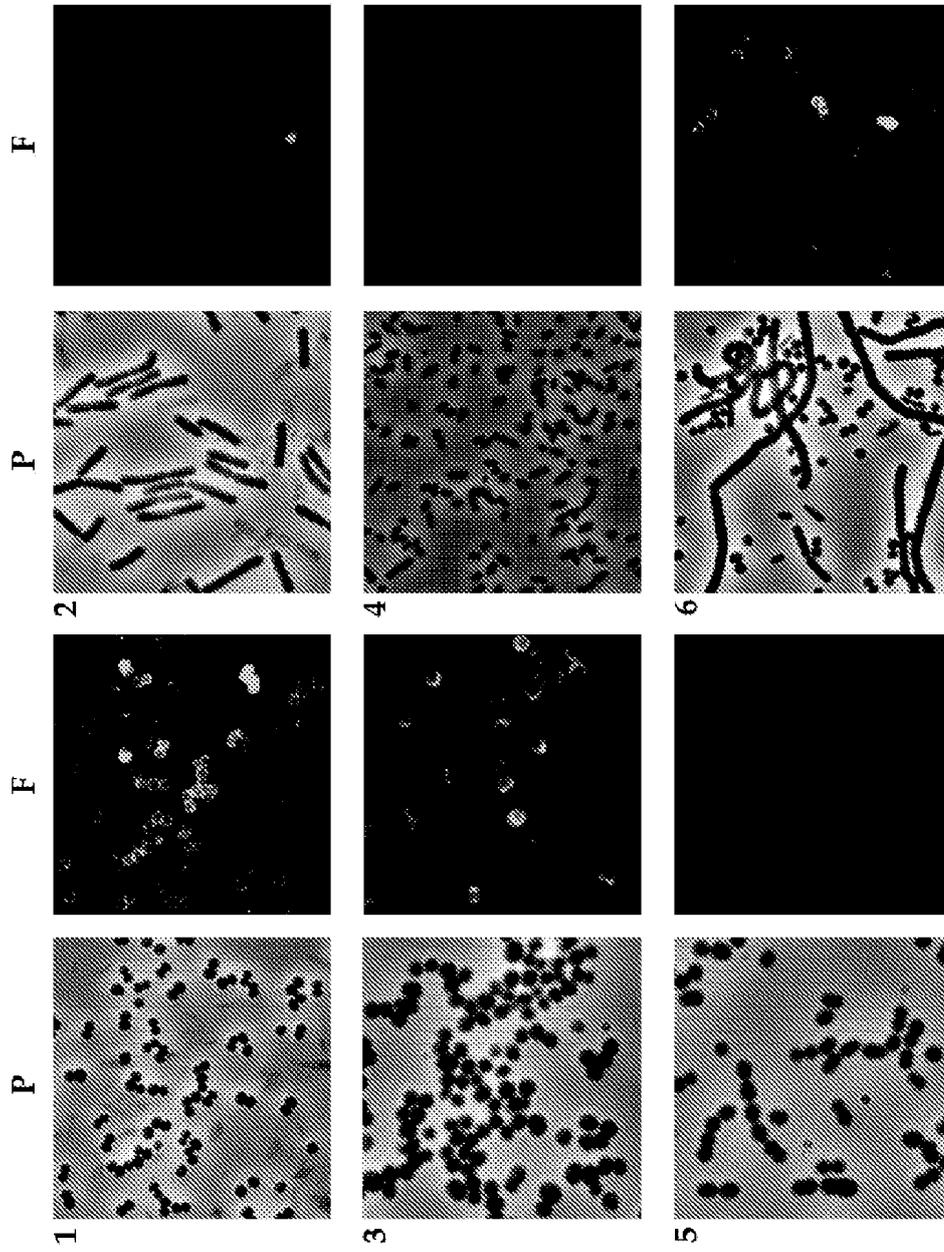


Figura 4

