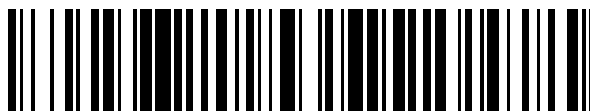


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 670**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2012 PCT/US2012/034456**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012 WO12145630**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2012 E 12773653 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2699253**

54 Título: **Lisinas de bacteriófagos de Streptococcus para la detección y tratamiento de bacterias gram positivas**

30 Prioridad:

21.04.2011 US 201161477836 P

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

21.09.2018

73 Titular/es:

**THE ROCKEFELLER UNIVERSITY (100.0%)
1230 York Avenue 502 Founders Hall
New York, NY 10065-6399, US**

72 Inventor/es:

**FISCHETTI, VINCENT, A.;
SCHMITZ, JONATHAN;
GILMER, DANIEL y
EULER, CHAD**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 682 670 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

Lisinas de bacteriófagos de *Streptococcus* para la detección y tratamiento de bacterias gram positivas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere generalmente a métodos, composiciones y artículos de fabricación útiles para la mejora y tratamiento profiláctico y terapéutico de bacterias gram-positivas, incluyendo cepas bacterianas de *Streptococcus* y *Staphylococcus*, incluyendo bacterias patógenas y resistentes a antibióticos, y afecciones relacionadas. La invención se refiere a composiciones y artículos de fabricación que incorporan lisinas aisladas de bacteriófagos de *Streptococcus suis* incluyendo las enzimas líticas PlySs2 y/o PlySs1 y variantes de estas, incluyendo truncamientos de estas, y a métodos que utilizan los polipéptidos y composiciones de lisinas.

Antecedentes de la invención

10 Un problema principal en la medicina ha sido el desarrollo de bacterias resistentes a fármacos al usarse más antibióticos para una amplia variedad de enfermedades y otras afecciones. Las infecciones hospitalarias son la 8ª causa principal de muerte en los Estados Unidos, debido en gran medida a los patógenos resistentes a fármacos y que están surgiendo recientemente. Por ejemplo, hay más de 500.000 casos de *Staphylococcus aureus* anualmente en los EE. UU. y más del 65% de las cepas son resistentes a múltiples fármacos (MRSA). El uso de más antibióticos y el número de bacterias que muestran resistencia ha impulsado tiempos de tratamiento más largos. Además, se están usando ahora más frecuentemente los antibióticos de amplio espectro, no específicos, algunos de los cuales tienen efectos perjudiciales sobre el paciente. Un problema relacionado con este uso incrementado es que muchos antibióticos no penetran los revestimientos mucosos fácilmente. Adicionalmente, parece que se está incrementando el número de personas alérgicas a los antibióticos. De acuerdo con esto, existe una necesidad comercial de nuevas estrategias antibacterianas, especialmente aquellas que funcionan a través de nuevas modalidades o proporcionan nuevos medios para matar a las bacterias patógenas.

25 Las bacterias gram-positivas están rodeadas de una pared celular que contiene polipéptidos y polisacáridos. La pared celular de las gram-positivas aparece como una pared amplia, densa, que tiene un grosor de 20-80 nm y consiste en numerosas capas de interconexión de peptidoglicano. Entre el 60% y el 90% de la pared celular de las gram-positivas es peptidoglicano, que proporciona forma a la célula, una estructura rígida, y resistencia al choque osmótico. La pared celular no excluye la tinción con cristal violeta Gram, permitiendo que las células se tiñan de morado y, por lo tanto, se clasifican como "Gram-positivas". Las bacterias gram-positivas incluyen, pero no están limitadas a, los géneros *Actinomyces*, *Bacillus*, *Listeria*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, y *Clostridium*. Las especies médicamente relevantes incluyen *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, y *Enterococcus faecalis*. Las especies de *Bacillus*, que forman esporas, causan ántrax y gastroenteritis. Las especies de *Clostridium* que forman esporas son las responsables del botulismo, tétanos, gangrena gaseosa y colitis pseudomembranosa. Las especies de *Corynebacterium* causan difteria, y las especies de *Listeria* causan meningitis.

35 Los antibacterianos que inhiben la síntesis de la pared celular, tales como las penicilinas y las cefalosporinas, interfieren con la unión de los interpeptidos del peptidoglicano y debilitan la pared celular de bacterias tanto gram positivas como gram negativas. Como los peptidoglicanos de las bacterias gram-positivas están expuestos, las bacterias gram-positivas son más susceptibles a estos antibióticos. Ventajosamente, las células eucariotas carecen de paredes celulares y no son susceptibles a estos fármacos u otros agentes de la pared celular.

40 Se han hecho intentos para tratar enfermedades bacterianas a través del uso de bacteriófagos. Sin embargo, la introducción directa de bacteriófagos en un animal para prevenir o luchar contra las enfermedades tiene determinados inconvenientes. Específicamente, tanto las bacterias como el fago tienen que estar en los ciclos de crecimiento correctos y sincronizados para que el fago se una. Adicionalmente, debe haber el número correcto de fagos para unirse a las bacterias; si hay demasiados o demasiados pocos fagos, no habrá bien unión o producción de la enzima lisante. El fago también debe ser lo suficientemente activo. Los fagos también se inhiben por muchas cosas incluyendo los restos bacterianos del organismo que va a atacar. Una complicación más del uso directo de un bacteriófago para tratar infecciones bacterianas es la posibilidad de reacciones inmunológicas, que hacen que el fago no sea funcional.

50 Las nuevas estrategias de terapia antimicrobiana incluyen antibióticos basados en enzimas ("enzibióticos") tales como lisinas de bacteriófagos. Los fagos usan estas lisinas para digerir la pared celular de sus huéspedes bacterianos, liberando la progenie viral a través de la lisis hipotónica. Un resultado similar se produce cuando se añaden externamente lisinas recombinantes purificadas a bacterias Gram-positivas. La alta actividad letal de las lisinas frente a los patógenos Gram-positivos las hace candidatos atractivos para el desarrollo como agentes terapéuticos. Las lisinas de los bacteriófagos se propusieron inicialmente para erradicar el transporte nasofaríngeo de estreptococos patógenos (Loeffler, J. M. et al (2001) Science 294: 2170-2172; Nelson, D. et al (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:4107-4112). Las lisinas son parte del mecanismo lítico usado por los fagos con ADN bicatenario (ADNs) para coordinar la lisis del huésped con la compleción del ensamblaje viral (Wang, I. N. et al (2000) Annu Rev Microbiol 54:799-825). El fago codifica tanto holinas que abren un poro en la membrana bacteriana como

hidrolasas de peptidoglicanos denominadas lisinas que rompen los enlaces en la pared bacteriana [6]. Posteriormente en la infección, la lisina se transloca a la matriz de la pared celular donde hidroliza rápidamente los enlaces covalentes esenciales para la integridad del peptidoglicano, causando la lisis bacteriana y la liberación concomitante de la progenie del fago.

5 Los miembros de la familia de las lisinas presentan un diseño modular en el que un dominio catalítico se fusiona con un dominio de especificidad o de unión (Lopez, R. et al (1997) Microb Drug Resist 3:199-211). Las lisinas pueden clonarse a partir de secuencias de profago viral en los genomas bacterianos y usarse para tratamiento (Beres, S.B. et al (2007) PLoS ONE 2(8):1-14). Cuando se añaden externamente, las lisinas son capaces de acceder a los enlaces de una pared celular Gram-positiva (Figura 1) (Fischetti, V.A. (2008) Curr Opin Microbiol 11:393-400). Se ha mostrado que las lisinas demuestran una alta actividad letal frente a numerosos patógenos Gram-positivos (especialmente, la bacteria a partir de la cual se clonaron), surgiendo la posibilidad de su desarrollo como agentes terapéuticos (Fischetti, V.A. (2008) Curr Opin Microbiol 11:393-400; Nelson, D.L. et al (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:4107-4112).

15 Se ha establecido que las enzimas líticas de los bacteriófagos son útiles en la evaluación y tratamiento específico de varios tipos de infecciones en sujetos a través de varias rutas de administración. Por ejemplo, la Patente U.S. 5,604,109 (Fischetti et al.) se refiere a la rápida detección de estreptococos del Grupo A en especímenes clínicos, a través de la digestión enzimática con una enzima lisina asociada a un fago estreptococal del Grupo C semipurificada. El trabajo de esta enzima se convirtió en la base de las investigaciones adicionales, dando lugar a métodos para tratar enfermedades. Las patentes de Fischetti y Loomis (Patentes U.S. 5,985,271, 6,017,528 y 20 6,056,955) describen el uso de una enzima lisina producida por bacterias estreptococales del grupo C infectadas con un bacteriófago C1. La Patente U.S. 6,248,324 (Fischetti y Loomis) describe una composición para infecciones dermatológicas por el uso de una enzima lítica en un vehículo adecuado para la aplicación tópica en tejidos dérmicos. La Patente U.S. 6,254,866 (Fischetti y Loomis) describe un método para el tratamiento de infecciones bacterianas del tracto digestivo que comprende administrar una enzima lítica específica para las bacterias causantes de la infección. El vehículo para administrar al menos una enzima lítica al tracto digestivo se selecciona del grupo 25 que consiste en supositorios, enemas, jarabes o píldoras con recubrimiento entérico. La Patente U.S. 6,264,945 (Fischetti y Loomis) describe un método y una composición para el tratamiento de infecciones bacterianas por la introducción parenteral (intramuscularmente, subcutáneamente, o intravenosamente) de al menos una enzima lítica producida por una bacteria infectada con un bacteriófago específico para esa bacteria y un vehículo apropiado para 30 administrar la enzima lítica en un paciente.

Las enzimas líticas asociadas a fagos se han identificado y clonado de varios bacteriófagos, mostrando cada una que es efectiva para matar cepas bacterianas específicas. La Patente U.S. 7,402,309, 7,638,600 y la Solicitud PCT publicada WO2008/018854 proporciona distintas enzimas líticas asociadas a fagos útiles como agentes antibacterianos para el tratamiento o reducción de infecciones por *Bacillus anthracis*. La Patente U.S. 7,569,223 35 describe enzimas líticas para *Streptococcus pneumoniae*. La lisina útil para *Enterococcus* (*E. faecalis* y *E. faecium*, incluyendo cepas resistentes a vancomicina) se describen en la Patente U.S. 7,582,291. US 2008/0221035 describe lisinas mutantes Ply GBS altamente efectivas para matar estreptococos del Grupo B. Una lisina química denominada ClyS, con actividad frente a bacterias estafilococales, incluyendo *Staphylococcus aureus*, se detalla en WO 2010/002959.

