

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 821**

51 Int. Cl.:

C12N 9/36 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/31 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2015** **E 15185337 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018** **EP 3144387**

54 Título: **Nuevo polipéptido de endolisina**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.04.2018

73 Titular/es:

MICREOS HUMAN HEALTH B.V. (100.0%)
Bankplein 2
2585 EV Den Haag, NL

72 Inventor/es:

LOESSNER, MARTIN JOHANNES y
EICHENSEHER, FRITZ

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 665 821 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

Nuevo polipéptido de endolisina

5 Campo de la invención

[0001] La invención se refiere al campo de la medicina, específicamente al campo del tratamiento de afecciones asociadas a una infección por *Staphylococcus*. La invención se refiere a un nuevo polipéptido de endolisina que actúa específicamente sobre una célula bacteriana de *Staphylococcus*. La invención también se refiere a dicho polipéptido de endolisina para uso médico, preferiblemente para tratar a un individuo que padece una afección asociada a una infección por *Staphylococcus*.

Antecedentes de la invención

[0002] *Staphylococcus aureus* es un patógeno animal principal, especialmente en mamíferos tales como los seres humanos y las vacas, que frecuentemente está implicado en varias enfermedades infecciosas graves e intoxicación alimentaria. Su tratamiento se vuelve cada vez más difícil debido a la aparición de cepas resistentes a los antibióticos. Se ha demostrado que las endolisinas de fagos que infectan *Staphylococcus aureus* controlan potencialmente estos patógenos y se pueden usar para su detección específica. En la mayoría de los casos, los principales obstáculos en la aplicación de endolisinas para actuar sobre especies de *Staphylococcus* son la baja actividad enzimática, la producción difícil en cantidades grandes y/o la estabilidad de las proteínas. Por consiguiente, hay una necesidad de un polipéptido de endolisina con características mejoradas en cuanto a, por ejemplo, la actividad antimicrobiana, la estabilidad y/o una inmunogenicidad reducida.

25 Resumen de la invención

[0003] La invención también se refiere a un polipéptido de endolisina específico para *Staphylococcus*, dicho polipéptido que comprende:

- 30 – un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 2, o
- un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 1 y que tiene una delección de al menos 5, 10, 20, 30, o 40 aminoácidos en la región de aminoácidos 156 a 199 de la SEC ID N.º: 1,

35 donde el polipéptido de endolisina tiene una actividad específica mejorada y/o una inmunogenicidad reducida en comparación con un polipéptido de endolisina con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID N.º: 1.

[0004] La invención se refiere además a un polipéptido de endolisina con una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID N.º: 2.

[0005] La invención también se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido de endolisina según la invención. La invención también se refiere a una construcción de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido según la invención. La invención también se refiere a un vector de expresión que comprende una construcción de ácidos nucleicos según la invención. La invención también se refiere a una célula hospedadora que comprende un polinucleótido según la invención, una construcción de ácidos nucleicos según la invención o una construcción de expresión según la invención.

[0006] La invención también se refiere a un método para la producción de un polipéptido de endolisina según la invención, que comprende:

- cultivar una célula hospedadora según la invención bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido de endolisina,
- opcionalmente, aislar y purificar el polipéptido de endolisina a partir del caldo de cultivo, y
- 55 – opcionalmente, liofilizar el polipéptido de endolisina.

[0007] La invención también se refiere a un método para la purificación de un polipéptido de endolisina según la invención con actividad mejorada que comprende diálisis de una endolisina según la invención, dicha diálisis que incluye las etapas de:

- 60 i) diálisis frente a un tampón que comprende un compuesto quelante, y
- ii) diálisis frente a un tampón que contiene ión de metal bivalente, preferiblemente un ión de metal bivalente seleccionado del grupo consistente en Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} .

[0008] La invención también se refiere a una composición que incluye un polipéptido de endolisina según la invención, o un polinucleótido según la invención, o una construcción de ácidos nucleicos según la invención, o una construcción de expresión según la invención, o una célula hospedadora según la invención.

5 [0009] La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de endolisina según la invención, o un polinucleótido según la invención, o una construcción de ácidos nucleicos según la invención, o una construcción de expresión según la invención, o una célula hospedadora según la invención, dicha composición farmacéutica que comprende además un excipiente aceptable farmacéuticamente.

10 [0010] La invención también se refiere a una composición según la invención, que comprende además un principio activo adicional.

[0011] La invención también se refiere a una composición según la invención, para uso como medicamento.

15 [0012] La invención también se refiere a una composición según la invención, para uso como medicamento para el tratamiento de una afección asociada a infección por un *Staphylococcus*.

20 [0013] La invención también se refiere al uso de un polipéptido de endolisina según la invención, o un polinucleótido según la invención, o una construcción de ácidos nucleicos según la invención, o una construcción de expresión según la invención, o una célula hospedadora según la invención, o una composición según la invención, como antimicrobiano, preferiblemente como aditivo alimenticio o desinfectante.

25 [0014] La invención también se refiere al uso de un polipéptido de endolisina según la invención, o un polinucleótido según la invención, o una construcción de ácidos nucleicos según la invención, o una construcción de expresión según la invención, o una célula hospedadora según la invención, o una composición según la invención, para detectar un *Staphylococcus*, preferiblemente en una aplicación de diagnóstico.

Descripción detallada de la invención

30 [0015] Sorprendentemente, los inventores obtuvieron un nuevo polipéptido de endolisina con actividad específica mejorada e inmunogenicidad reducida.

[0016] Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de endolisina específico para *Staphylococcus*, dicho polipéptido que comprende:

- 35
- un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 2, o
 - un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 1 y con una delección de al menos 5, 10, 20, 30, o 40 aminoácidos en la región de
- 40 aminoácidos 156 a 199 de la SEC ID N.1: 1,

–
donde el polipéptido de endolisina tiene actividad específica mejorada y/o inmunogenicidad reducida en comparación con un polipéptido de endolisina con la secuencia de aminoácidos según SEQ ID N.º: 1.

45 [0017] En este documento se hace referencia a dicho polipéptido de endolisina como un polipéptido de endolisina según la invención. Preferiblemente, el polipéptido de endolisina según la invención comprende un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más preferiblemente 100% identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 2. Más preferiblemente, el polipéptido de endolisina según la invención consiste en

50 un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más preferiblemente 100% identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 2.

55 [0018] Preferiblemente, el polipéptido de endolisina según la invención comprende un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o más preferiblemente al menos 99% identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 1 y con un truncamiento de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38,39 o más preferiblemente al menos 40 aminoácidos en la región de aminoácidos 156 a 199 de la SEQ ID N.º: 1.

60 [0019] Un polipéptido de endolisina más preferido según invención tiene una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID N.º: 2.

65 [0020] En el contexto de la invención, un polipéptido de endolisina específico para *Staphylococcus* se interpreta como un polipéptido que tiene actividad lítica para *Staphylococcus*, preferiblemente dicha actividad lítica es actividad de peptidoglicano hidrolasa para peptidoglicano de *Staphylococcus*. Preferiblemente, dicho

Staphylococcus se selecciona del grupo consistente en *S. Aureus*, *S. Simulans* y *S. Carnosus*. La actividad lítica se puede evaluar mediante cualquier método adecuado conocido por el experto en la materia. Preferiblemente, se usa uno de los ensayos que se describen en los ejemplos de este documento.

[0021] En la invención se incluyen polipéptidos de endolisina que comprenden una endolisina según la invención o una parte funcional de la misma como esqueleto y comprende además un polipéptido adicional o una parte funcional del mismo. Dicho otro polipéptido o una parte funcional del mismo puede ser, por ejemplo, pero sin limitación, un dominio lítico o un dominio de amidasa. Dicho otro polipéptido o parte funcional del mismo puede ser nativo o puede ser heterólogo respecto al polipéptido de endolisina según la invención.

[0022] Un polipéptido de endolisina según la invención puede derivar de una de las secuencias que figuran aquí por substitución, inserción, delección, o adición de uno, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o más nucleótidos o aminoácidos, respectivamente. Un polipéptido de endolisina según la invención puede derivar de una de las secuencias que se identifican aquí añadiendo un aminoácido adicional o fracciones químicas N- o C-terminales para aumentar la estabilidad, la solubilidad y la actividad.