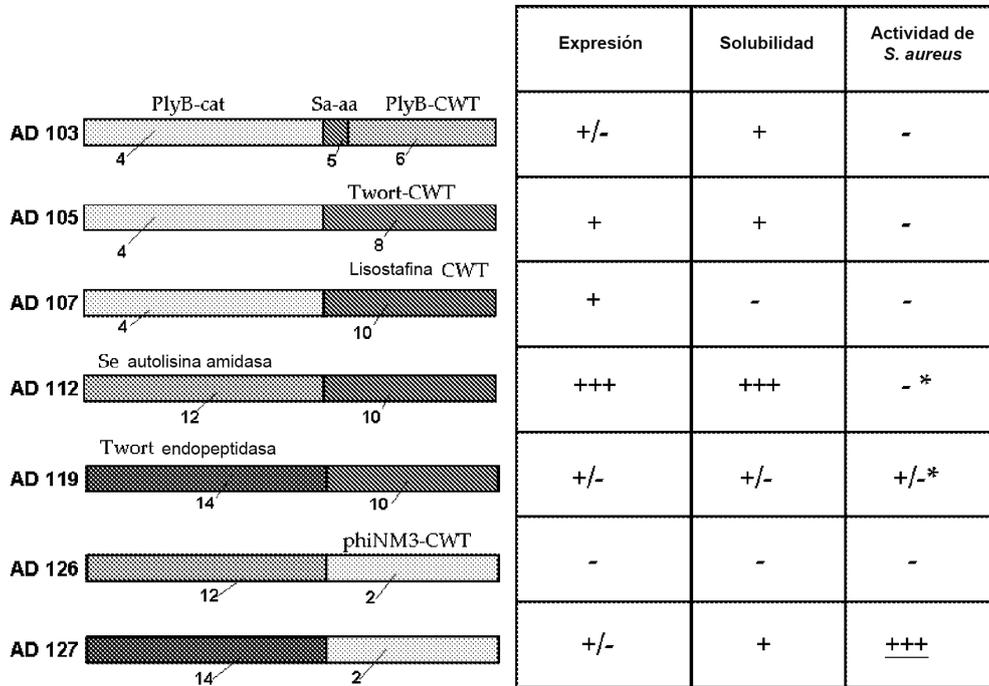
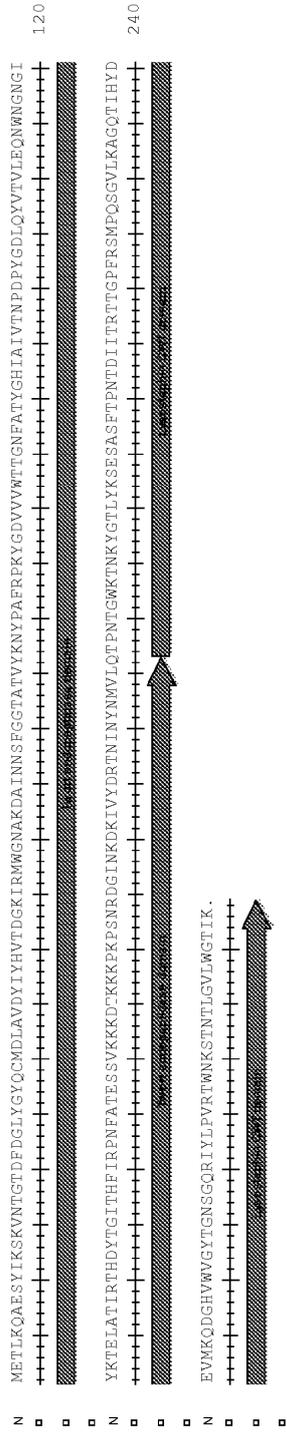