40 *Streptococcus suis* es un patógeno Gram-positivo que infecta a los cerdos en todo el mundo. Los reportes de transmisión zoonótica de cerdos a seres humanos están incrementando (Sriskandan S. et al (2006) PLoS Medicine 3(5):585-567). *S. suis* puede desarrollar una presencia consistente en poblaciones humanas en los años venideros. Los seres humanos y los cerdos se han tratado con penicilina o gentamicina, pero existen aislados de *S. suis* resistentes a estos antibióticos (Cantin, M. et al (1992) J Vet Diagnostic Investig 4:170-174).

45 Es evidente a partir de las deficiencias y problemas asociados con los actuales agentes antibacterianos tradicionales que todavía existe una necesidad en la técnica de agentes bacterianos específicos adicionales y también de agentes con un espectro más amplio, particularmente sin los altos riesgos de la resistencia adquirida. Es importante que, hasta la fecha, no se ha mostrado que ninguna lisina demuestre una actividad lítica amplia frente a múltiples especies distintas de bacterias patogénicamente y clínicamente relevantes.

50 WO2011/091412 identifica, secuencia y aísla un gen de lisina del bacteriófago A25 que expresa una proteína implicada en la lisis de células bacterianas. La solicitud proporciona además métodos para lisar determinadas bacterias usando lisina, que son útiles, por ejemplo, en un procedimiento de diagnóstico diseñado para detectar esas bacterias.

55 US2006/0292135 proporciona una composición y un método para tratar infecciones bacterianas usando proteínas, péptidos, o fragmentos de péptidos codificados por un bacteriófago.

Fischetti V. (2010) Int J Med Microbiol 300:357-362) revisa el uso de lisinas de bacteriófago para controlar una variedad de infecciones.

S Lucas et al (2009, Sequencing the draft genome and assembly of *Streptococcus suis* 89/1591, Uniprot:B9WWF8)

describe la secuencia genética de *Streptococcus suis*.

Gilmer, D. B. et al (2013) *Antimicrob Agents and Chemo* 57:2743-2750) reporta la protección frente a la infección mixta por *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina con el uso de una nueva lisina de bacteriófago con una actividad lítica amplia.

- 5 Las citas de referencias en la presente memoria no deben considerarse como una admisión de que estas son técnica anterior respecto a la presente invención.

Resumen de la invención

En su aspecto más amplio, la presente descripción proporciona una lisina que tiene una amplia actividad letal frente a múltiples bacterias, particularmente bacterias gram-positivas, incluyendo cepas bacterianas de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus faecalis* y *Listeria monocytogenes*. La descripción proporciona una lisina de bacteriófago capaz de matar a bacterias de distintos órdenes. En un aspecto, se proporciona un polipéptido de lisina capaz de matar a una o más bacterias de distintos órdenes de Bacilli, particularmente del orden Bacillales y del orden Lactobacillales. La presente invención proporciona un polipéptido de lisina capaz de y que se demuestra que mata a bacterias de dos órdenes distintos, particularmente Bacillales y Lactobacillales, *in vitro* e *in vivo*. La lisina de la presente descripción es capaz de matar a bacterias Bacillales y Lactobacillales en cultivo mixto y en infecciones mixtas *in vivo*. La invención contempla el tratamiento, descolonización, y/o descontaminación de bacterias, cultivos o infecciones o en casos en los que más de una bacteria gram positiva, particularmente una o más bacterias *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus faecalis* y *Listeria monocytogenes*, se sospecha que están presentes o están presentes. La invención contempla el tratamiento, descolonización, y/o descontaminación de bacterias, cultivos o infecciones o en casos en los que más de un tipo de bacterias Bacillales, más de un tipo de bacterias Lactobacillales, o al menos un tipo de bacterias Bacillales y un tipo de bacterias Lactobacillales se sospecha que están presentes, están presentes o pueden estar presentes.

Según la presente invención, se proporcionan lisinas de bacteriófagos que derivan de bacterias *Streptococcus suis*. Dos lisinas ejemplares distintas y únicas se han aislado y caracterizado, particularmente PlySs1, incluyendo un truncamiento activo de esta, y PlySs2. Los polipéptidos de lisina de la presente invención son únicos demostrando una amplia actividad letal frente a múltiples bacterias, particularmente bacterias gram-positivas, incluyendo cepas bacterianas de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus faecalis* y *Listeria monocytogenes*. En uno de dichos aspectos, la lisina PlySs2 es capaz de matar cepas y bacterias *Staphylococcus aureus* en modelos animales, como se demuestra en la presente memoria en ratones. PlySs2 es efectiva frente a *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos tales como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia a vancomicina (VISA), y *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (VRSA). En uno de dichos aspectos adicionales, la lisina PlySs1 es capaz de reducir el crecimiento de cepas y bacterias *Staphylococcus aureus*, incluyendo *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos tales como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia a vancomicina (VISA), o *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (VRSA). La invención incluye composiciones y artículos de fabricación que comprenden los polipéptidos de lisina y dichas composiciones para uso en métodos de prevención y tratamiento del crecimiento, colonización e infecciones bacterianas.

En un aspecto de la descripción, se proporciona un método para matar a bacterias gram-positivas que comprende la etapa de poner en contacto las bacterias con una composición que comprende una cantidad de un polipéptido de lisina aislado efectivo para matar a bacterias gram-positivas, comprendiendo el polipéptido de lisina aislado el polipéptido de lisina PlySs2 o variantes de este efectivo para matar a bacterias gram-positivas.

Así, se proporciona un método para matar a bacterias gram-positivas que comprende la etapa de poner en contacto las bacterias con una composición que comprende una cantidad de un polipéptido de lisina aislado efectivo para matar a bacterias gram-positivas, comprendiendo el polipéptido de lisina aislado la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 o variantes de esta que tienen al menos una identidad del 80%, una identidad del 85%, una identidad del 90%, una identidad del 95% o una identidad del 99% con el polipéptido de SEQ ID NO:3 y efectivo para matar a bacterias gram-positivas.

En un aspecto adicional del método anterior, la composición comprende además una cantidad efectiva del polipéptido de lisina aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; una lisina truncada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con una modificación mediante la cual la lisina truncada comprende solo un dominio catalítico seleccionado del grupo que consiste en un dominio de endopeptidasa y un dominio de glucosaminidasa, comprendiendo el polipéptido de lisina aislado la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, o variantes de esta que tienen al menos una identidad del 80% con el polipéptido de SEQ ID NO:1 o de SEQ ID NO:2 y que es efectivo para matar a bacterias gram-positivas.

En un aspecto de los métodos anteriores para matar a bacterias gram positivas, los métodos se realizan *in vitro* o *ex vivo* de manera que se esteriliza o descontamina una disolución, material o dispositivo, particularmente pretendido para uso por o en un ser humano. La invención proporciona un método *in vitro* o *ex vivo* para reducir o controlar una infección o contaminación por bacterias gram-positivas causada por una o más de las bacterias *Staphylococcus*,

bacterias *Streptococcus*, bacterias *Listeria monocytogenes* y bacterias *Enterococcus faecalis* en una disolución, material o dispositivo que comprende la etapa de poner en contacto la disolución, material o dispositivo con una cantidad efectiva de una composición que comprende un polipéptido de lisina aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 o variantes de este que tienen al menos una identidad del 80% con el polipéptido de SEQ ID NO:3 y que es efectivo para matar a dichas bacterias gram-positivas seleccionadas de bacterias *Staphylococcus*, bacterias *Streptococcus*, bacterias *Listeria monocytogenes* y bacterias *Enterococcus faecalis*.

En una realización de la presente invención, se proporciona un método en el que la composición comprende además un polipéptido de lisina aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; una lisina truncada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con una modificación mediante la cual la lisina truncada solo comprende un dominio catalítico seleccionado del grupo que consiste en un dominio de endopeptidasa y un dominio de glucosaminidasa; comprendiendo el polipéptido aislado la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2; o variantes de este que tienen al menos una identidad del 80% con el polipéptido de SEQ ID NO:1 o de SEQ ID NO:2 y que es efectivo para matar a bacterias gram-positivas seleccionadas de cepas de *Staphylococcus*, cepas de *Streptococcus*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis*.

En un aspecto de los métodos anteriores para reducir una población de bacterias gram positivas, los métodos se realizan *in vitro* o *ex vivo* de manera que se esteriliza o descontamina una disolución, material o dispositivo, particularmente pretendido para uso por o en un ser humano.

La presente descripción proporciona además un método para tratar una infección por *Staphylococcus aureus* resistente a antibiótico en un ser humano que comprende la etapa de administrar a un ser humano que tiene una infección por *Staphylococcus aureus* resistente a antibiótico, una cantidad efectiva de la composición que comprende un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 o variantes de este que tienen al menos una identidad del 80%, una identidad del 85%, una identidad del 90% o una identidad del 95% con el polipéptido de SEQ ID NO:3 y que es efectivo para matar a *Staphylococcus aureus*, mediante lo cual se reduce el número de *Staphylococcus aureus* en el ser humano y se controla la infección.

En un aspecto de este método, la composición puede comprender además una cantidad efectiva del polipéptido de lisina aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; una lisina truncada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con una modificación mediante la cual la lisina truncada comprende solo un dominio catalítico seleccionado del grupo que consiste en un dominio de endopeptidasa y un dominio de glucosaminidasa, comprendiendo el polipéptido de lisina aislado la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, o variantes de esta que tienen al menos una identidad del 80%, una identidad del 85%, una identidad del 90% o una identidad del 95% con el polipéptido de SEQ ID NO:1 o de SEQ ID NO:2 y que es efectivo para matar a *Staphylococcus aureus*.

En un aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de lisina aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 o variantes de este que tienen una identidad de al menos el 80% con el polipéptido de SEQ ID NO:3 y que mata efectivamente a las bacterias gram-positivas seleccionadas de cepas de *Staphylococcus*, cepas de *Streptococcus*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis* y que comprende además un vehículo, aditivo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La composición de uso en el método anterior puede comprender además un polipéptido de lisina aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; una lisina truncada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con una modificación mediante la cual la lisina truncada solo comprende un dominio catalítico seleccionado del grupo que consiste en un dominio de endopeptidasa y un dominio de glucosaminidasa; comprendiendo el polipéptido de lisina aislado la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2; o variantes de este que tienen al menos una identidad del 80% con el polipéptido de SEQ ID NO:1 o de SEQ ID NO:2 y que es efectivo para matar a bacterias gram-positivas seleccionadas de cepas de *Staphylococcus*, cepas de *Streptococcus*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis*.