[0023] Un polipéptido de endolisina según la invención puede tener una longitud de al menos 300, 350, 400 o 450 aminoácidos, preferiblemente 462 aminoácidos, y/o como mucho 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500 o 462 aminoácidos. Preferiblemente, dicho polipéptido tiene una longitud de al menos 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 462, 470, 480, 490, 500, 510 o 520 aminoácidos y/o como mucho 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600 aminoácidos. Una forma de realización de la invención comprende un polipéptido de endolisina variante según la invención. Un polipéptido de endolisina variante puede ser cualquier forma de origen no natural del polipéptido de endolisina según la invención. Una variante polipeptídica de endolisina puede diferir de alguna manera diseñada de la SEQ ID N.º: 2. Un polipéptido de endolisina variante según la invención se puede crear por mutagénesis dirigida partiendo de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N.º: 1 o la SEQ ID N.º: 2. Preferiblemente, un polipéptido de endolisina variante según la invención contiene mutaciones que no alteran la función biológica del polipéptido codificado; preferiblemente, un polipéptido de endolisina variante según la invención muestra una unión a la pared celular de peptidoglicano de *Staphylococcus* y/o una actividad lítica que igual o mejorada en comparación con el polipéptido de endolisina con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID N.º: 2.

[0024] Un polipéptido de endolisina según la invención puede comprender un marcador para, por ejemplo, la facilidad de purificación. Preferiblemente, dicho marcador se selecciona de, pero no se limita a, el grupo consistente en un marcador FLAG, marcador poli(His), marcador HA y marcador myc, más preferiblemente dicho marcador es un marcador 6xHis.

[0025] En un segundo aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido de endolisina según el primer aspecto de la invención. Preferiblemente, tal polinucleótido según la invención tiene una codificación optimizada para la expresión eficaz en un hospedador específico. El experto en la técnica sabe cómo optimizar codones y/o pares de codones. Un polinucleótido según la invención puede ser una molécula de ARN o ADN, preferiblemente una molécula de ADN.

[0026] La invención también se refiere a una construcción de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido según la invención.

[0027] La invención también se refiere a un vector de expresión que comprende una construcción de ácidos nucleicos o un polinucleótido según la invención. Un vector de expresión según la invención puede ser un vector de expresión recombinante. Tal vector puede constituir un plásmido, un cósmido, un bacteriófago o un virus, o una parte del mismo, que se transforma introduciendo una construcción de ácidos nucleicos o un polinucleótido según la invención. Tales vectores de transformación específicos al organismo hospedador que se desea transformar son conocidos por los expertos en la técnica y están ampliamente descritos en la literatura. Para producir un polinucleótido o polipéptido de endolisina según la invención en un hospedador, un proceso para la transformación de un organismo hospedador, y la integración de un polinucleótido, construcción de ácidos nucleicos o vector de expresión según la invención pueden ser apropiados. Tal transformación se puede llevar a cabo mediante cualesquiera medios conocidos adecuados que ha sido extensamente descritos en la literatura especializada y son ampliamente conocidos por el experto en la materia.

[0028] En un tercer aspecto, la invención también se refiere a una célula hospedadora que comprende un polinucleótido según la invención, una construcción de ácidos nucleicos según la invención o una construcción de expresión según la invención. Una célula hospedadora según la invención puede ser cualquier célula microbiana, procariota o eucariota, que es adecuada para la expresión del polipéptido de la invención. Preferiblemente, dicha célula es una *E. Coli*. En una forma de realización más preferida, dicha célula es *E. Coli* XL1blue MRF.

[0029] En un cuarto aspecto, la invención proporciona un método para la producción de un polipéptido de endolisina según la invención, que comprende:

- cultivar una célula hospedadora según la invención bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido de endolisina,
- opcionalmente, aislar y purificar el polipéptido de endolisina a partir del caldo de cultivo, y
- opcionalmente, liofilizar el polipéptido de endolisina.

5

[0030] Preferiblemente, se usa una *E. Coli* en el método para la producción de un polipéptido de endolisina según la invención. Más preferiblemente, se usa una *E. Coli* XL1 blueMRF en la etapa i) para producir un polipéptido de endolisina según la invención. Preferiblemente, en la etapa de aislamiento y purificación, se utilizan columnas de cromatografía IMAC y Econo-Pac (BioRad) con 5mL de perlas de agarosa quelante de níquel de densidad baja (perlas ABT) en combinación con flujo de gravedad para purificar un polipéptido de endolisina según la invención. El polipéptido eluido se puede dializar durante 2, 4, y 12 horas frente a tampón de liofilización 3 x 11, dicho tampón que comprende preferiblemente 50 mM de fosfato, 500mM de sacarosa, 200mM de manitol, 0,005% de polisorbato20, pH 7.4.

10

[0031] La liofilización y la reconstitución se interpretan preferiblemente como la deshidratación por criodesecación y la reconstitución posterior de la muestra mediante la adición de agua. Preferiblemente, la liofilización y la reconstitución se realizan mediante diálisis frente a 3 cambios de alícuota de 300 ml de tampón de liofilización (50 mM de fosfato o Tris, 500 mM de sacarosa, 200 mM de manitol, pH 7.4) y congelación en la fase gaseosa de nitrógeno líquido. La liofilización preferiblemente se realiza bajo condiciones estándar, preferiblemente a -40°C y vacío a 75 mTorr durante 60 minutos, seguido de un aumento de la temperatura durante 5 horas a -10°C y otros 60 minutos a -10°C en los mismos niveles de vacío. Como etapa final, la temperatura preferiblemente se aumenta a 25°C durante 10 horas. Las muestras se reconstituyen mediante la adición de agua.

20

[0032] La invención también proporciona un método para la purificación de un polipéptido de endolisina según la invención con actividad mejorada que comprende la diálisis de un polipéptido de endolisina según el primer aspecto de la invención, dicha diálisis que incluye las etapas de:

25

- diálisis frente a un tampón que comprende un compuesto quelante, y
- diálisis frente a un tampón que contiene un ión de metal bivalente, preferiblemente un ión de metal bivalente seleccionado del grupo consistente en Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} .

30

[0033] Un "compuesto quelante" se define aquí como un compuesto que se une a un ión metálico. Algunos compuestos quelantes ampliamente conocidos son ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y ácido etilenglicoltetraacético (EGTA). Preferiblemente se usa EDTA en la etapa i) del método de la invención.

35

[0034] Preferiblemente, el ión de metal bivalente de la etapa ii) se selecciona del grupo que consiste en Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y Cu^{2+} , más preferiblemente, dicho ión de metal bivalente se selecciona del grupo consistente en Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} , aún más preferiblemente dicho ión de metal bivalente es Mg^{2+} o Ca^{2+} .

40

[0035] La sustitución de un ión de metal bivalente por cualquiera de Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} preferiblemente supondrá un aumento de una actividad lítica de un polipéptido de endolisina según la invención. La actividad lítica se evalúa tal y como se define en otra parte del presente documento. Preferiblemente, este método según la invención lleva a un aumento en una actividad lítica de al menos 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 o 2 veces en comparación con el polipéptido no tratado correspondiente. Aún más preferiblemente, el método lleva a un aumento en la actividad lítica de al menos 2.5 veces. Preferiblemente, el polipéptido tratado muestra un aumento de 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 a 2 veces en la actividad lítica en comparación con el polipéptido no tratado con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID N.º: 2.

45

[0036] En un quinto aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un polipéptido de endolisina según la invención o un polinucleótido según la invención, o una construcción de ácidos nucleicos según la invención, o una construcción de expresión según la invención, o una célula hospedadora según la invención. Tal composición según la invención muestra preferiblemente actividad lítica para *Staphylococcus*, preferiblemente dicha actividad lítica es actividad de peptidoglicano hidrolasa para peptidoglicano de *Staphylococcus*. Preferiblemente, dicho *Staphylococcus* se selecciona del grupo consistente en *S. Aureus*, *S. Simulans* y *S. Carnosus*. Una composición según la presente invención puede comprender una mezcla de diferentes polinucleótidos, y/o construcciones de ácidos nucleicos y/o polipéptidos de endolisina y/o vectores y/o células según la invención.