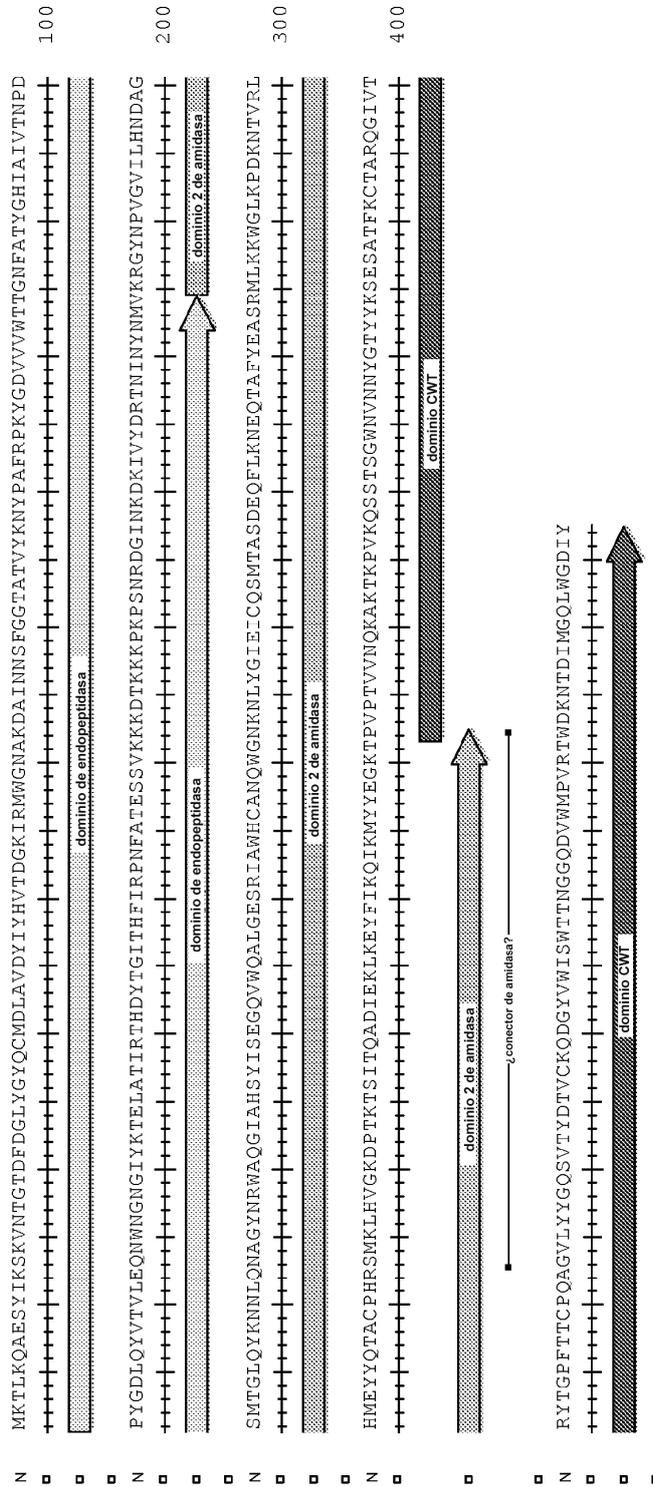


Figura 5B

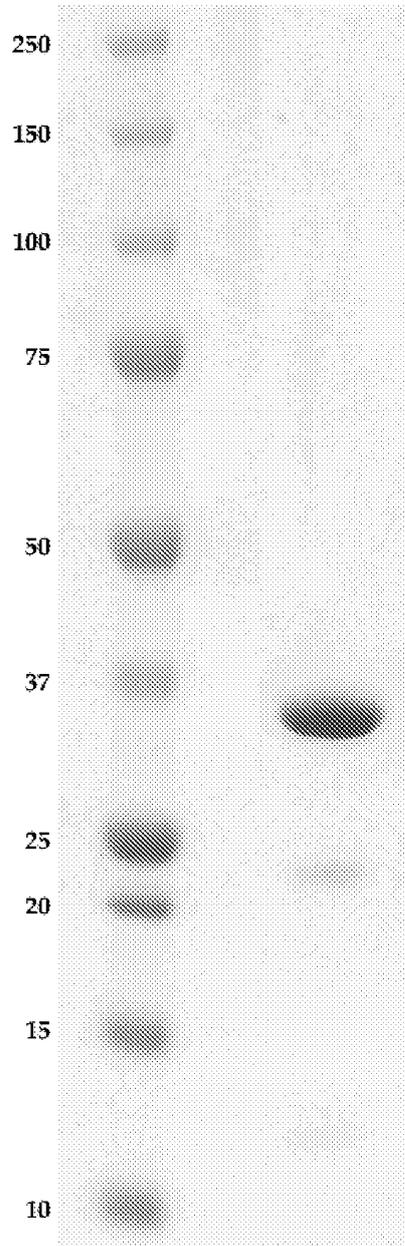


SEQ ID NO:3 (AD119)

Figura 5C  
(lisina Twort nativa)