La descripción incluye adicionalmente una composición para uso en un método para tratar a un sujeto humano expuesto a o que presenta riesgo de exposición a una bacteria gram-positiva patogénica que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad de un polipéptido de lisina aislado efectivo para matar a las bacterias gram-positivas, comprendiendo el polipéptido de lisina aislado la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 o variantes de esta que tienen al menos una identidad del 80%, una identidad del 85%, una identidad del 90% o una identidad del 95% con el polipéptido de SEQ ID NO:3 y que es efectivo para matar a las bacterias gram-positivas. En un aspecto particular de este método, en el que el sujeto se expone a o presenta riesgo de una o una o más de las bacterias *Staphylococcus* (tal como *Staphylococcus aureus*), *Streptococcus* (tal como *Streptococcus pyogenes*), *Listeria monocytogenes*, o *Enterococcus faecalis*. El sujeto puede ser un ser humano. El sujeto puede ser un adulto, niño, bebé o feto humano.

Las variantes de un polipéptido de lisina de uso en las composiciones, y métodos de la invención pueden ser sustancialmente idénticas a uno o más de los polipéptidos de lisina ejemplificados en la presente memoria, incluyendo a SEQ ID NO: 1, 2 o 3. Las variantes de un polipéptido de lisina en las composiciones y métodos de la invención pueden tener al menos una identidad del 80%, al menos una identidad del 90%, al menos una identidad

del 95% en la secuencia de aminoácidos comparado con el o los polipéptidos de lisina ejemplificados en la presente memoria, incluyendo a SEQ ID NO: 1, 2 o 3.

5 En cualquiera de dicho método o métodos anteriores, las bacterias susceptibles, matadas o tratadas pueden seleccionarse de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus equi zoo*, *Streptococcus agalactiae* (GBS), *Streptococcus pyogenes* (GAS), *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus* Grupo G, *Streptococcus* Grupo E, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus pneumonia*.

10 Según cualquiera de los métodos de la invención, las bacterias susceptibles o las bacterias tratadas o descolonizadas pueden ser bacterias resistentes a antibiótico. Las bacterias pueden ser *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina (MRSA), *Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia a vancomicina (VISA), o *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina (VRSA). Las bacterias susceptibles pueden ser una bacteria clínicamente relevante o patogénica, particularmente para los seres humanos. En un aspecto del o de los métodos, el o los polipéptidos de lisina son efectivos para matar a cepas de las bacterias *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus faecalis* y *Listeria monocytogenes*.

15 Según cualquiera de los métodos de la invención, la composición de estos puede comprender además un vehículo, incluyendo un vehículo, aditivo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Según cualquiera de los métodos de la invención, la composición de estos puede comprender además un vehículo adecuado para la administración del polipéptido a un sitio de infección. Según cualquiera de los métodos de la invención, la composición de estos puede comprender además uno o más antibióticos.

20 La invención proporciona composiciones, incluyendo composiciones terapéuticas y farmacéuticas que comprenden uno o más polipéptidos de lisina de la invención.

25 La invención proporciona así una composición farmacéutica para uso para matar bacterias gram-positivas seleccionadas de cepas de *Staphylococcus*, cepas de *Streptococcus*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis* en un método para tratar una infección por bacterias gram-positivas causada por dichas bacterias en un ser humano, que comprende un polipéptido de lisina aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 o variantes de esta que tienen al menos una identidad del 80% con el polipéptido de SEQ ID NO:3 y que es efectivo para matar a dichas bacterias gram-positivas. En una realización, la composición farmacéutica puede comprender además un polipéptido de lisina aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; una lisina truncada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con una modificación mediante la cual
30 la lisina truncada solo comprende un dominio catalítico seleccionado del grupo que consiste en un dominio de endopeptidasa y un dominio de glucosaminidasa; comprendiendo el polipéptido de lisina aislado la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2; o variantes de este que tienen al menos una identidad del 80% con el polipéptido de SEQ ID NO:1 o de SEQ ID NO:2 y que es efectivo para matar a bacterias gram-positivas seleccionadas de cepas de *Staphylococcus*, cepas de *Streptococcus*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis*.

35 La invención incluye un artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene una composición que comprende un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, o variantes de esta que tienen al menos una identidad del 80%, una identidad del 85%, una identidad del 90% o una identidad del 95% con el polipéptido de SEQ ID NO:3 y que es efectivo para matar a bacterias gram-positivas, e instrucciones para uso de la composición en el tratamiento de un paciente expuesto a o que presenta síntomas consistentes con
40 la exposición a bacterias *Staphylococcus*, *Streptococcus* o *Listeria monocytogenes*, en el que las instrucciones para uso de la composición indican un método para usar la composición, comprendiendo el método las etapas de:

a) identificar al paciente que se sospecha que ha estado expuesto a bacterias *Staphylococcus*, *Streptococcus* o *Listeria monocytogenes*; y

b) administrar una cantidad efectiva de la composición al paciente.

45 En un aspecto del artículo de la invención, el polipéptido aislado de la composición tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3. En un aspecto adicional del artículo de la invención, la composición comprende además un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; una lisina truncada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con una modificación mediante la cual la lisina truncada solo comprende un dominio catalítico seleccionado del grupo que consiste en un dominio de endopeptidasa y un
50 dominio de glucosaminidasa; la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, o variantes de esta que tienen al menos una identidad del 80%, una identidad del 85%, una identidad del 90% o una identidad del 95% con el polipéptido de SEQ ID NO:1 o de SEQ ID NO:2 y que es efectivo para matar a bacterias gram-positivas.

55 Las composiciones de la invención pueden demostrar o tener actividad letal particularmente frente a una o más cepas bacterianas, seleccionadas particularmente del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus equi zoo*, *Streptococcus agalactiae* (GBS), *Streptococcus pyogenes* (GAS), *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus* Grupo G, *Streptococcus* Grupo E, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus pneumonia*.

La presente descripción también proporciona ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de lisina de la invención. Así, se proporcionan ácidos nucleicos que codifican las lisinas de *S. suis* PlySs1, lisina truncada o completa, y PlySs2. Las secuencias de ácidos nucleicos ejemplares se proporcionan en la Figura 3 y en la Figura 4. En la presente memoria se proporcionan ácidos nucleicos capaces de codificar un polipéptido de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3, incluyendo variantes de estas.

La presente descripción también se refiere a una molécula de ADN recombinante o gen clonado, o una variante degenerada de este, que codifica una lisina o polipéptido de lisina de *S. suis*; preferiblemente, una molécula de ácido nucleico, en particular una molécula de ADN recombinante o gen clonado, que codifica el polipéptido de lisina PlySs1, lisina truncada o completa, y/o el polipéptido de lisina PlySs2, que tiene una secuencia de nucleótidos o es complementaria a una secuencia de ADN mostrada en la Figura 3 y en la Figura 4.

En una realización adicional de la descripción, la secuencia de ADN completa de la molécula de ADN recombinante, gen clonado, o secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de lisina de este documento puede estar unida de forma operativa a una secuencia de control de la expresión que puede introducirse en un huésped apropiado. La descripción se extiende de acuerdo con esto a huéspedes unicelulares, incluyendo huéspedes bacterianos, transformados con la secuencia de ácido nucleico, gen clonado o molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica el o los presentes polipéptidos de lisina, y más particularmente, la secuencia de ADN completa determinada a partir de las secuencias mostradas anteriormente y en la Figura 3 y Figura 4.

La presente descripción contempla naturalmente varios medios para la preparación del o de los polipéptidos de lisina, incluyendo, como se ilustra en la presente memoria, técnicas recombinantes conocidas, y se pretende que la descripción, de acuerdo con esto, englobe dichas preparaciones sintéticas en su alcance. El aislamiento de las secuencias de ADN y aminoácidos descritas en la presente memoria facilita la reproducción del o de los polipéptidos de lisina por dichas técnicas recombinantes, y, de acuerdo con esto, la descripción se extiende a los vectores de expresión preparados a partir de las secuencias de ADN descritas para la expresión en sistemas de huéspedes por técnicas de ADN recombinante, y a los huéspedes transformados resultantes.

Según otras características preferidas de determinadas realizaciones de la presente descripción, se proporciona un sistema de expresión recombinante para producir polipéptido o polipéptidos de lisina biológicamente activos. Se proporciona un proceso para la preparación de los polipéptidos, particularmente uno o más polipéptidos de lisina de la invención, que comprende cultivar una célula huésped que contiene un vector de expresión que codifica uno o más polipéptidos de lisina de la descripción o que es capaz de expresar polipéptido(s) de lisina de la descripción, y recuperar el o los polipéptidos.

La utilidad de diagnóstico de la presente descripción se extiende al uso de los presentes polipéptidos de lisina en ensayos para cribar para determinar la presencia de bacterias gram-positivas, para cribar para determinar la presencia de bacterias gram-positivas susceptibles, o para determinar la susceptibilidad de las bacterias a la capacidad letal o de lisis por uno o más polipéptidos de lisina de la descripción.

La presente descripción se extiende al desarrollo de anticuerpos frente a polipéptido(s) de lisina, alternativamente frente a la diana de escisión del polipéptido de lisina, incluyendo anticuerpos producidos de forma natural o preparados recombinantemente. Dichos anticuerpos podrían incluir tanto anticuerpos policlonales como monoclonales preparados por técnicas genéticas conocidas, así como anticuerpos biespecíficos (quiméricos) y anticuerpos que incluyen otras funcionalidades que los hacen idóneos para el uso diagnóstico adicional en conjunción con su capacidad de modular la actividad lisina.