55

[0037] Una composición según la invención puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable. A tal composición se hace referencia aquí como una composición farmacéutica y es preferiblemente para uso como medicina o como medicamento. Preferiblemente el medicamento se usa para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

60

[0038] Por consiguiente, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de endolisina según la invención o un polinucleótido según la invención, o una construcción de ácidos nucleicos según la invención, o una construcción de expresión según la invención, o una célula hospedadora según la invención, dicha composición farmacéutica que comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0039] Una composición según la invención puede comprender además uno o más principios activos adicionales. Activo se define preferiblemente como que muestra una actividad lítica tal y como se define en otra parte del presente documento. Preferiblemente, dicho uno o más principios activos adicionales se seleccionan del grupo consistente en un bacteriófago o fago, una endolisina de fago derivada de tal fago y un antibiótico. Un fago incluido aquí puede ser cualquier fago conocido en la literatura. Preferiblemente, tal fago procede, pero sin limitarse a ello, de una familia de la lista consistente en *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*. Dicho fago también puede provenir de una familia de la lista consistente en *Tectiviridae*, *Corticoviridae*, *Lipothrixviridae*, *Plasmaviridae*, *Rudiviridae*, *Fuselloviridae*, *Inoviridae*, *Microviridae*, *Leviviridae* y *Cystoviridae*. En el contexto de la invención, una combinación de principios activos tal y como se define aquí se puede administrar consecutiva o simultáneamente. Una composición según la invención puede estar en forma líquida, sólida o semilíquida o semisólida.

[0040] Una composición según la invención puede utilizarse para tratar animales, incluyendo seres humanos, infectados con *Staphylococcus*, preferiblemente *S. Aureus*. Cualquier forma de administración adecuada puede utilizarse para administrar dicha composición, incluyendo pero sin limitarse a: oral, aerosol u otro dispositivo de administración a los pulmones, spray nasal, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, vaginal, rectal, tópica, lumbar, intratecal, y aplicación directa en el cerebro y/o meninges.

[0041] De una composición según la invención que comprende un polinucleótido o una construcción de ácidos nucleicos o un polipéptido de endolisina o un vector o una célula según la invención se dice preferiblemente que es activa, funcional o terapéuticamente activa o capaz de tratar, prevenir y/o retardar una enfermedad infecciosa cuando reduce la cantidad de una especie de *Staphylococcus* presente en un paciente o en una célula de dicho paciente o en una línea celular o en un sistema in vitro sin células y preferiblemente significa que el 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o menos de la cantidad inicial de una especie de *Staphylococcus* sigue siendo detectable después del tratamiento. Preferiblemente ninguna especie de *Staphylococcus* es detectable después del tratamiento. En este párrafo, la expresión "cantidad de la especie de *Staphylococcus*" significa preferiblemente géneros vivos de *Staphylococcus*. Las especies de *Staphylococcus* se pueden detectar utilizando técnicas estándar conocidas por el experto en la materia tales como técnicas inmunohistoquímicas que usan anticuerpos específicos para *Staphylococcus*, pruebas de la coagulasa en probeta que detectan estafiloaglutinasa o "coagulasa libre", detección de proteínas de superficie tal como el factor de aglutinación (prueba de la coagulasa en portaobjetos) y/o proteína A (prueba de látex comercial). Las especies de *Staphylococcus* vivas se pueden detectar utilizando técnicas estándar conocidas por el experto en la técnica tales como técnicas de cultivo bacteriano microbiológico y/o la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa en tiempo real para el ensayo para ARNm bacteriano. Dicha reducción se evalúa preferiblemente en un tejido o en una célula de un individuo o un paciente en comparación con la cantidad presente en dicho individuo o paciente antes del tratamiento con dicha composición o polipéptido según la invención. Alternativamente, la comparación se puede hacer con un tejido o célula de dicho individuo o paciente que aún no ha sido tratado con dicha composición o polipéptido en caso de que el tratamiento sea local.

[0042] Una composición que comprende un polinucleótido o una construcción de ácidos nucleicos o un polipéptido o un vector o una célula según la invención se puede administrar a un sujeto que lo necesite o a una célula, tejido u órgano o a dicho paciente durante al menos una semana, un mes, seis meses, un año o más.

[0043] Por consiguiente, la invención proporciona una composición según la invención para uso como un medicamento para el tratamiento de un sujeto que lo necesite. Preferiblemente, dicha composición es para uso como medicamento en el tratamiento de una afección asociada a la infección de un sujeto con un *Staphylococcus*, preferiblemente una bacteria de la especie *S. Aureus*.

[0044] La invención también proporciona un método de tratamiento, retraso y/o prevención de una afección asociada a la infección de un sujeto con un *Staphylococcus*, preferiblemente una bacteria de la especie *S. Aureus*, que comprende la administración de un polipéptido de endolisina según la invención, o un polinucleótido según la invención, o una construcción de ácidos nucleicos según la invención, o una construcción de expresión según la invención, o una célula hospedadora según la invención, o una composición según la invención.

[0045] El uso médico aquí descrito se puede formular como un producto según la invención para uso como medicamento para el tratamiento de las enfermedades mencionadas, pero también se podría formular como un método de tratamiento de las enfermedades mencionadas utilizando un producto según la invención, un producto según la invención para usar en la preparación de un medicamento para tratar las enfermedades mencionadas y uso de un producto según la invención para el tratamiento de las enfermedades mencionadas. Dichos usos médicos están todos previstos por la presente invención. El sujeto que requiera el tratamiento, retraso y/o

prevención de una afección asociada a la infección puede ser cualquier sujeto animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente ganado, animales domésticos como un perro o un gato, o un sujeto humano.

[0046] El polipéptido de endolisina según la invención, o un polinucleótido según la invención, o una construcción de ácidos nucleicos según la invención, o una construcción de expresión según la invención, o una célula hospedadora según la invención, o una composición según la invención se puede usar convenientemente en un método para el tratamiento combinatorio de la dermatitis atópica, tal como se describe en WO2015/005787, donde se usan un compuesto antiinflamatorio y un compuesto que actúa específicamente sobre una célula bacteriana, preferiblemente una célula bacteriana gram positiva, para tratar la dermatitis atópica o el eczema. El compuesto que actúa específicamente sobre una célula bacteriana puede ser convenientemente un polipéptido de endolisina según la invención, o un polinucleótido según la invención, o una construcción de ácidos nucleicos según la invención, o una construcción de expresión según la invención, o una célula hospedadora según la invención, o una composición según la invención.

[0047] El polipéptido de endolisina según la invención, o un polinucleótido según la invención, o una construcción de ácidos nucleicos según la invención, o una construcción de expresión según la invención, o una célula hospedadora según la invención, o una composición según la invención se puede usar convenientemente en un método de tratamiento de una infección bacteriana intracelular en un sujeto que lo necesite, que comprende:

- la administración de una cantidad eficaz de un agente que aumenta el pH intracelular de una célula hospedadora y/o de un compartimento intracelular de una célula hospedadora, y
- la administración de una cantidad eficaz de un agente bactericida. Dicho método se denomina en este documento un método según la invención,

donde, preferiblemente, el aumento del pH activa una bacteria intracelular no replicante y el agente bactericida mata la bacteria intracelular activada. Dicho método de tratamiento se describe en EP15158880.3. El agente bactericida puede ser convenientemente un polipéptido de endolisina según la invención, o un polinucleótido según la invención, o una construcción de ácidos nucleicos según la invención, o una construcción de expresión según la invención, o una célula hospedadora según la invención, o una composición según la invención. Preferiblemente, el polipéptido de endolisina según la invención comprende un dominio de transducción de proteínas que permite al polipéptido de endolisina entrar en la célula que alberga la bacteria intracelular. Los dominios de transducción de proteínas se describen de manera extensa en EP15158880.3.

[0048] En un aspecto, la invención también se refiere a una composición no médica que muestra actividad lítica tal y como se define en otra parte del presente documento. Preferiblemente, esta forma de realización se refiere a un antimicrobiano. Preferiblemente, esta forma de realización se refiere a un antimicrobiano para lisar una bacteria, preferiblemente una bacteria del género *Staphylococcus*, más preferiblemente una bacteria de la especie *S. Aureus*. Preferiblemente, esta forma de realización se refiere a un antimicrobiano como conservante alimenticio o desinfectante.