**Figura 6**



**Figura 7**  
**Viabilidad y ensayo lítico**

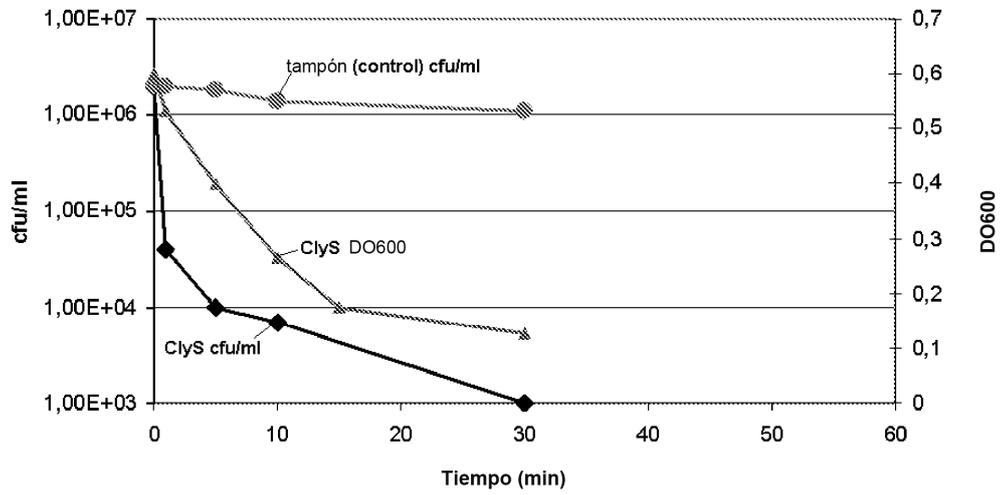


Figura 8