Los polipéptidos de lisina que se modifican y son proteínas quiméricas o de fusión, o que están marcados, se contemplan y proporcionan en la presente memoria. En una proteína quimérica o de fusión, el o los polipéptidos de lisina de la descripción pueden unirse de forma covalente a una entidad que puede proporcionar una función adicional o aumentar el uso o aplicación del o de los polipéptidos de lisina, incluyendo, por ejemplo, una etiqueta, marcaje, restos de direccionamiento o ligando, un resto o agente de unión a células o de reconocimiento de células, un agente antibacteriano, un anticuerpo, un antibiótico. Los marcajes ejemplares incluyen un marcaje radiactivo, tal como los isótopos, ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , y ^{186}Re . El marcaje puede ser una enzima, y la detección del polipéptido de lisina marcado puede conseguirse por cualquiera de las técnicas utilizadas o aceptadas presentemente como colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas, amperométricas o gasométricas conocidas en la técnica.

Otros objetos y ventajas serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una revisión de la siguiente descripción que sigue con referencia a los siguientes dibujos ilustrativos.

Descripción breve de los dibujos

La **Figura 1** representa el ciclo lítico frente al tratamiento con lisina. Las lisinas expresadas recombinantemente y purificadas son capaces de lisar a las bacterias tan bien como las lisinas expresadas en fagos desde el interior de su huésped.

La **Figura 2** representa los dominios de PlySs2. El dominio catalítico corresponde a los residuos 8-146. Hay un conector de 16 residuos. El dominio de unión corresponde a los residuos 162-228.

5 La **Figura 3A y 3B** proporciona la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la lisina PlySs1, así como un análisis de dominios proteicos. Se proporciona la secuencia de aminoácidos de la PlySs1 de longitud completa (SEQ ID NO:1) y PlySs1 truncada (SEQ ID NO:2). Se indican el dominio endopeptidasa (SEQ ID NO:6), dominio CPL-7 dual (SEQ ID NO:7) y dominio glucosaminidasa (SEQ ID NO:8).

10 La **Figura 4A y 4B** proporciona la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la lisina PlySs2, así como un análisis de dominios proteicos. La secuencia de aminoácidos de PlySs2 corresponde a SEQ ID NO:3. El dominio CHAP y el dominio SH-3 de la lisina PlySs2 están sombreados, empezando el dominio CHAP con LNN... y terminando con ...YIT (SEQ ID NO:4) y empezando el dominio SH-3 con RSY ... y terminando con ...VAT (SEQ ID NO:5).

La **Figura 5** representa el vector pBAD24. La secuencia empieza con el promotor inducible por arabinosa pBAD para la polimerasa T7 y termina con PlySs2. La ampicilina sirve como un marcador selectivo para asegurar la retención del plásmido al crecer las células.

15 La **Figura 6** muestra la purificación de PlySs2. Todas las muestras se corrieron en geles de Bis-Tris al 4-12% a 200 V durante ~40 mins y se tiñeron con Coomassie. **A.** El flujo a través de la columna DEAE que contenía PlySs2 a ~26 kDa. **B.** Seis fracciones representativas de PlySs2 purificada a partir de una preparación de 10 L. **C.** Una única banda a ~26 kDa que indica la pureza de PlySs2 después de que todas las fracciones se combinaran conjuntamente.

20 La **Figura 7** representa varios aspectos de la caracterización de PlySs2. **A.** Para ensayar el pH óptimo para la actividad de PlySs2, se mezclaron 50 µL de varios niveles de pH de tampones fosfato/citrato con 195 µL de células de la cepa de *S. suis* 7997 y 5 µL de lisina. PlySs2 tuvo la actividad más potente a pH 8,0. Se mostró que PlySs2 tenía una actividad aguda hasta pH 9,7. **B.** Se añadieron 195 µL de células, 5µL de lisina a 50 µL de varias concentraciones de NaCl para determinar la concentración de sal óptima para PlySs2. **C.** Para determinar la estabilidad frente a la temperatura de PlySs2, se incubó durante 30 minutos a varias temperaturas, se enfrió y después se añadió a 245 µL de células suspendidas en Na₃PO₄ 15 mM, pH 8,0. **D.** Se añadió PlySs2 a células suspendidas en Na₃PO₄ 15 mM, pH 8,0 junto con varias concentraciones de etilendiaminotetraacetato (EDTA) para determinar si requiere un cofactor. En los controles, el H₂O dd reemplazó a PlySs2 para todos los ensayos.

30 La **Figura 8** representa el pH óptimo de PlySs2 determinado frente a la cepa de *S. suis* 7997 en tampón Bis-tris propano (BTP) hasta un nivel de pH mayor.

Figura 9. La estabilidad de PlySS2 purificada se determinó evaluando la eficacia letal frente a la cepa 7997 después de almacenamiento a 37°C durante hasta 48 horas en tampón.

Figura 10. Eficacia letal, evaluada por DO₆₀₀ del crecimiento de la cepa 7997 después de tratamiento con lisina PlySs2 después del almacenamiento de la lisina a -80°C durante hasta 7 meses en tampón.

35 La **Figura 11A y 11B** representa la dependencia del pH de ΔPlySs1. **(A)** Las células de la cepa huésped 7711 se suspendieron en tampón fosfato citrato (40/20 mM) a un intervalo de valores de pH de 4,6 a 8,0. Se añadió ΔPlySs1 (110 µg/ml) y se midió la DO₆₀₀ durante 60 min (eje horizontal) a 37°C. El eje vertical representa la relación de DO₆₀₀ para tratado/no tratado a cada punto de tiempo. Para cada valor de pH, la curva representa el promedio de la operación de 3 experimentos independientes. Globalmente, la actividad fue máxima en el extremo superior del intervalo de tampón. **(B)** Aquí, se empleó bis-tris-propano (40 mM) como el agente tampón con un intervalo de pH de 7,0 a 9,7; de nuevo, se añadió ΔPlySs1 a 110 µg/ml. Cada curva representa el promedio de operación de 3 experimentos. La actividad máxima se observó a pH = 9,0, aunque el grado cuantitativo de disminución de DO fue, en general, menor que en fosfato-citrato.

45 La **Figura 12** representa la dependencia de NaCl de ΔPLYSS1. Las células de *S. suis* 7711 se suspendieron en tampón fosfato-citrato pH = 7,8 (40/20 mM). Se añadió NaCl a las concentraciones anteriores, seguido de ΔPlySs1 a 110 µg/ml. La densidad óptica a 600 nm se observó durante 60 min a 37°C. En esta figura, el eje vertical representa la relación de DO₆₀₀ para tratado/no tratado para cada concentración de NaCl, promediada de 3 experimentos independientes.

50 La **Figura 13A y 13B** proporciona la evaluación de la susceptibilidad de ΔPlySs1 a DTT y EDTA. **(A)** ΔPlySs1 se preincubó durante 1 hr con DTT 5 mM (un gran exceso molar) antes de la adición a las células 7711; la actividad no cambió. **(B)** Aquí, se incluyeron varias concentraciones de EDTA en la suspensión de células tamponada antes de la adición de ΔPlySs1 (110 µg/ml de lisina). Para ambas imágenes, el eje vertical representa la relación de DO₆₀₀ para tratado/no tratado para cada condición, promediada de 3 experimentos independientes.

55 La **Figura 14A y 14B** muestra la estabilidad de ΔPlySs1 frente a la temperatura. **(A)** Una disolución madre de ΔPlySs1 se mantuvo a cada una de las temperaturas anteriores durante 30 minutos, seguido de la adición a células 7711 (270 µg/ml concentración final de la enzima, temperatura final = 37° C, condiciones ideales de tampón). Las

curvas en esta imagen representan los promedios de operación de 3 experimentos individuales. En cada caso, se observó la pérdida completa de actividad entre las muestras de 45° C y 50° C. Las 3 muestras más calientes muestran una lectura de DO₆₀₀ ligeramente superior que el control no tratado debido a la floculación de ΔPlySs1 después de la desnaturalización. **(B)** El experimento anterior se repitió, pero con 6 horas de tratamiento con calor antes del ensayo. A este tiempo de incubación más largo, la muestra de 45° C mostró alguna pérdida de actividad, aunque no completa. La muestra de 40° C mantuvo una actividad esencialmente nativa.

Figura 15A y 15B (A) PlySs2 tiene una actividad lítica aguda frente a la cepa de *S. suis* 7997 a, o por encima de, 8ug/mL. **(B)** Actividad de PlySs2 evaluada *in vitro* frente a la cepa de *S. suis* S735.

La **Figura 16A-16D** proporciona la actividad de PlySs2 frente a diferentes especies y cepas. Se usó *S. suis* 7997 como un control positivo para cada ensayo. **A.** Actividad de PlySs2 frente a cepas de *S. suis*. **B.** Actividad de PlySs2 frente a diferentes especies de bacterias y 2 cepas de *S. suis*. **C.** Sensibilidad de estreptococos y estafilococos frente a PlySs2. **D.** Varias especies ensayadas para determinar su susceptibilidad al tratamiento con PlySs2.

La **Figura 17A y 17B** muestra la actividad de PlySs2 frente a múltiples especies, serotipos, y cepas de bacterias. En cada caso, la DO₆₀₀ para tratado/no tratado se representa en un gráfico de barras. Las barras de las cepas de *S. aureus* están coloreadas en rojo; las barras correspondientes a las cepas de *S. suis* están coloreadas en naranja. Las barras de las bacterias *Listeria* y otras bacterias de interés se muestran en morado.

Figura 18. Se ensayó PlySS2 por análisis MIC estándar para determinar su capacidad de matar a cepas de estafilococos. En este ensayo se incluyeron estafilococos resistentes tales como estafilococos resistentes a vancomicina (VRSA), con sensibilidad intermedia a vancomicina (VISA) y resistentes a metilicina (MRSA). Las tres cepas VRSA ensayadas representan la mitad de todos los aislados conocidos.

La **Figura 19** proporciona la actividad bacteriolítica de ΔPlySs1. Aquí se representan las curvas de caída en la DO para tres cepas de *S. suis*: 7711, la cepa de serotipo 7 de la que se clonó originalmente PlySs1 (es decir, la cepa huésped); S735, un aislado de serotipo 2 que es la cepa tipo para la especie; y 7997, una cepa de serotipo 9 virulenta. Las bacterias se suspendieron en tampón fosfato 20 mM pH 7,8, EDTA 2 mM (definido como las condiciones óptimas). Se añadió ΔPlySs1 a las células a un intervalo de concentraciones (indicado por el inserto). Para cada muestra, se midió la densidad óptica a 600 nm (eje vertical) durante el curso de una hora (eje horizontal) a 37°C. En esta imagen, todas las curvas representan los promedios de operación de 3 o 4 experimentos independientes.