[0049] Por consiguiente, se proporciona el uso de un polipéptido de endolisina según la invención, o un polinucleótido según la invención, o una construcción de ácidos nucleicos según la invención, o una construcción de expresión según la invención, o una célula hospedadora según la invención, o una composición según la invención, como antimicrobiano, preferiblemente como aditivo alimenticio o desinfectante. Los ejemplos de dicho uso son, pero de forma no limitativa, los de limpieza de las copas de un dispositivo de ordeño con una composición según la invención antes del ordeño para prevenir la transmisión de estafilococos de vaca a vaca, la limpieza de superficies en la industria alimentaria y la limpieza de herramientas quirúrgicas. Dicho uso se puede combinar con cualquier método de esterilización o desinfectante conocido en la técnica tal como limpieza ultrasónica, irradiación o esterilización térmica, por inmersión del equipo en una solución desinfectante tal como etanol, amonio, yodo y/o desinfectante de aldehído, o utilizando esterilización por gas manteniendo el dispositivo en una atmósfera cerrada tal como gas formalina o gas de óxido de etileno.

[0050] La invención se refiere además a un polipéptido de endolisina según la invención, o un polinucleótido según la invención, o una construcción de ácidos nucleicos según la invención, o una construcción de expresión según la invención, o una célula hospedadora según la invención, o una composición según la invención, para detectar un *Staphylococcus*, preferiblemente *S. Aureus*, preferiblemente en una aplicación de diagnóstico.

Definiciones

[0051] "Identidad de secuencia" se define aquí como una relación entre dos o más secuencias de aminoácidos (péptido, polipéptido, o proteína) o dos o más secuencias de ácidos nucleicos (nucleótido; polinucleótido), según se determina comparando las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias de aminoácidos o nucleótidos, según el caso, según se determina por la correspondencia entre cadenas de tales secuencias. La "similitud" entre dos secuencias de aminoácidos se determina por comparación de la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos de aminoácidos conservados de un péptido o polipéptido con la secuencia de un segundo péptido o polipéptido. En una forma de realización

preferida, la identidad o similitud se calcula sobre la totalidad de la SEQ ID N.º como se identifica aquí. La "identidad" y "similitud" se pueden calcular fácilmente por métodos conocidos, incluyendo pero sin limitarse a aquellos descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Criffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; y Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988).

[0052] Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para proporcionar la mayor correspondencia entre las secuencias evaluadas. Los métodos para determinar la identidad y la similitud se codifican en programas de ordenador disponibles al público. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y la similitud entre dos secuencias incluyen, por ejemplo, el paquete de programa GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (1): 387 (1984)), BestFit, BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul, S. F. Et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). El programa BLAST X está disponible al público a través de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). El ampliamente conocido algoritmo de Smith Waterman también se puede usar para determinar la identidad.

[0053] Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias de polipéptidos incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); Matriz de comparación: BLOSSUM62 de Hentikoff y Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:10915-10919 (1992); Penalización por gap: 12; y penalización por longitud de gap: 4. Un programa útil con estos parámetros está disponible al público como el programa "Ogap" de Genetics Computer Group, situado en Madison, Wisconsin (EE. UU.). Los parámetros anteriormente mencionados son los parámetros por defecto para comparaciones de aminoácidos (junto con ninguna penalización para gaps finales). Los parámetros preferidos para la comparación de ácidos nucleicos incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); Matriz de comparación: emparejamientos=+10; desemparejamientos=0; penalización por gap: 50; penalización por longitud de gap: 3. Disponible como el programa Gap, de Genetics Computer Group situado en Madison, Wisconsin (EE. UU.). Los anteriores son los parámetros por defecto para comparaciones de ácidos nucleicos.

[0054] Opcionalmente, para determinar el grado de similitud de aminoácidos, la persona experta también puede tener en cuenta las denominadas sustituciones de aminoácidos "conservadoras", como será evidente para el experto en la materia. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifático es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos conservadores preferidos de sustitución de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina. Las variantes de sustitución de la secuencia de aminoácidos descrita en este documento son aquellas en las que se ha eliminado al menos un residuo en las secuencias descritas y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. Preferiblemente, el cambio de aminoácido es conservador. Las sustituciones conservadoras preferidas para cada uno de los aminoácidos naturales son las siguientes: Ala a ser; Arg a lys; Asn a gln o his; Asp a glu; Cys a ser o ala; Gln a asn; Glu a asp; Gly a pro; His a asn o gln; Ile a leu o val; Leu a ile o val; Lys a arg; gln o glu; Met a leu o ile; Phe a met, leu o tyr; Ser a thr; Thr a ser; Trp a tyr; Tyr a trp o phe; y, Val a ile o leu.

[0055] Una "molécula de ácido nucleico" o "polinucleótido" (los términos se usan indistintamente en este documento) se representan mediante una secuencia de nucleótidos. Un "polipéptido" está representado por una secuencia de aminoácidos. Una "construcción de ácidos nucleicos" se define como una molécula de ácido nucleico que está aislada de un gen natural o que se ha modificado para contener segmentos de ácidos nucleicos que se combinan o yuxtaponen de una manera que de otro modo no existiría en la naturaleza. Una molécula de ácido nucleico está representada por una secuencia de nucleótidos. Opcionalmente, una secuencia de nucleótidos presente en una construcción de ácidos nucleicos está unida operativamente a una o más secuencias de control, que dirigen la producción o expresión de dicho péptido o polipéptido en una célula o en un sujeto.

[0056] "Unido/a operativamente" se define aquí como una configuración en la que una secuencia de control se coloca apropiadamente en una posición relativa a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la invención de manera que la secuencia de control dirija la producción/expresión del péptido o polipéptido del invención en una célula y/o en un sujeto. "Unido/a operativamente" también se puede usar para definir una configuración en la que una secuencia se coloca apropiadamente en una posición relativa a otra secuencia que codifica un dominio funcional de manera que un polipéptido quimérico se codifica en una célula y/o en un sujeto.

[0057] Se considera que "expresión" incluye cualquier etapa implicada en la producción del péptido o polipéptido incluyendo, pero sin limitarse a, la transcripción, la modificación postranscripcional, la traducción, la modificación postraduccional y la secreción.

[0058] Una "secuencia de control" se define en la presente memoria de modo que incluya todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polipéptido. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada de transcripción y traducción. Opcionalmente, un promotor representado por una secuencia de nucleótidos presente en una construcción de ácidos nucleicos está unido operativamente a otra secuencia de nucleótidos que codifica un péptido o polipéptido como se identifica aquí.

[0059] El término "transformación" se refiere a un cambio genético permanente o transitorio inducido en una célula después de la incorporación de nuevo ADN (es decir, ADN exógeno a la célula). Cuando la célula es una célula bacteriana, como se pretende en la presente invención, el término se refiere habitualmente a un vector extracromosómico autorreplicante que alberga una resistencia a los antibióticos seleccionable.

[0060] Un "vector de expresión" puede ser cualquier vector que pueda someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y que pueda provocar la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención en una célula y/o en un sujeto. Como se usa en el presente documento, el término "promotor" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona para controlar la transcripción de uno o más genes o ácidos nucleicos, situados cadena arriba con respecto a la dirección de transcripción del sitio de iniciación de la transcripción del gen. Se relaciona con el sitio de unión identificado por la presencia de un sitio de unión para la ARN polimerasa dependiente del ADN, sitios de iniciación de la transcripción y cualquier otra secuencia de ADN, incluidos, entre otros, sitios de unión del factor de transcripción, sitios de unión a proteínas represoras y activadoras y cualquier otra secuencia de nucleótidos que los expertos en la técnica sepan que actúa directa o indirectamente para regular la cantidad de transcripción del promotor. Dentro del contexto de la invención, un promotor preferiblemente termina en el nucleótido -1 del sitio de inicio de la transcripción (TSS).

[0061] Un "polipéptido" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier péptido, oligopéptido, polipéptido, producto génico, producto de expresión o proteína. Un polipéptido está compuesto por aminoácidos consecutivos. El término "polipéptido" abarca moléculas naturales o sintéticas. La información de la secuencia tal como se proporciona en el presente documento no debe interpretarse de manera tan restrictiva como para requerir la inclusión de bases identificadas erróneamente. El experto es capaz de identificar tales bases identificadas erróneamente y sabe cómo corregir dichos errores. En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se utilizan en su sentido no limitativo para significar que se incluyen los elementos que siguen a la palabra, pero que no se excluyen los elementos que no se mencionan específicamente. Además, el verbo "consistir" puede reemplazarse por "consistir esencialmente en" con el significado de que un producto o una composición o una molécula de ácido nucleico o un péptido o polipéptido de una construcción o vector de ácido nucleico o célula como se define aquí puede comprender componente (s) adicional(es) a los identificados específicamente; dichos componentes adicionales no alteran la característica distintiva de la invención. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que haya más de uno de los elementos, a menos que el contexto requiera claramente que exista uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" por lo general significa "al menos uno/a".