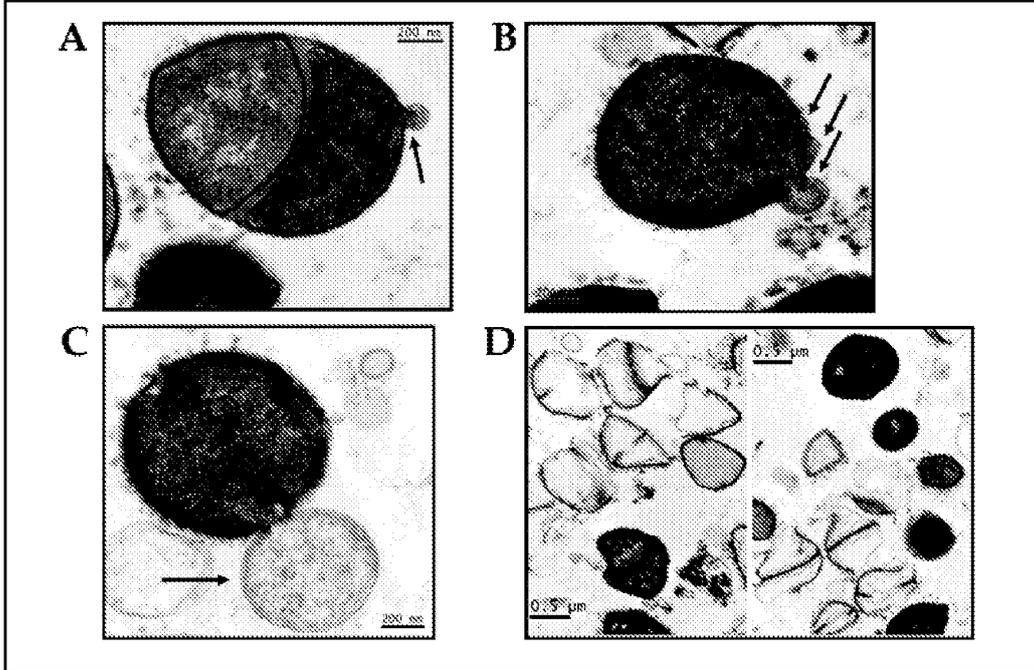


Figura 9A

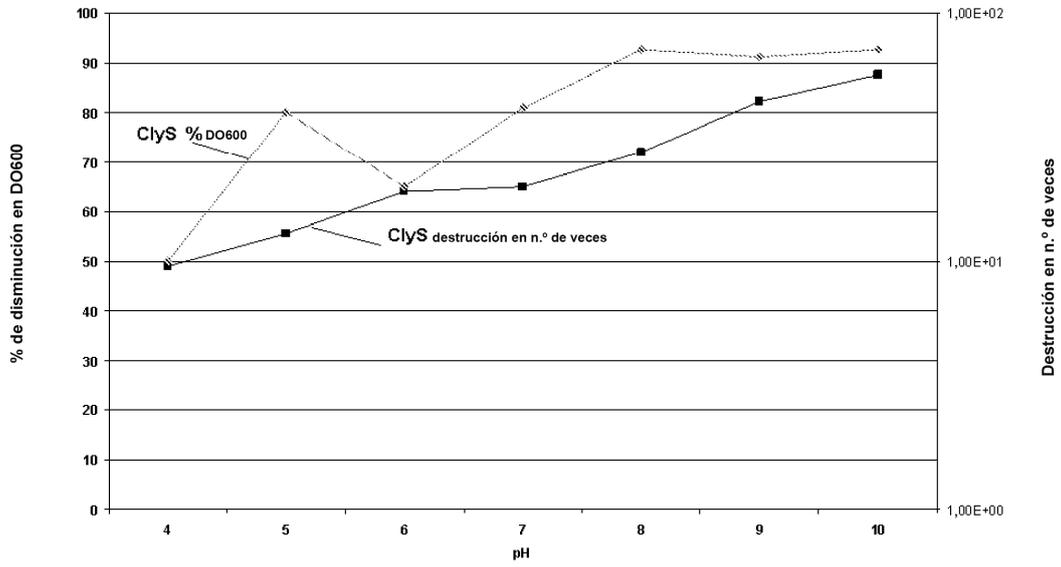


Figura 9B

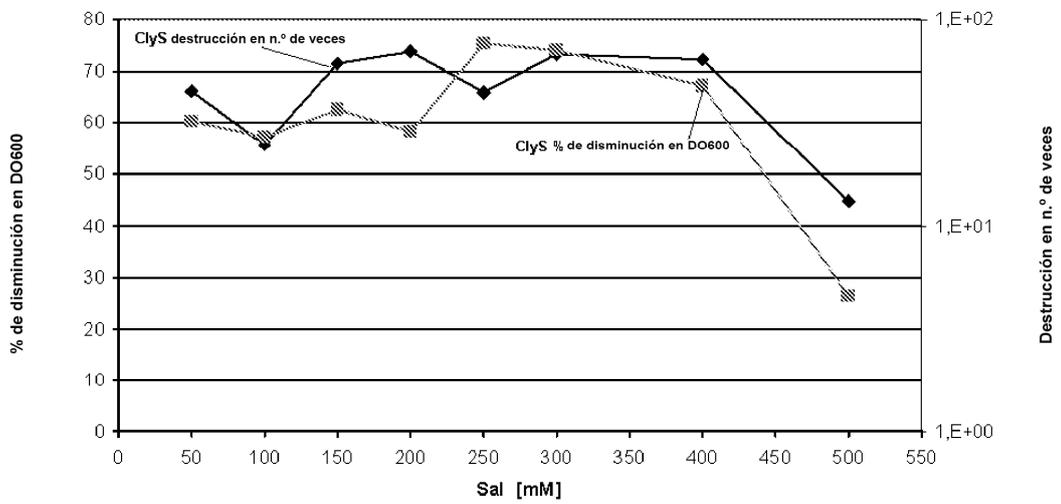