La **Figura 20** muestra la inhibición del crecimiento por ΔPlySs1 de *S. suis* 7711. Se añadió ΔPlySs1 a las concentraciones finales anteriores a una suspensión diluida de la cepa de *S. suis* 7711 en caldo BHI. Se midió la densidad óptica de cada muestra continuamente toda la noche en un formato de placas de 96 pocillos. Globalmente, el crecimiento bacteriano se retrasó de una manera dependiente de la dosis. Sin embargo, para las concentraciones de enzima que fueron suficientes para inducir la lisis en disoluciones tamponadas (130 y 50 μg/ml), el efecto fue bastante mínimo aquí. Además, ninguna de las concentraciones anteriores de ΔPlySs1 inhibió el crecimiento completamente, por lo tanto, no se pudo asignar una MIC. Para todas las muestras tratadas, se observará que las densidades ópticas finales son realmente mayores que las de la muestra no tratada. Esto es un artefacto de la acumulación de restos bacterianos agregados que aparecieron en presencia de la enzima lítica.

La **Figura 21** proporciona un panel de cepas bacterianas Δ PlySs1. La información proporcionada en la Figura 19 y en las Tablas 3 y 4 se resume gráficamente para dos concentraciones de PlySs1, 130 μg/ml y 32,5 μg/ml. En la imagen, las cepas de *S. suis* se indican con asteriscos dobles en rojo y los estreptococos no suis se indican con asteriscos únicos en negro. Se muestra la respuesta de densidad óptica (relación de DO₆₀₀ para tratados frente a no tratados) después de 1 hr. El lector se refiere a la Tabla 3 para las definiciones de serotipo de las cepas de *S. suis*.

La **Figura 22** proporciona resultados del ensayo letal de CFU de la actividad bacteriolítica de PlySs2 frente a la cepa de *S. suis* 7997 y S735.

La **Figura 23** representa los resultados de un ensayo de resistencia de *S. aureus* y *S. pyogenes* frente a PlySS2 comparado con el antibiótico mupirocina. Ninguna de las cepas de MRSA MW2, cepa de MSSA 8325, ni la cepa de *S. pyogenes* 5005 desarrollaron resistencia frente a PlySs2 después de que cada una se expusiera a concentraciones con incrementos crecientes de PlySs2. Tanto MW2 como 8325 desarrollaron resistencia al control positivo, mupirocina.

La **Figura 24** representa la supervivencia de ratones con bacteremia de MRSA durante 10 días. PlySs2 eliminó la bacteremia del 95% de los ratones ensayados. De los controles, solo sobrevivió el 5%.

La **Figura 25** proporciona la actividad de PlySs2 frente a diferentes especies y cepas. Se expusieron cultivos en fase logarítmica a 32 μg/ml de PlySs2 durante 60 minutos en tampón fosfato. Las DO₆₀₀ finales de las muestras tratadas se dividieron por las DO₆₀₀ finales de las muestras no tratadas para generar los valores normalizados anteriores. Se ensayaron múltiples *Staphylococci* (incluyendo, pero no limitado a: MRSA, MSSA, y VISA), *Streptococci*, *Listeria*, *Enterococci*, y *Bacilli* para determinar su susceptibilidad a la actividad de PlySs2. Se ensayaron *Escherichia* y *Pseudomonas* como controles Gram-negativos.

La **Figura 26** representa el efecto bactericida de PlySs2 en varias cepas. El efecto bactericida de 128 µg/ml de PlySs2 60 mins después del tratamiento. La reducción de las cuentas CFU se presenta a lo largo de una escala logarítmica. De forma característica, PlySs2 tuvo una actividad significativa frente a MRSA MW2. Debe indicarse que PlySs2 redujo dramáticamente *S. agalactiae* y *L. monocytogenes*. No hubo ninguna reducción en el número del control negativo *E. coli*.

La **Figura 27** representa la concentración inhibidora mínima (MIC) de PlySs2 para varias bacterias Gram-positivas. Hubo una MIC baja para MRSA MW2, como se esperaba, y una MIC mayor para *S. pyogenes* 5005. La MIC de PlySs2 se correlaciona con la actividad lítica y los ensayos bactericidas. La MIC de PlySs2 para el control negativo *E. coli* fue por consiguiente inmensurable.

La **Figura 28** muestra ratones protegidos con PlySs2 frente a la muerte causada por infección mixta por MRSA y *S. pyogenes*. Se inyectó a los ratones FVB/NJ intraperitonealmente mucina al 5% que contenía $\sim 5 \times 10^5$ CFU de la cepa de MRSA MW2, $\sim 1 \times 10^7$ de la cepa de *S. pyogenes* 5005, o combinación de ambas bacterias (infección mixta) de los inóculos anteriores a las mismas concentraciones. Tres horas después de la infección, los ratones en todos los grupos de infección (A-C), recibieron una inyección intraperitoneal de control de tampón fosfato 20 mM, 1 mg de ClyS, 1 mg de PlyC, o una combinación de 1 mg de ClyS más 1 mg de PlyC para la infección mixta. Los tratamientos con PlySs2 consistieron en 1 mg para las infecciones con MRSA (A), o 2 mg para las infecciones con *S. pyogenes* y mixtas (B-C). Los ratones se monitorizaron para determinar la supervivencia durante diez días. Los resultados de cuatro experimentos independientes se combinaron y los datos de supervivencia de los ratones se representaron gráficamente con una curva de Supervivencia de Kaplan Meier.

La **Figura 29** representa la actividad de PlySs2 y vancomicina frente a aislados de MRSA.

La **Figura 30** proporciona el alineamiento del dominio enzimático de PlySs2 con ClyS. Los dominios CHAP de las lisinas estreptococales PlySs2 y PlyC (subunidad A, GenBank no. AAP42310) se alinean. Las identidades de aminoácidos se indican con asteriscos subyacentes y resaltado. Las posiciones de los presuntos residuos catalíticos (cisteína e histidina, para los que el dominio está identificado) se indican con flechas.

Descripción detallada

Según la presente invención pueden emplearse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro de la experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, p. ej., Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volúmenes I-III [J. E. Celis, ed. (1994)]; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B.D. Hames y S.J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription And Translation" [B.D. Hames y S.J. Higgins, eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R.I. Freshney, ed. (1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984).

Por lo tanto, si aparecen en la presente memoria, los siguientes términos tendrán las definiciones como se proporciona y se muestra más adelante y en esta sección.

Los términos "lisina(s) de *S. suis*", "lisina(s) de PlySs", "lisina PlySs1", "PlySs1", "PlySs1 completa", "PlySs1 truncada", " Δ PlySs1", "lisina PlySs2", "PlySs2" y cualesquiera variantes no listadas específicamente, pueden usarse en la presente memoria indistintamente, y como se usan a lo largo de la presente solicitud y reivindicaciones se refieren a material proteínico incluyendo proteínas únicas o múltiples, y se extiende a aquellas proteínas que tienen los datos de secuencia de aminoácidos descritos en la presente memoria y presentados en la Figura 3 y en la Figura 4 (SEQ ID NOS: 1, 2 y/o 3), y el perfil de actividades mostrado en la presente memoria y en las Reivindicaciones. De acuerdo con esto, se contemplan asimismo las proteínas que presentan una actividad sustancialmente equivalente o alterada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, tales como modificaciones obtenidas a través de mutagénesis dirigida a sitio, o pueden ser accidentales, tales como las obtenidas a través de mutaciones en huéspedes que son productores del complejo o de sus subunidades identificadas. También, se pretende que los términos lisina(s) de *S. suis*", "lisina(s) de PlySs", "lisina PlySs1", "PlySs1", "PlySs1 completa", "PlySs1 truncada", " Δ PlySs1", "lisina PlySs2", "PlySs2" incluyan en su alcance proteínas recitadas específicamente en la presente memoria, así como todos los análogos sustancialmente homólogos, fragmentos o truncamientos, y variaciones alélicas.

Polipéptidos y enzimas líticas

Una "enzima lítica" incluye cualquier enzima lítica de la pared celular bacteriana que mata a una o más bacterias en las condiciones adecuadas y durante un periodo de tiempo relevante. Los ejemplos de enzimas líticas incluyen, sin limitación, varias enzimas líticas de la pared celular bacteriana amidadas.

Una "enzima lítica de *S. suis*" incluye una enzima lítica que es capaz de matar al menos a una o más bacterias *Streptococcus suis* en condiciones adecuadas y durante un periodo de tiempo relevante.

Una "enzima lítica de bacteriófago" se refiere a una enzima lítica extraída o aislada de un bacteriófago o una enzima

lítica sintetizada con una estructura proteica similar que mantiene una funcionalidad de enzima lítica.

Una enzima lítica es capaz de escindir específicamente enlaces que están presentes en el peptidoglicano de las células bacterianas para disrumpir la pared celular bacteriana. También se postula actualmente que el peptidoglicano de la pared celular bacteriana está altamente conservado entre la mayor parte de las bacterias, y que la escisión de solo unos pocos enlaces puede disrumpir la pared celular bacteriana. La enzima lítica de bacteriófagos puede ser una amidasa, aunque son posibles otros tipos de enzimas. Los ejemplos de enzimas líticas que escinden estos enlaces son varias amidasas tales como muramidásas, glucosaminidasas, endopeptidasas, o N-acetil-muramoil-L-alanina amidasas. Fischetti et al (1974) reportaron que la enzima lisina del fago estreptococal C1 era una amidasa. Garcia et al (1987, 1990) reportaron que la lisina Cpl de un *S. pneumoniae* de un fago Cp-1 era una lisozima. Caldentey y Bamford (1992) reportaron que una enzima lítica del fago phi 6 de *Pseudomonas* era una endopeptidasa, que rompía el puente peptídico formado por el ácido melo-diaminopimílico y D-alanina. Las enzimas líticas del fago T1 y T6 de *E. coli* son amidasas como lo es la enzima lítica del fago de *Listeria* (ply) (Loessner et al, 1996). También hay otras enzimas líticas conocidas en la técnica que son capaces de escindir una pared celular bacteriana.