[0062] Los siguientes ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Leyendas de las figuras

[0063]

Figura 1. Imagen representativa de concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) de un polipéptido de endolisina según la invención.

Figura 2. Estabilidad térmica y actividad específica del polipéptido de endolisina según la invención.

Figura 3. Ensayos de reducción de turbidez que comparan SA.100 (panel superior y panel intermedio) con XZ.700 (panel inferior).

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Cepas bacterianas, condiciones de cultivo, fagos y plásmidos

[0064] E. coli XL1BlueMRF 'y E. coli Sure se usaron para la sobreexpresión de polipéptidos de acuerdo con la

invención, esencialmente como en WO2013/169102. Ambas cepas se cultivaron en medio LB-PE a 30 °C con 100 µg/ml de ampicilina y 30 µg/ml de tetraciclina para la selección del plásmido.

Técnicas de ADN y procedimientos de clonación

5

[0065] Se emplearon técnicas estándar según Sambrook, Maniatis et al. (1989) para la clonación.

Expresión y purificación de polipéptidos de endolisina recombinantes

10 [0066] La sobreexpresión y la purificación parcial de proteínas se realizaron esencialmente tal como se ha descrito anteriormente por otros (Loessner et al., 1996, Schmelcher et al., 2010). En resumen, se cultivaron plásmidos con E. coli en 250 ml de medio CL modificado (15 g/l de triptosa, 8 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, pH 7,8) a una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de 0,4 a 0,6 y se indujeron con 1 mM de IPTG. Las células se incubaron adicionalmente durante 4 horas a 30 °C, o 18 horas a 20 °C, se enfriaron a 4 °C y se
15 recogieron por centrifugación. Los sedimentos celulares se suspendieron en 5 ml de tampón de inmovilización (50 mM de NaH₂PO₄, 500 mM de NaCl, 5 mM de imidazol, polisorbato 20 al 0,1%, pH 7,4). Los contenidos citosólicos de E. coli que contenían proteínas recombinantes solubles se liberaron mediante un doble paso a través de una prensa francesa de presión de células (1200 psi, SLM Aminco, Urbana, IL, EE.UU.) operada a 1200 psi. Otros pasos de procesamiento posteriores incluyeron la eliminación de restos de células insolubles por
20 centrifugación, esterilización por filtración (membrana de PES de 0,2 µm, Millipore) y purificación por cromatografía de afinidad en metales inmovilizados (IMAC) usando columnas MicroBiospin (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) con resina de baja densidad Ni-NTA Superflow (Chemie Brunschwig AG, Basilea, Suiza). Las proteínas inmovilizadas con Ni-NTA se lavaron con flujo de gravedad en columna con 5-10 volúmenes de columna de tampón de inmovilización. Las fracciones de proteína se eluyeron a continuación con tampón de elución (50 mM de NaH₂PO₄, 500 mM de NaCl, 125 mM de imidazol, polisorbato 20 al 0,1%, pH 7,4) y se dializó
25 frente a dos cambios de tampón de diálisis (50 mM de NaH₂PO₄, 100 mM de NaCl, polisorbato 20 al 0,1%, pH 7,4). Las concentraciones de proteína se definieron en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, se corrigió la absorbancia específica a 280 nm calculada a partir de la secuencia de aminoácidos primaria con el software Vector NTI (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) y se estimó la pureza mediante SDS-PAGE. Las alícuotas se
30 almacenaron a -20 °C mezcladas con 50% de glicerol.

Liofilización de proteínas recombinantes

35 [0067] Las proteínas purificadas por IMAC se dializaron frente a 3 cambios de alícuota de 300 ml de tampón de liofilización (50 mM de fosfato o Tris, 500 mM de sacarosa, 200 mM de manitol, pH 7,4) y se congelaron en la fase gaseosa de nitrógeno líquido. La liofilización se realizó a -40 °C y el vacío a 75 mTorr durante 60 minutos, seguido del aumento de la temperatura durante 5 horas a -10 °C y otros 60 minutos a -10 °C a los mismos niveles de vacío. Como paso final, la temperatura se aumentó a 25 °C durante 10 horas. Las muestras se reconstituyeron antes de la prueba en ensayos de lisis mediante la adición de agua.

40

Ensayos de turbidez y lisis

45 [0068] Se cultivaron células sustrato para ensayos de actividad lítica a una densidad óptica de 595 nm (DO₅₉₅) de 0,4, se lavaron dos veces con PBST pH 7,4 y se volvieron a suspender en tampón PBS pH 7,4 con glicerol al 15%, concentrándolo al mismo tiempo 100 veces. Las células se almacenaron a -20 °C. Para su uso adicional en ensayos de unión o actividad lítica, las células se descongelaron, se lavaron con PBS pH 7,4 y se diluyeron hasta una DO₅₉₅ de 1±0,05. En ensayos de actividad lítica estándar, se diluyeron muestras de proteínas en cantidades equimolares y se distribuyeron en placas de ensayo de cultivo de tejidos transparentes de 96 pocillos (SPL life sciences, Pocheon, Corea). Las células sustrato se añadieron a un volumen final y se registró la caída
50 en la densidad óptica a 595 nm (DO_{595nm}) durante aproximadamente 1 hora a 37°C.

[0069] Se midió la disminución de la densidad óptica a 595 nm (DO₅₉₅) usando un instrumento Victor3 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer) durante 1 hora. Las placas se agitaron vigorosamente durante 1 segundo (doble órbita, 0,1 mm de diámetro) después de cada lectura individual. Como control positivo se utilizó lisostafina marcada 6xHis N-terminal (HLST), Lisostafina (recombinante, originada de E. coli, Sigma) comercialmente disponible. Como control negativo aplicamos agua MilliQ.

55

Ensayo de concentración mínima inhibitoria (MIC)

60 [0070] Se distribuyeron diluciones dobles en serie (2000 nM a 4 nM) de endolisina en caldo de peptona de caseína-peptona de harina de soja (caldo CASO (Carl Roth, Alemania)) en placas de 96 pocillos transparentes estériles a 100 µl/pocillo. *S. aureus* Newbold se cultivaron en caldo CASO a mitad de la fase logarítmica (DO_{600nm} ~0,5) y se diluyeron con caldo CASO reciente a ~1E + 6 ufc/ml. Las células se distribuyeron a continuación en los pocillos que contenían endolisina dando como resultado concentraciones de endolisina de
65 1000 nM a 2 nM y ~10E + 5 ufc/pocillo. Las placas de 96 pocillos se cubrieron con la tapa y se incubaron durante

20 horas a 30 °C. Las imágenes se tomaron usando un escáner de gel. Como control positivo se utilizó caldo CASO sin endolisina, y como control negativo se utilizó caldo CASO sin células de *S. aureus*.

Resultados

Determinación de la actividad específica de un polipéptido de endolisina según la invención mediante análisis de concentraciones inhibitoras mínimas

[0071] La actividad específica de XZ.700, un polipéptido de endolisina con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 se comparó con la de SA.100, un polipéptido de endolisina de referencia con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Los resultados se representan en la Figura 1. Los valores de la MIC se obtuvieron por exposición de 2-3E + 5 ufc de *S. aureus* Newbold a diluciones en serie de Staphfect en un formato de 200 µl. La imagen se tomó después de 20 h de incubación en medio CASO. El valor de la MIC de SA.100 fue de 62,5 nM y el valor de la MIC de XZ.700 fue de 15,6 nM en tres ensayos independientes; es decir, el valor de la MIC de XZ.700 es cuatro veces menor que el de SA.100, lo que indica una actividad específica cuatro veces mayor de XZ.700.