Figura 10

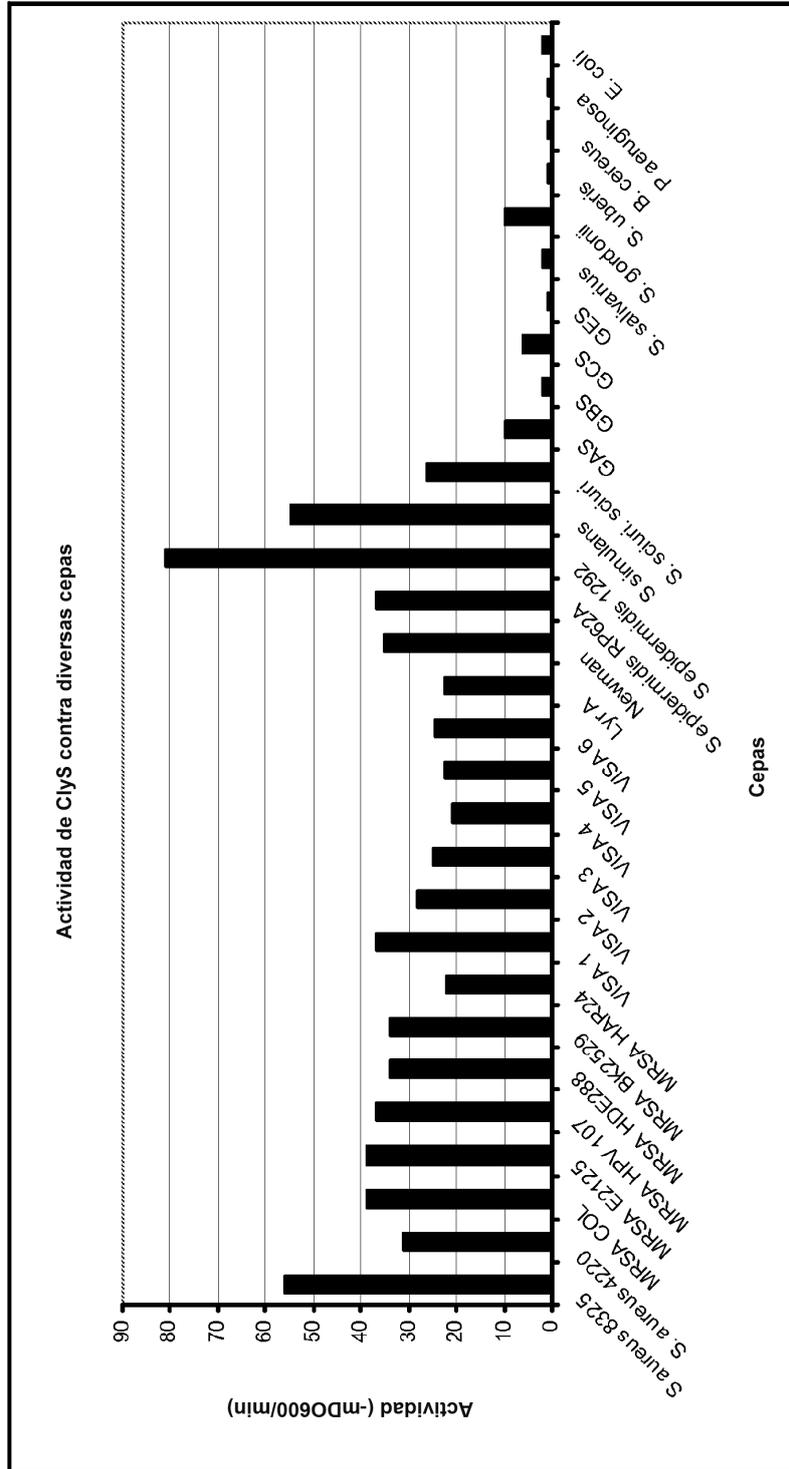




Figura 12

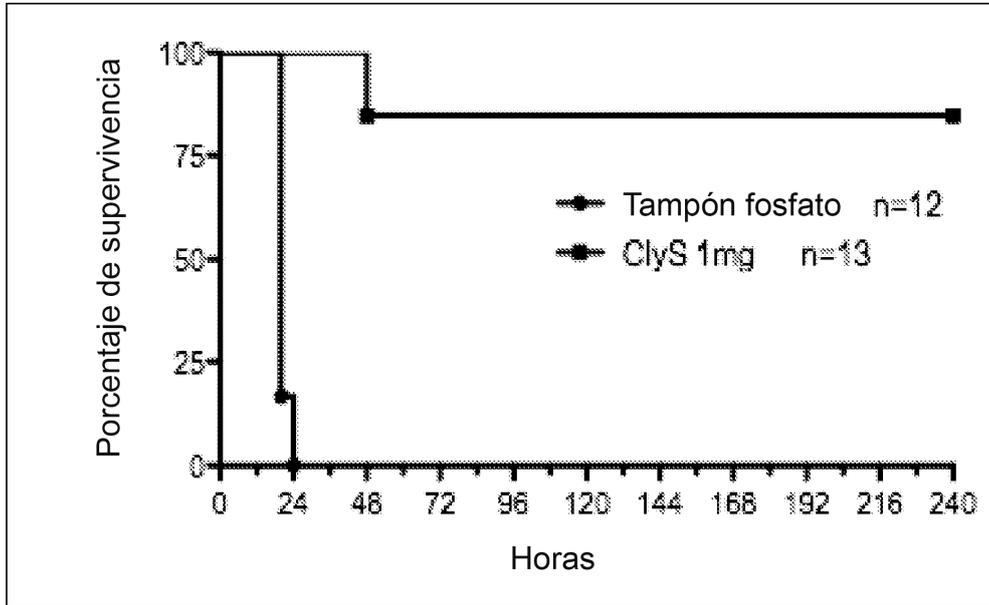