Una "enzima lítica codificada genéticamente por un bacteriófago" incluye un polipéptido capaz de matar a una bacteria huésped, por ejemplo, al tener al menos algo de actividad lítica de la pared celular frente a la bacteria huésped. El polipéptido puede tener una secuencia que engloba la enzima lítica de secuencia nativa y variantes de esta. El polipéptido puede aislarse a partir de una variedad de fuentes, tales como un bacteriófago ("fago"), o prepararse por métodos recombinantes o sintéticos, tales como los descritos por Garcia et al y también como se proporciona en la presente memoria. El polipéptido puede comprender una parte de unión a colina en el lado carboxilo terminal y puede caracterizarse por una actividad enzimática capaz de escindir el peptidoglicano de la pared celular (tal como actividad amidasa para actuar en los enlaces amida en el peptidoglicano) en el lado amino terminal. Se han descrito enzimas líticas que incluyen múltiples actividades enzimáticas, por ejemplo, dos dominios enzimáticos, tales como la lisina PlyGBS. Hablando en general, una enzima lítica puede tener un peso molecular de entre 25.000 y 35.000 daltons y comprender una única cadena polipeptídica; sin embargo, esto puede variar dependiendo de la cadena enzimática. El peso molecular puede determinarse lo más convenientemente por un ensayo en electroforesis en gel desnaturante con dodecil sulfato de sodio y por comparación con marcadores de peso molecular.

"Una enzima lítica asociada con fago de secuencia nativa" incluye un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que una enzima derivada de una bacteria. Dicha enzima de secuencia nativa puede aislarse o puede producirse por medios recombinantes o sintéticos.

El término "enzima de secuencia nativa" engloba formas naturales (p. ej., formas con corte y empalme alternativo o alteradas) y variantes naturales de la enzima. En una realización de la invención, la enzima de secuencia nativa es un polipéptido maduro o de longitud completa que está codificado genéticamente por un gen de un bacteriófago específico para *Streptococcus suis*. Por supuesto, son posibles y conocidas varias variantes, como se reconoce en publicaciones tales como Lopez et al., Microbial Drug Resistance 3: 199-211 (1997); Garcia et al., Gene 86: 81-88 (1990); Garcia et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 914-918 (1988); Garcia et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 914-918 (1988); Garcia et al., Streptococcal Genetics (J. J. Ferretti y Curtis eds., 1987); Lopez et al., FEMS Microbiol. Lett. 100: 439-448 (1992); Romero et al., J. Bacteriol. 172: 5064-5070 (1990); Ronda et al., Eur. J. Biochem. 164: 621-624 (1987) y Sanchez et al., Gene 61: 13-19 (1987).

"Una enzima lítica de secuencia variante" incluye una enzima lítica caracterizada por una secuencia polipeptídica que es diferente de la de una enzima lítica, pero retiene la actividad funcional. La enzima lítica puede, en algunas realizaciones, estar codificada genéticamente por un bacteriófago específico para *Streptococcus suis* que tiene una identidad en la secuencia de aminoácidos particular con la(s) secuencia(s) de la enzima lítica de este documento, como se proporciona en la Figura 3 y Figura 4 o en cualquiera de las SEQ ID NOS: 1, 2 o 3. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una enzima lítica funcionalmente activa puede matar a las bacterias *Streptococcus suis*, y otras bacterias susceptibles como se proporciona en la presente memoria, incluyendo como se muestra en la Tabla 1 y en las Figuras 9 y 10, mediante la disrupción de la pared celular de las bacterias. Una enzima lítica activa puede tener una identidad en la secuencia de aminoácidos del 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 o 99,5% con la o las secuencias de la enzima lítica de este documento, como se proporciona en la Figura 3 y Figura 4 o en cualquiera de las SEQ ID NOS: 1, 2 o 3. Dichas variantes de enzimas líticas asociadas a fago incluyen, por ejemplo, polipéptidos de enzimas líticas en los que uno o más residuos de aminoácidos se añaden, o delecionan en el extremo N o C de la secuencia de la o las secuencias de la enzima lítica de este documento, como se proporciona en la Figura 3 y Figura 4 o en cualquiera de las SEQ ID NOS: 1, 2 o 3. En un aspecto particular, una enzima lítica asociada a fago tendrá una identidad en la secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 80% o 85% con las secuencias de enzimas líticas asociadas a fago nativas, particularmente una identidad en la secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 90% (p. ej., el 90%). Lo más particularmente, una variante de una enzima lítica asociada a fago tendrá una identidad en la secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 95% (p. ej., el 95%) con la o las secuencias de la enzima lítica asociada a fago nativa de este documento, como se proporciona en la Figura 3 y Figura 4 o en cualquiera de las SEQ ID NOS: 1, 2 o 3.

El "porcentaje de la identidad de la secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de enzimas líticas

asociadas a fagos identificadas se define en la presente memoria como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de la enzima lítica asociada a fago, después de alinear las secuencias en el mismo marco de lectura e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de la secuencia.

El "porcentaje de la identidad de la secuencia de ácidos nucleicos" con respecto a las secuencias de enzimas líticas asociadas a fagos identificadas en la presente memoria se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en la secuencia de la enzima lítica asociada a fago, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima (p. ej., pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de nucleótidos). Se comparan entonces los nucleótidos o aminoácidos en las posiciones correspondientes de nucleótidos o aminoácidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo nucleótido o aminoácido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad=no. de posiciones idénticas/no. total de posiciones por 100).

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede conseguirse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877 (1993). Dicho algoritmo se incorpora en el programa NBLAST que puede usarse para identificar secuencias que tienen la identidad deseada con las secuencias de nucleótidos de la invención. Para obtener alineamientos con huecos para propósitos de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., Nucleic Acids Res, 25:3389-3402 (1997). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (p. ej., NBLAST). Véanse los programas proporcionados por National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health. En una realización, los parámetros para la comparación de secuencias pueden ajustarse a $W=12$. Los parámetros también pueden variarse (p. ej., $W=5$ o $W=20$). El valor "W" determina cuántos nucleótidos continuos deben ser idénticos para que el programa identifique dos secuencias como que contienen regiones de identidad.

"Polipéptido" incluye una molécula polimérica comprendida por múltiples aminoácidos unidos de una manera lineal. Un polipéptido se puede, en algunas realizaciones, corresponder a molécula codificadas por una secuencia de polinucleótidos que es natural. El polipéptido puede incluir sustituciones conservativas en las que el aminoácido natural se reemplaza por uno que tiene propiedades similares, en la que dichas sustituciones conservativas no alteran la función del polipéptido (véase, por ejemplo, Lewin "Genes V" Oxford University Press Capítulo 1, p. 9-13 1994).

El término "enzimas líticas alteradas" incluye enzimas líticas con redistribución de dominios ("shuffled") y/o quiméricas.

Se ha encontrado que las enzimas líticas de fagos específicas para bacterias infectadas con un fago específico degradan efectivamente y eficientemente la pared celular de la bacteria en cuestión. Se cree que la enzima lítica carece de actividad enzimática proteolítica y, por lo tanto, no es destructora para las proteínas y tejidos de mamíferos cuando está presente durante la digestión de la pared celular bacteriana. Como se muestra por Loeffler et al., "Rapid Killing of *Streptococcus pneumoniae* with a Bacteriophage Cell Wall Hydrolase," Science, 294: 2170-2172 (7 de dic., 2001), y material suplementario de este publicado en línea por la revista Science, una enzima lítica purificada de bacteriófago pneumococcal, tal como Pal, es capaz de matar a varios pneumococos. Loeffler et al. han mostrado a través de estos experimentos que en segundos después del contacto, la enzima lítica Pal es capaz de matar a 15 cepas clínicas de *S. pneumoniae*, incluyendo los serogrupos aislados más frecuentemente y las cepas resistentes a penicilina, in vitro. El tratamiento de ratones con Pal también fue capaz de eliminar o reducir significativamente el transporte nasal del serotipo 14 de una manera dependiente de la dosis. Además, como se ha encontrado que la acción de Pal, como la de otras enzimas líticas de fagos, pero a diferencia de los antibióticos, era bastante específica para el patógeno diana, es probable que la flora normal permanecerá esencialmente intacta (M. J. Loessner, G. Wendlinger, S. Scherer, Mol Microbiol 16, 1231-41. (1995)). Por el contrario, el polipéptido de lisina de la presente invención tiene un perfil letal para bacterias notablemente amplio y clínicamente significativo. Como se demuestra en la presente memoria, por ejemplo, la lisina aislada PlySs2 de *S. suis*, es efectiva para matar a *S. suis*, y también a varias otras cepas de *Streptococcus*, incluyendo *Streptococcus* del Grupo B (GBS), cepas de *Staphylococcus*, incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* y *Listeria*. La lisina de la presente invención demuestra así una amplitud letal para células bacterianas a diferencia de cualquier lisina reportada o contemplada previamente.

Un polipéptido o enzima lítica de la invención puede producirse por el organismo bacteriano después de ser infectado con un bacteriófago particular bien como un tratamiento profiláctico para prevenir que aquellos que han

estado expuestos a otros que tienen los síntomas de una infección cojan la enfermedad, o como un tratamiento terapéutico para aquellos que ya están enfermos debido a la infección. En la medida en la que las secuencias del polipéptido de lisina y de los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de lisina se proporcionan en la presente memoria, la(s) enzima(s)/polipéptido(s) lítico(s) puede producirse preferiblemente a través del gen aislado para la enzima lítica del genoma del fago, poniendo el gen en un vector de transferencia, y clonando dicho vector de transferencia en un sistema de expresión, usando métodos estándar de la técnica, incluyendo como se ejemplifica en la presente memoria. La(s) enzima(s) o polipéptido(s) lítico(s) puede estar truncado, ser quimérico, con redistribución de dominios o "natural" y puede estar en combinación. Véase la Pat. U.S. No. 5.604.109 relevante. Una enzima lítica "alterada" puede producirse de varias maneras. En una realización preferida, un gen para la enzima lítica alterada del genoma del fago se pone en un vector de transferencia o movable, preferiblemente un plásmido, y el plásmido se clona en un vector de expresión o sistema de expresión. El vector de expresión para producir un polipéptido o enzima lisina de la invención puede ser adecuado para *E. coli*, *Bacillus*, o varias otras bacterias adecuadas. El sistema del vector también puede ser un sistema de expresión sin células. Todos estos métodos para expresar un gen o conjunto de genes son conocidos en la técnica. La enzima lítica también puede crearse infectando *Streptococcus suis* con un bacteriófago específico para *Streptococcus suis*, en el que dicha al menos una enzima lítica lisa exclusivamente la pared celular de dicho *Streptococcus suis* que tiene como máximo efectos mínimos sobre otra flora bacteriana, por ejemplo, natural o comensal, presente.