Determinación de la estabilidad térmica y la actividad específica de un polipéptido de endolisina según la invención mediante ensayo de turbidez

[0072] La estabilidad térmica y la actividad específica de XZ.700, un polipéptido de endolisina con una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 se compararon con los de SA.100, un polipéptido de endolisina de referencia con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. En resumen, 200mM de SA.100 y XZ.700 se sometieron a 10 minutos de exposición a calor (eje X) seguido de enfriamiento en hielo. La actividad relativa en vista de SA.100 a 20 grados Celsius se determinó posteriormente por ensayo de turbidez por lisis. Se puede observar claramente en la Figura 2 que la actividad de XZ.700 es algo menor que SA.100 desde aproximadamente 55 grados Celsius y más allá, mientras que la actividad de XZ.700 es significativamente mayor que SA.100 hasta aproximadamente 55 grados Celsius. A temperatura ambiente, la actividad de XZ.700 es aproximadamente un 70% más alta que la de SA.100.

[0073] La actividad específica y la estabilidad térmica también se determinaron usando un ensayo cinético. XZ.700 y SA.100 a concentraciones de 200 nM se expusieron a calor entre 42 grados Celsius y 72 grados Celsius durante 10 minutos en tampón PBS en un termociclador de gradiente. Después del enfriamiento posterior en hielo, se registraron las cinéticas de lisis en ensayos de reducción de turbidez dinámica estándar a concentraciones de proteína de 100 nM frente a *S. aureus* SA.113 en tampón PBS pH 7.4. Las curvas de lisis se representan en la Figura 3 y muestran reducciones de la densidad óptica (eje Y, DO600nm~1 inicial) a lo largo del tiempo (eje X, duración 1 h). Se puede observar claramente que, hasta 60 grados Celsius, XZ.700 tiene una curva significativamente más pronunciada que SA.100, lo que indica una mayor actividad específica.

Predicción de inmunogenicidad de un polipéptido de endolisina según la invención.

[0074] Se realizaron predicciones de inmunogenicidad sobre las secuencias de polipéptidos XZ.700 y SA.100 (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente) usando la página web tools.immuneepitope.org/bcell/ con los parámetros: posición central 4, tamaño de ventana 7 y umbral 1.0. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Está claro que el fragmento de péptido inmunogénico "VKELKHIYSNH" (posición 197-207 en SA.100) no está presente en XZ.700.

[0075] En conjunto, en este ejemplo no limitativo, se demostró que el polipéptido de endolisina según la invención XZ.700 tiene una actividad específica más alta y una inmunogenicidad más baja que el polipéptido de endolisina SA.100 de la técnica anterior.

Tabla 1. Predicción de inmunogenicidad de Kolaskar & Tongaonkar de los péptidos presentes en Staphsekt SA.100 (izquierda) y Staphsekt XZ.700 (derecha)

5	Péptidos predichos: SA.100				Péptidos predichos: XZ.700			
	N°	Inicio	Fin	Péptido	N°	Inicio	Fin	Péptido
	1	5	10	HEHSAQ	1	5	10	HEHSAQ
	2	21	27	YGPYPLG	2	21	27	YGPYPLG
	3	44	49	TPVKAI	3	44	49	TPVKAI
	4	51	57	SGKIVEA	4	51	57	SGKIVEA
	5	81	100	YMHLSKYNVKVGDYVKAGQI	5	81	100	YMHLSKYNVKVGDYVKAGQI
	6	111	119	TAPHLHFQR	6	111	119	TAPHLHFQR
	7	133	139	MPFLKSA	7	133	139	MPFLKSA
	8	169	175	SQVCSGL	8	157	163	KHIYSNH
	9	197	207	VKELKHIYSNH				
	10	215	227	APKPSIQGVVIHN	9	171	183	APKPSIQGVVIHN
	11	234	242	PSQYLPWLY	10	190	198	PSQYLPWLY
	12	252	259	NGWASVYA	11	208	215	NGWASVYA
	13	264	276	VLWYHPTDYVEWH	12	220	232	VLWYHPTDYVEWH
	14	287	295	IGFEVCESY	13	243	251	IGFEVCESY
	15	311	325	TLKVAADVMKSYGLP	14	267	281	TLKVAADVMKSYGLP
	16	331	336	VRLHNE	15	287	292	VRLHNE
	17	339	354	GTSCPHRSWDLHVGKG	16	295	310	GTSCPHRSWDLHVGKG
	18	369	376	FIKRIKHY	17	325	332	FIKRIKHY
	19	381	390	KLEVSKAATI	18	337	346	KLEVSKAATI
	20	392	399	QSDVKQEV	19	348	355	QSDVKQEV
	21	405	410	KQIVKA	20	361	366	KQIVKA
	22	423	436	KAEHASFTVTAPEG	21	379	392	KAEHASFTVTAPEG
	23	450	457	QAGVLQKG	22	406	413	QAGVLQKG
	24	462	476	YDEVQKFDGHVWVSW	23	418	432	YDEVQKFDGHVWVSW

SECUENCIAS**[0076]**

10 SEQ ID NO: 1

MAATHEHSAQWLNNYKKGYGYGPYPLGINGGMHYGVDFFMNIGTPVKAISS
 GKIVEAGWSNYGGGNQIGLIENDGVHRQWYMHLSKYNVKVGDYVKAGQIIG
 WSGSTGYSTAPHLHFQRMVNSFSNSTAQDPMPFLKSAGYGKAGGTVTPTPNT
 GELLRPKDAKKDEKSQVCSGLAMEKYDITNLNAKQDKSKNGSVKELKHIYSN
 HIKGNKITAPKPSIQGVVIHNDYGSMTSPSYLPWLYARENNGTHVNGWASVY
 ANRNEVLWYHPTDYVEWHCGNQWANANLIGFEVCESYPGRISDKLFLNEEEA
 TLKVAADVMKSYGLPVNRNTVRLHNEFFGTSCPHRSWDLHVGKGEPYTTTNI
 NKMKDYFIKRIKHYYDGGKLEVSKAATIKQSDVKQEVKKQEAQIVKATDWK
 QNKDGIWYKAEHASFTVTAPEGIITRYKGPWTGHPQAGVLQKGQTIKYDEVQ
 KFDGHVWVSWETFEGETVYMPVRTWDAKTGKVGKLWGEIK

SEQ ID NO: 2

MAATHEHSAQWLNNYKKGYGYGPYPLGINGGMHYGVDFFMNIGTPVKAISS
GKIVEAGWSNYGGGNQIGLIENDGVHRQWYMHLSKYNVKVGDYVKAGQIIG
WSGSTGYSTAPHLHFQRMVNSFSNSTAQDPMPFLKSAGYGKAGGTVTPTPNT
GLKHIYSNHIKGNKITAPKPSIQGVVIHNDYGSMTPSQYLPWLYARENNGTHV
NGWASVYANRNEVLWYHPTDYVEWHCGNQWANANLIGFEVCESEYPGRISDK
LFLNEEATLKVAADVMKSYGLPVNRNTVRLHNEFFGTSCPHRSWDLHVGKG
EPYTTTNINKMKDYFIKRIKHYYDGGKLEVSKAATIKQSDVKQEVKKQEAQKI
VKATDWKQNKDGIWYKAEHASFTVTAPEGIITRYKGPWTGHPQAGVLQKGQT
IKYDEVQKFDGHVWVSWETFEGETVYMPVRTWDAKTGKVGKLWGEIK

LISTADO DE SECUENCIAS

5 [0077]

<110> Microos Human Health B.V.