Figura 13

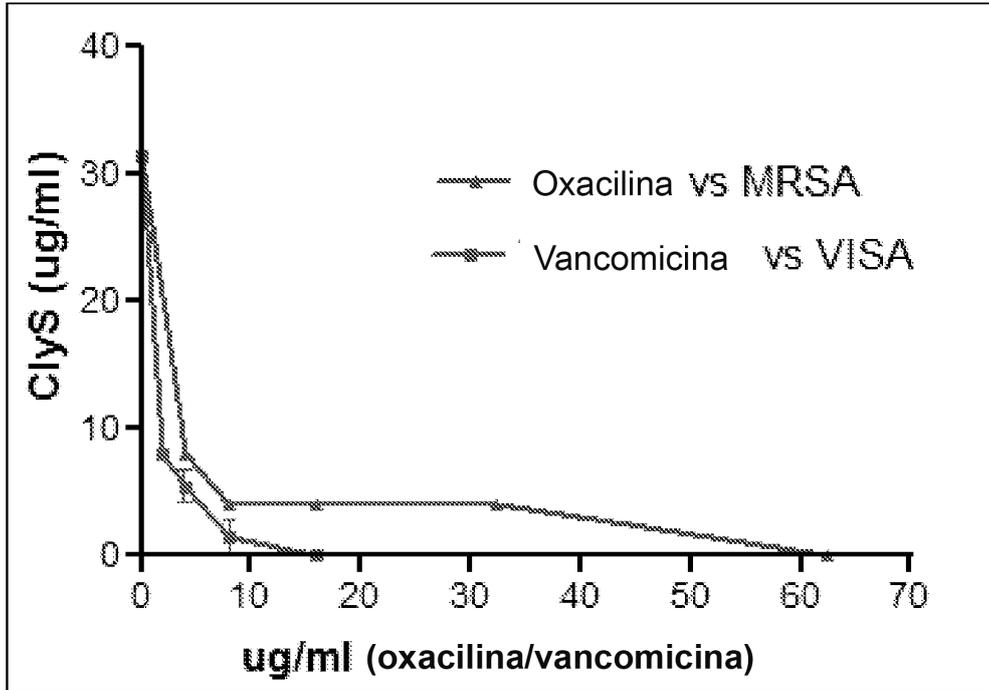


Figura 14

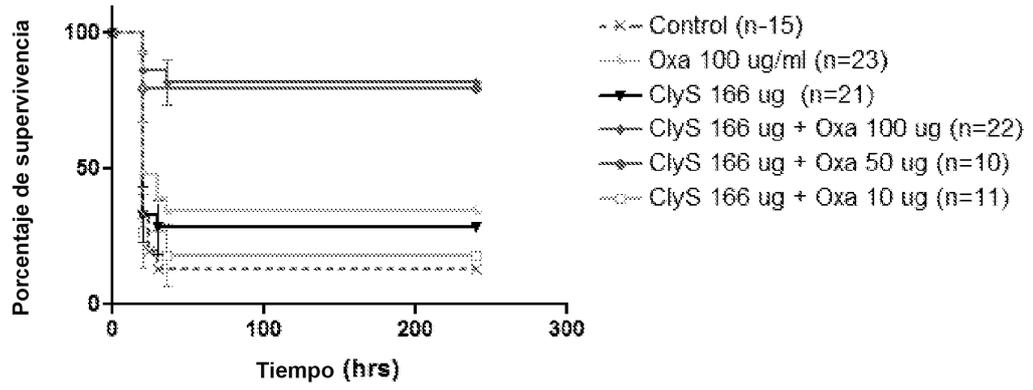


Figura 15