Una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" comprende todo o parte (preferiblemente una biológicamente activa) de un polipéptido de la invención unido de forma operativa a un polipéptido heterólogo. Las proteínas o péptidos quiméricos se producen, por ejemplo, combinando dos o más proteínas que tienen dos o más sitios activos. La proteína y péptidos quiméricos pueden actuar independientemente en la misma o diferentes moléculas, y, por lo tanto, tienen un potencial para tratar dos o más infecciones bacterianas diferentes al mismo tiempo. Las proteínas y péptidos quiméricos también pueden usarse para tratar una infección bacteriana mediante la escisión de la pared celular en más de una localización, proporcionando potencialmente así una letalidad más rápida y efectiva (o sinérgica) a partir de una única molécula de lisina o péptido quimérico.

Una región "heteróloga" de una construcción de ADN o de una construcción de péptido es un segmento identificable de ADN en una molécula de ADN mayor o péptido en una molécula de péptido mayor que no se encuentra en asociación con la molécula mayor en la naturaleza. Así, cuando la región heteróloga codifica un gen de mamífero, el gen estará flanqueado habitualmente por ADN que no flanquea el ADN genómico de mamífero en el genoma del organismo fuente. Otro ejemplo de una secuencia codificadora heteróloga es una construcción en la que la secuencia codificadora en sí misma no se encuentra en la naturaleza (p. ej., un ADNc en el que la secuencia codificadora genómica contiene intrones, o secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del gen nativo). Las variaciones alélicas o eventos mutacionales naturales no dan lugar a una región heteróloga de ADN o péptido como se define en la presente memoria.

El término "unido de forma operativa" significa que el polipéptido de la descripción y el polipéptido heterólogo están fusionados en marco. El polipéptido heterólogo puede estar fusionado en el extremo N o en el extremo C del polipéptido de la descripción. Las proteínas quiméricas se producen enzimáticamente por síntesis química, o por tecnología de ADN recombinante. Se han producido y estudiado varias enzimas líticas quiméricas. El gen EL, una lisis quimérica construida a partir de las proteínas de lisis E y L de los bacteriófagos phi X174 y MS2, respectivamente, se sometió a deleciones internas para crear una serie de nuevos clones E-L con propiedades alteradas de lisis o letales. Las actividades líticas de los genes parentales E, L, E-L, y las formas truncadas internamente de E-L se investigaron en este estudio para caracterizar el diferente mecanismo de lisis, sobre la base de las diferencias en la arquitectura de los diferentes dominios que se extienden a través de las membranas. La microscopía electrónica y la liberación de enzimas marcadoras para los espacios citoplásmico y periplásmico revelaron que podían distinguirse dos mecanismos de lisis diferentes dependiendo de la penetración de las proteínas bien de la membrana interna o las membranas interna y externa de *E. coli* (*FEMS Microbiol. Lett.* (1998) 164(1):159-67. Un ejemplo de una proteína de fusión útil es una proteína de fusión con GST en la que el polipéptido de la descripción se fusiona con el extremo C de una secuencia GST. Dicha proteína quimérica puede facilitar la purificación de un polipéptido recombinante de la descripción.

En otra realización, la proteína o péptido quimérico contiene una secuencia señal heteróloga en su extremo N. Por ejemplo, la secuencia señal nativa de un polipéptido de la descripción puede eliminarse y reemplazarse con una secuencia señal de otra proteína. Por ejemplo, la secuencia secretora de gp67 de la proteína de la cubierta de baculovirus puede usarse como una secuencia señal heteróloga (*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, 1992). Otros ejemplos de secuencias señal heterólogas eucariotas incluyen las secuencias secretoras de melitina y fosfatasa alcalina placentaria humana (*Stratagene*; La Jolla, Calif.). En otro ejemplo más, las secuencias señal heterólogas procariontas útiles incluyen la secuencia secretora de phoA (*Sambrook et al.*, supra) y la secuencia secretora de la proteína A (*Pharmacia Biotech*, Piscataway, N.J.).

La proteína de fusión puede combinar un polipéptido de lisina con una proteína o polipéptido que tiene una diferente capacidad, o que proporciona una capacidad adicional o carácter añadido al polipéptido de lisina. La proteína de fusión puede ser una proteína de fusión de inmunoglobulina en la que todo o parte de un polipéptido de la descripción se fusiona con secuencias derivadas de un miembro de la familia de proteínas inmunoglobulinas. La inmunoglobulina puede ser un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo dirigido a una proteína o epítipo de superficie

de una bacteria susceptible o diana. Una proteína de fusión de inmunoglobulina puede incorporarse en una composición farmacéutica y administrarse a un sujeto para inhibir una interacción entre un ligando (soluble o unido a membrana) y una proteína en la superficie de una célula (receptor), para suprimir de esta manera la transducción de la señal in vivo. La proteína de fusión de inmunoglobulina puede alterar la biodisponibilidad de un ligando cognado de un polipéptido de la descripción. La inhibición de la interacción ligando/receptor puede ser útil terapéuticamente, para tratar enfermedades y trastornos asociados a bacterias para modular (es decir, estimular o inhibir) la supervivencia celular. Además, una proteína de fusión de inmunoglobulina de la descripción puede usarse como un inmunógeno para producir anticuerpos dirigidos frente a un polipéptido de la descripción en un sujeto, para purificar ligandos y en ensayos de cribado para identificar moléculas que inhiben la interacción de receptores con ligandos. Las proteínas y péptidos quiméricos y de fusión de la descripción pueden producirse por técnicas estándar de ADN recombinante.

El gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales, incluyendo sintetizadores automáticos de ADN. Alternativamente, puede llevarse a cabo la amplificación por PCR de fragmentos génicos usando cebadores de anclaje que dan lugar a protuberancias complementarias entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente pueden hibridarse y reamplificarse para generar una secuencia génica quimérica (véase, p. ej., Ausubel et al., supra). Además, están disponibles comercialmente muchos vectores de expresión que ya codifican un resto de fusión (es decir, un polipéptido GST). Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención puede clonarse en dicho vector de expresión de manera que el resto de fusión está unido en marco con el polipéptido de la invención.

Tal y como se usa en la presente memoria, las proteínas o péptidos con redistribución de dominios, productos génicos, o péptidos para más de una proteína o fragmentos peptídicos de proteína de fago se han escindido y reensamblado aleatoriamente en una proteína más activa o específica. Los oligonucleótidos, péptidos o moléculas de fragmentos peptídicos con redistribución de dominios se seleccionan o criban para identificar una molécula que tiene una propiedad funcional deseada. Este método se describe, por ejemplo, en Stemmer, Pat. U.S. No. 6,132,970. (Method of shuffling polynucleotides); Kauffman, Pat. U.S. No. 5,976,862 (Evolution via Condon-based Synthesis) y Huse, Pat. U.S. No. 5,808,022 (Direct Codon Synthesis). La redistribución de dominios puede usarse para crear una proteína que es más activa, por ejemplo, hasta 10 a 100 veces más activa que la proteína molde. La proteína molde se selecciona entre diferentes variedades de proteínas lisina. La proteína o péptidos con redistribución de dominios constituyen, por ejemplo, uno o más dominios de unión y uno o más dominios catalíticos. Cada dominio de unión o catalítico deriva del mismo o diferente fago o proteína de fago. Los dominios con redistribución son bien moléculas basadas en oligonucleótidos, como gen o productos génicos, que bien solos o en combinación con otros genes o productos génicos se pueden traducir en un fragmento peptídico, o son moléculas basadas en péptidos. Los fragmentos génicos incluyen cualesquiera moléculas de ADN, ARN, híbrido ADN-ARN, ARN antisentido, Ribozimas, EST, SNIP y otras moléculas basadas en oligonucleótidos que bien solas o en combinación con otras moléculas producen una molécula de oligonucleótido capaz o incapaz de traducción en un péptido.

La forma modificada o alterada de la proteína o péptidos y fragmentos peptídicos, como se describe en la presente memoria, incluye proteína o péptidos y fragmentos peptídicos que se sintetizan químicamente o preparan por técnicas de ADN recombinante, o ambas. Estas técnicas incluyen, por ejemplo, quimerización y redistribución de dominios. Cuando la proteína o péptido se produce por síntesis química, carece sustancialmente preferiblemente de precursores químicos u otros compuestos químicos, es decir, se separa de los precursores químicos u otros compuestos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. De acuerdo con esto, dichas preparaciones de la proteína tienen menos de aproximadamente el 30%, 20%, 10%, 5% (en peso seco) de los precursores químicos o compuestos distintos del polipéptido de interés.

Una secuencia señal de un polipéptido puede facilitar el movimiento transmembrana de la proteína y péptidos y fragmentos peptídicos de la descripción a y desde membranas mucosas, así como facilitar la secreción y aislamiento de la proteína secretada u otras proteínas de interés. Las secuencias señal se caracterizan típicamente por una parte central de aminoácidos hidrofóbicos que son escindidos generalmente de la proteína madura durante la secreción en uno o más eventos de escisión. Dichos péptidos señal contienen sitios de procesamiento que permiten la escisión de la secuencia señal de las proteínas maduras al pasar estas a través de la ruta secretora. Así, la descripción puede referirse a los polipéptidos descritos que tienen una secuencia señal, así como a la secuencia señal en sí misma y al polipéptido en ausencia de la secuencia señal (es decir, los productos de la escisión). Una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia señal de la descripción puede unirse de forma operativa en un vector de expresión a una proteína de interés, tal como una proteína que habitualmente no se secreta o es de otra manera difícil de aislar. La secuencia señal dirige la secreción de la proteína, tal como desde un huésped eucariota en el que se transforma el vector de expresión, y la secuencia señal se escinde posteriormente o concurrentemente. La proteína puede purificarse fácilmente del medio extracelular por métodos reconocidos en la técnica. Alternativamente, la secuencia señal puede unirse a una proteína de interés usando una secuencia que facilita la purificación, tal como con un dominio GST.

La presente invención también se refiere a otras variantes de los polipéptidos de la invención. Dichas variantes pueden tener una secuencia de aminoácidos alterada que puede funcionar bien como agonistas (miméticos) o como antagonistas. Las variantes pueden generarse por mutagénesis, es decir, mutación o truncamiento puntual discreto.