<120> Nuevo polipéptido de endolisina

<130> P6057634EP

<160> 2

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 506

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Políptico quimérico

<400> 1

ES 2 665 821 T3

Met Ala Ala Thr His Glu His Ser Ala Gln Trp Leu Asn Asn Tyr Lys
1 5 10 15

Lys Gly Tyr Gly Tyr Gly Pro Tyr Pro Leu Gly Ile Asn Gly Gly Met
20 25 30

His Tyr Gly Val Asp Phe Phe Met Asn Ile Gly Thr Pro Val Lys Ala
35 40 45

Ile Ser Ser Gly Lys Ile Val Glu Ala Gly Trp Ser Asn Tyr Gly Gly
50 55 60

Gly Asn Gln Ile Gly Leu Ile Glu Asn Asp Gly Val His Arg Gln Trp
65 70 75 80

Tyr Met His Leu Ser Lys Tyr Asn Val Lys Val Gly Asp Tyr Val Lys
85 90 95

Ala Gly Gln Ile Ile Gly Trp Ser Gly Ser Thr Gly Tyr Ser Thr Ala
100 105 110

Pro His Leu His Phe Gln Arg Met Val Asn Ser Phe Ser Asn Ser Thr
115 120 125

Ala Gln Asp Pro Met Pro Phe Leu Lys Ser Ala Gly Tyr Gly Lys Ala
130 135 140

Gly Gly Thr Val Thr Pro Thr Pro Asn Thr Gly Glu Leu Leu Arg Pro
145 150 155 160

Lys Asp Ala Lys Lys Asp Glu Lys Ser Gln Val Cys Ser Gly Leu Ala

ES 2 665 821 T3

165							170							175				
Met	Glu	Lys	Tyr	Asp	Ile	Thr	Asn	Leu	Asn	Ala	Lys	Gln	Asp	Lys	Ser			
180								185				190						
Lys	Asn	Gly	Ser	Val	Lys	Glu	Leu	Lys	His	Ile	Tyr	Ser	Asn	His	Ile			
195								200				205						
Lys	Gly	Asn	Lys	Ile	Thr	Ala	Pro	Lys	Pro	Ser	Ile	Gln	Gly	Val	Val			
210				215								220						
Ile	His	Asn	Asp	Tyr	Gly	Ser	Met	Thr	Pro	Ser	Gln	Tyr	Leu	Pro	Trp			
225				230								235						
Leu	Tyr	Ala	Arg	Glu	Asn	Asn	Gly	Thr	His	Val	Asn	Gly	Trp	Ala	Ser			
				245				250				255						
Val	Tyr	Ala	Asn	Arg	Asn	Glu	Val	Leu	Trp	Tyr	His	Pro	Thr	Asp	Tyr			
				260				265				270						
Val	Glu	Trp	His	Cys	Gly	Asn	Gln	Trp	Ala	Asn	Ala	Asn	Leu	Ile	Gly			
				275				280				285						
Phe	Glu	Val	Cys	Glu	Ser	Tyr	Pro	Gly	Arg	Ile	Ser	Asp	Lys	Leu	Phe			
290				295								300						
Leu	Glu	Asn	Glu	Glu	Ala	Thr	Leu	Lys	Val	Ala	Ala	Asp	Val	Met	Lys			
305				310				315				320						
Ser	Tyr	Gly	Leu	Pro	Val	Asn	Arg	Asn	Thr	Val	Arg	Leu	His	Asn	Glu			
				325				330				335						
Phe	Phe	Gly	Thr	Ser	Cys	Pro	His	Arg	Ser	Trp	Asp	Leu	His	Val	Gly			
				340				345				350						
Lys	Gly	Glu	Pro	Tyr	Thr	Thr	Thr	Asn	Ile	Asn	Lys	Met	Lys	Asp	Tyr			
				355				360				365						
Phe	Ile	Lys	Arg	Ile	Lys	His	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Gly	Lys	Leu	Glu	Val			
370				375								380						
Ser	Lys	Ala	Ala	Thr	Ile	Lys	Gln	Ser	Asp	Val	Lys	Gln	Glu	Val	Lys			
385				390				395				400						
Lys	Gln	Glu	Ala	Lys	Gln	Ile	Val	Lys	Ala	Thr	Asp	Trp	Lys	Gln	Asn			
				405				410				415						

ES 2 665 821 T3

Lys Asp Gly Ile Trp Tyr Lys Ala Glu His Ala Ser Phe Thr Val Thr
420 425 430

Ala Pro Glu Gly Ile Ile Thr Arg Tyr Lys Gly Pro Trp Thr Gly His
435 440 445

Pro Gln Ala Gly Val Leu Gln Lys Gly Gln Thr Ile Lys Tyr Asp Glu
450 455 460

Val Gln Lys Phe Asp Gly His Val Trp Val Ser Trp Glu Thr Phe Glu
465 470 475 480

Gly Glu Thr Val Tyr Met Pro Val Arg Thr Trp Asp Ala Lys Thr Gly
485 490 495

Lys Val Gly Lys Leu Trp Gly Glu Ile Lys
500 505

<210> 2

<211> 462

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Políptico quimérico

<400> 2

ES 2 665 821 T3

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

ES 2 665 821 T3

115					120					125					
Ala	Gln	Asp	Pro	Met	Pro	Phe	Leu	Lys	Ser	Ala	Gly	Tyr	Gly	Lys	Ala
130						135					140				
Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Pro	Thr	Pro	Asn	Thr	Gly	Leu	Lys	His	Ile	Tyr
145					150					155					160
Ser	Asn	His	Ile	Lys	Gly	Asn	Lys	Ile	Thr	Ala	Pro	Lys	Pro	Ser	Ile
				165					170					175	
Gln	Gly	Val	Val	Ile	His	Asn	Asp	Tyr	Gly	Ser	Met	Thr	Pro	Ser	Gln
			180					185					190		
Tyr	Leu	Pro	Trp	Leu	Tyr	Ala	Arg	Glu	Asn	Asn	Gly	Thr	His	Val	Asn
		195					200					205			
Gly	Trp	Ala	Ser	Val	Tyr	Ala	Asn	Arg	Asn	Glu	Val	Leu	Trp	Tyr	His
	210					215					220				
Pro	Thr	Asp	Tyr	Val	Glu	Trp	His	Cys	Gly	Asn	Gln	Trp	Ala	Asn	Ala
225					230					235					240
Asn	Leu	Ile	Gly	Phe	Glu	Val	Cys	Glu	Ser	Tyr	Pro	Gly	Arg	Ile	Ser
				245					250					255	
Asp	Lys	Leu	Phe	Leu	Glu	Asn	Glu	Glu	Ala	Thr	Leu	Lys	Val	Ala	Ala
			260					265					270		
Asp	Val	Met	Lys	Ser	Tyr	Gly	Leu	Pro	Val	Asn	Arg	Asn	Thr	Val	Arg
		275					280					285			
Leu	His	Asn	Glu	Phe	Phe	Gly	Thr	Ser	Cys	Pro	His	Arg	Ser	Trp	Asp
	290					295					300				
Leu	His	Val	Gly	Lys	Gly	Glu	Pro	Tyr	Thr	Thr	Thr	Asn	Ile	Asn	Lys
305					310					315					320
Met	Lys	Asp	Tyr	Phe	Ile	Lys	Arg	Ile	Lys	His	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Gly
				325					330					335	
Lys	Leu	Glu	Val	Ser	Lys	Ala	Ala	Thr	Ile	Lys	Gln	Ser	Asp	Val	Lys
			340					345					350		
Gln	Glu	Val	Lys	Lys	Gln	Glu	Ala	Lys	Gln	Ile	Val	Lys	Ala	Thr	Asp
		355					360					365			

ES 2 665 821 T3

Trp Lys Gln Asn Lys Asp Gly Ile Trp Tyr Lys Ala Glu His Ala Ser
370 375 380

Phe Thr Val Thr Ala Pro Glu Gly Ile Ile Thr Arg Tyr Lys Gly Pro
385 390 395 400

Trp Thr Gly His Pro Gln Ala Gly Val Leu Gln Lys Gly Gln Thr Ile
405 410 415

Lys Tyr Asp Glu Val Gln Lys Phe Asp Gly His Val Trp Val Ser Trp
420 425 430

Glu Thr Phe Glu Gly Glu Thr Val Tyr Met Pro Val Arg Thr Trp Asp
435 440 445

Ala Lys Thr Gly Lys Val Gly Lys Leu Trp Gly Glu Ile Lys
450 455 460

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido de endolisina específico para *Staphylococcus*, dicho polipéptido que comprende:

- i). un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 2, o
- ii). un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 1 y que tiene una delección de al menos 5, 10, 20, 30, o 40 aminoácidos en la región de aminoácidos 156 a 199 de la SEQ ID N.º: 1,

donde el polipéptido de endolisina tiene una actividad específica mejorada y/o una inmunogenicidad reducida en comparación con un polipéptido de endolisina con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID N.º: 1.

2. Polipéptido de endolisina según la reivindicación 1 que tiene la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID N.º: 2.

3. Polinucleótido que codifica el polipéptido de endolisina según la reivindicación 1 o 2.

4. Construcción de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido según la reivindicación 3.

5. Vector de expresión que comprende la construcción de ácidos nucleicos según la reivindicación 4.

6. Célula hospedadora que comprende el polinucleótido según la reivindicación 3, la construcción de ácidos nucleicos según la reivindicación 4 o la construcción de expresión según la reivindicación 5.

7. Método para la producción del polipéptido de endolisina según la reivindicación 1 o 2, que comprende:

- cultivar la célula hospedadora según la reivindicación 6 bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido de endolisina,
- opcionalmente, aislar y purificar el polipéptido de endolisina a partir del caldo de cultivo, y
- opcionalmente, liofilizar el polipéptido de endolisina.

8. Método para purificar el polipéptido de endolisina según la reivindicación 1 o 2 que comprende la diálisis de la endolisina según la reivindicación 1 o 2, dicha diálisis que incluye las etapas de:

- diálisis de la endolisina según la reivindicación 1 o 2 frente a un tampón que comprende un compuesto quelante, y
- diálisis de la endolisina según la reivindicación 1 o 2 frente a un tampón que contiene un ión de metal bivalente, preferiblemente un ión de metal bivalente seleccionado del grupo que consiste en Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} .

9. Composición que comprende el polipéptido de endolisina según la reivindicación 1 o 2, o el polinucleótido según la reivindicación 3, o la construcción de ácidos nucleicos según la reivindicación 4, o la construcción de expresión según la reivindicación 5, o la célula hospedadora según la reivindicación 6.

10. Composición farmacéutica que comprende el polipéptido de endolisina según la reivindicación 1 o 2, o el polinucleótido según la reivindicación 3, o la construcción de ácidos nucleicos según la reivindicación 4, o la construcción de expresión según la reivindicación 5, o la célula hospedadora según la reivindicación 6, dicha composición farmacéutica que comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

11. Composición según la reivindicación 9 o 10, que comprende además un principio activo adicional.

12. Composición según la reivindicación 9, 10 u 11, para uso como un medicamento, preferiblemente para uso como un medicamento en el tratamiento de una afección asociada a una infección por *Staphylococcus*.

13. Uso *in vitro* del polipéptido de endolisina según la reivindicación 1 o 2, o el polinucleótido según la reivindicación 3, o la construcción de ácidos nucleicos según la reivindicación 4, o la construcción de expresión según la reivindicación 5, o la célula hospedadora según la reivindicación 6, o la composición según la reivindicación 9, 10 u 11, como un antimicrobiano, preferiblemente como un aditivo alimenticio o como un desinfectante.

14. Uso *in vitro* del polipéptido de endolisina según la reivindicación 1 o 2, o el polinucleótido según la reivindicación 3, o la construcción de ácidos nucleicos según la reivindicación 4, o la construcción de expresión según la reivindicación 5, o la célula hospedadora según la reivindicación 6, o la composición según la reivindicación 9, 10 u 11, para detectar un *Staphylococcus*, preferiblemente en una aplicación de diagnóstico.

Fig. 1

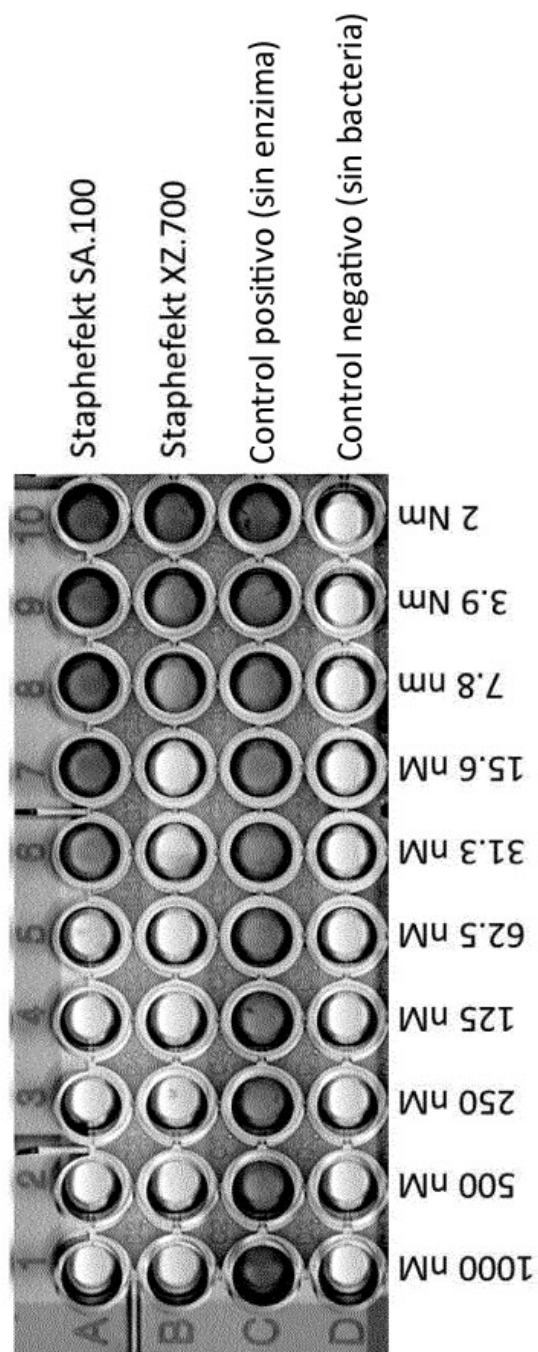


Fig. 2a

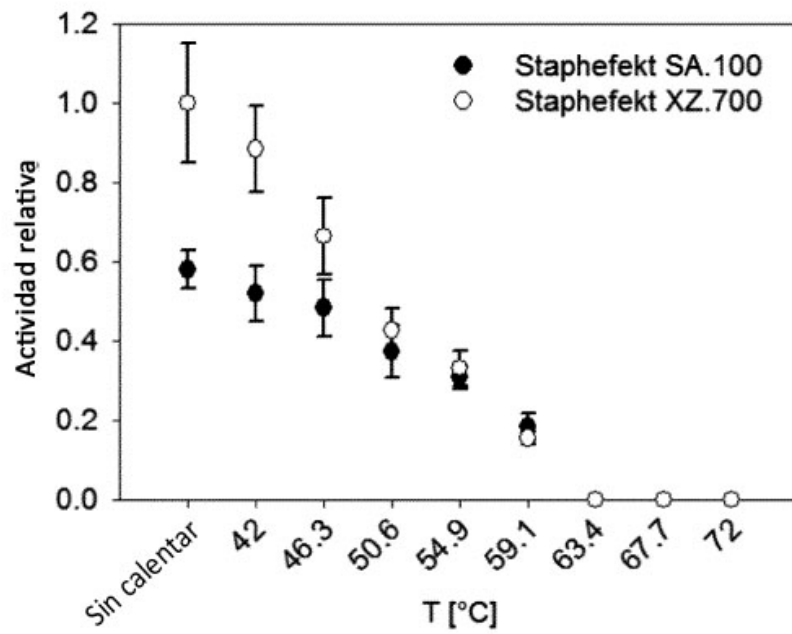


Fig. 2b

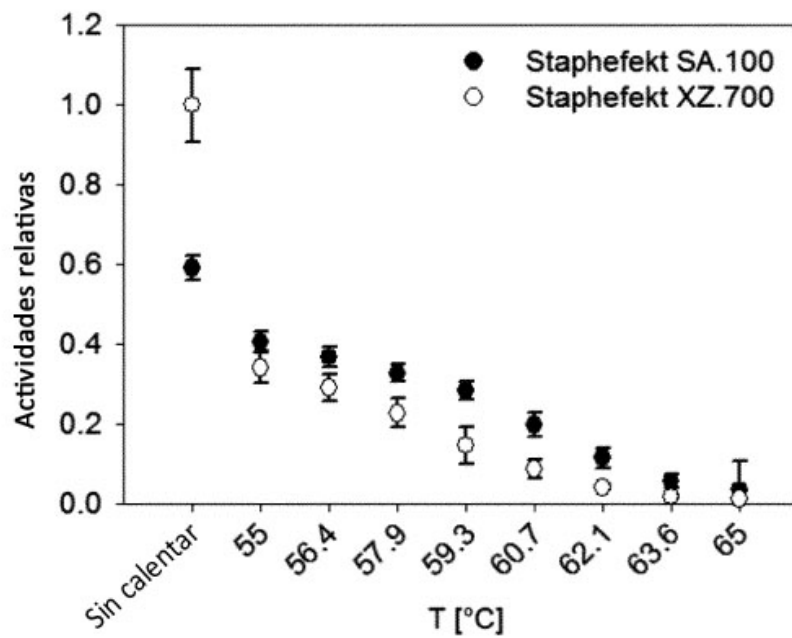


Fig. 3