Un agonista puede retener sustancialmente la misma, o un subconjunto, de las actividades biológicas de la forma natural de la proteína. Un antagonista de una proteína puede inhibir una o más de las actividades de la forma natural de la proteína, por ejemplo, por unión competitiva a un miembro aguas abajo o aguas arriba de una cascada de señalización celular que incluye la proteína de interés. Así, los efectos biológicos específicos pueden incitarse por el tratamiento con una variante de función limitada. El tratamiento de un sujeto con una variante que tiene un subconjunto de las actividades biológicas de la forma natural de la proteína puede tener menos efectos secundarios en un sujeto respecto al tratamiento con la forma natural de la proteína. Las variantes de una proteína de la descripción que funcionan bien como agonistas (miméticos) o como antagonistas pueden identificarse cribando bibliotecas combinatorias de mutantes, es decir, mutantes de truncamiento, de la proteína de la descripción para determinar la actividad agonista o antagonista. En una realización, se genera una biblioteca variegada de variantes por mutagénesis combinatoria a nivel del ácido nucleico y está codificada por una biblioteca génica variegada. Una biblioteca variegada de variantes puede producirse, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas de manera que un conjunto degenerado de secuencias potenciales de proteína se puede expresar como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión mayores (es decir, para exposición en fagos). Existe una variedad de métodos que pueden usarse para producir bibliotecas de variantes potenciales de los polipéptidos de la descripción a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados se conocen en la técnica (véase, p. ej., Narang (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al. (1984) *Science* 198:1056; Ike et al. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477).

Además, las bibliotecas de fragmentos de la secuencia codificadora de un polipéptido de la descripción pueden usarse para generar una población variegada de polipéptidos para el cribado y selección posterior de variantes, fragmentos activos o truncamientos. Por ejemplo, una biblioteca de fragmentos de secuencia codificadora puede generarse tratando un fragmento de PCR bicatenario de la secuencia codificadora de interés con una nucleasa en condiciones en las que se produce el mellado solo aproximadamente una vez por molécula, desnaturalizando el ADN bicatenario, renaturalizando el ADN para formar un ADN bicatenario que puede incluir parejas con sentido/antisentido de diferentes productos mellados, eliminación de las partes monocatenarias de los dúplex reformados por tratamiento con la nucleasa S1, y ligando la biblioteca de fragmentos resultante en un vector de expresión. Mediante este método, puede derivarse una biblioteca de expresión que codifica fragmentos N-terminales e internos de varios tamaños de la proteína de interés. En la técnica se conocen varias técnicas para el cribado de productos génicos de bibliotecas combinatorias preparadas por mutaciones puntuales o truncamiento, y para el cribado de bibliotecas de ADNc para productos génicos que tienen una propiedad seleccionada. Las técnicas más ampliamente usadas, que son factibles para análisis de alto rendimiento, para el cribado de bibliotecas génicas grandes incluyen típicamente la clonación de la biblioteca génica en vectores de expresión replicables, transformación de células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante, y la expresión de los genes combinatoriales en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. La mutagénesis repetitiva de conjunto (REM), una técnica que aumenta la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, puede usarse en combinación con los ensayos de cribado para identificar variantes de una proteína de la descripción (Arkin y Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) *Protein Engineering* 6(3):327-331) partes inmunológicamente activas de una proteína o fragmento peptídico incluyen regiones que se unen a anticuerpos que reconocen la enzima del fago. En este contexto, la parte más pequeña de una proteína (o ácido nucleico que codifica la proteína) según realizaciones es un epítipo que es reconocible como específico para el fago que produce la proteína lisina. De acuerdo con esto, el polipéptido más pequeño (y ácido nucleico asociado que codifica el polipéptido) que puede esperarse que se une a una diana o receptor, tal como un anticuerpo, y es útil para algunas realizaciones puede tener una longitud de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, 85, o 100 aminoácidos. Aunque secuencias pequeñas tan cortas como de una longitud de 8, 9, 10, 11, 12 o 15 aminoácidos comprenden de forma fiable suficiente estructura como para actuar como dianas o epítopos, secuencias más cortas con una longitud de 5, 6, o 7 aminoácidos pueden presentar estructura de diana o epitópica en algunas condiciones y pueden tener valor en una realización. Así, la parte más pequeña de la o las proteínas o polipéptidos de lisina proporcionada en la presente memoria, incluyendo como se muestra en las Figuras 3 y 4 y en las SEQ ID NOS: 1, 2 y/o 3, incluye polipéptidos tan pequeños como con una longitud de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 o 16 aminoácidos.

Las partes biológicamente activas de una proteína o fragmento peptídico de las realizaciones, como se describe en la presente memoria, incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos lo suficientemente idénticas a o derivadas de la secuencia de aminoácidos de la proteína del fago de la descripción, que incluyen menos aminoácidos que la proteína de longitud completa de la proteína del fago y presentan al menos una actividad de la proteína de longitud completa correspondiente. Típicamente, las partes biológicamente activas comprenden un dominio o resto con al menos una actividad de la proteína correspondiente. Una parte biológicamente activa de una proteína o fragmento de proteína de la descripción puede ser un polipéptido que tiene una longitud, por ejemplo, de 10, 25, 50, 100 menos o más aminoácidos. Además, otras partes biológicamente activas, en las que otras regiones de la proteína se delecionan, o añaden, pueden prepararse por técnicas recombinantes y evaluarse para una o más de las actividades funcionales de la forma nativa de un polipéptido de las realizaciones.

Pueden prepararse proteínas y ácidos nucleicos homólogos que comparten funcionalidad con dichas pequeñas proteínas y/o ácidos nucleicos (o regiones de proteínas y/o ácidos nucleicos de moléculas mayores) como apreciará

5 un experto en la técnica. Dichas moléculas pequeñas y regiones cortas de moléculas mayores que pueden ser homólogas específicamente se pretenden como realizaciones. Preferiblemente, la homología de dichas regiones valiosas es al menos el 50%, 65%, 75%, 80%, 85%, y preferiblemente al menos el 90%, 95%, 97%, 98%, o al menos el 99% comparado con los polipéptidos de lisina proporcionados en la presente memoria, incluyendo como se muestra en las Figuras 3 y 4 y en las SEQ ID NOS: 1, 2 y/o 3. Estos valores de porcentaje de homología no incluyen alteraciones debidas a sustituciones conservativas de aminoácidos.

10 Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" cuando al menos aproximadamente el 70% de los residuos de aminoácidos (preferiblemente, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, y preferiblemente al menos aproximadamente el 90 o 95%) son idénticos, o representan sustituciones conservativas. Las secuencias de lisinas comparables, tales como lisinas PlySs2 comparables, o lisinas PlySs1 comparables, son sustancialmente homólogas cuando uno o más, o varios, o hasta el 10%, o hasta el 15%, o hasta el 20% de los aminoácidos del polipéptido de lisina están sustituidos con una sustitución similar o conservativa de aminoácidos, y en el que las lisinas comparables tienen el perfil de actividades, efectos antibacterianos, y/o especificidades bacterianas de una lisina, tal como las lisinas PlySs2 y/o PlySs1, descritas en la presente memoria.

15 Se prefiere que los residuos de aminoácidos descritos en la presente memoria estén en la forma isomérica "L". Sin embargo, los residuos en la forma isomérica "D" pueden sustituirse por cualquier residuo de L-aminoácido, siempre que se retenga por el polipéptido la propiedad funcional deseada de unión a inmunoglobulina. NH₂ se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en el extremo carboxi de un polipéptido. Manteniendo la nomenclatura estándar de polipéptidos, J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969), las abreviaturas para los residuos de aminoácidos se muestran en la siguiente Tabla de Correspondencia:

Tabla de correspondencia

SÍMBOLO		AMINOÁCIDO
1 Letra	3 Letras	
Y	Tyr	tirosina
G	Gly	glicina
F	Phe	fenilalanina
M	Met	metionina
A	Ala	alanina
S	Ser	serina
I	Ile	isoleucina
L	Leu	leucina
T	Thr	treonina
V	Val	valina
P	Pro	prolina
K	Lys	lisina
H	His	histidina
Q	Gln	glutamina
E	Glu	ácido glutámico

SÍMBOLO		AMINOÁCIDO
1 Letra	3 Letras	
W	Trp	triptófano
R	Arg	arginina
D	Asp	ácido aspártico
N	Asn	asparagina
C	Cys	cisteína

5 Debe indicarse que todas las secuencias de residuos de aminoácidos se representan en la presente memoria por fórmulas cuya orientación izquierda y derecha está en la dirección convencional de extremo amino a extremo carboxi. Además, debe indicarse que un guion al comienzo o al final de una secuencia de residuos de aminoácidos indica un enlace peptídico con una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácidos. La Tabla anterior se presenta para correlacionar las notaciones de tres letras y una letra que pueden aparecer alternativamente en la presente memoria.

10 Pueden hacerse mutaciones en las secuencias de aminoácidos, o en las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos y lisinas de la presente memoria, incluyendo en las secuencias de lisina mostradas en la Figura 3 o en la Figura 4, o en fragmentos activos o truncamientos de estas, de manera que un codón particular se cambia a un codón que codifica un aminoácido diferente, un aminoácido se sustituye por otro aminoácido, o uno o más aminoácidos se delecionan. Dicha mutación se hace generalmente haciendo los menores cambios posibles en los aminoácidos o nucleótidos. Una mutación por sustitución de esta clase puede hacerse para cambiar un aminoácido en la proteína resultante de una manera no conservativa (por ejemplo, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a una agrupación de aminoácidos que tiene un tamaño o característica particular a un aminoácido que pertenece a otra agrupación) o de una manera conservativa (por ejemplo, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a una agrupación de aminoácidos que tiene un tamaño o característica particular a un aminoácido que pertenece a la misma agrupación). Dicho cambio conservativo da lugar generalmente a un cambio menor en la estructura y función de la proteína resultante. Es más probable que un cambio no conservativo altere la estructura, actividad o función de la proteína resultante. La presente invención debe considerarse que incluye secuencias que contienen cambios conservativos que no alteran significativamente la actividad o características de unión de la proteína resultante.

25 Así, un experto en la técnica, sobre la base de una revisión de la secuencia de los polipéptidos de lisina PlySs1 y PlySs2 proporcionadas en la presente memoria y sobre su conocimiento y la información pública disponible para otros polipéptidos de lisina, puede hacer cambios o sustituciones de aminoácidos en la secuencia del polipéptido de lisina. Los cambios de aminoácidos pueden hacerse para reemplazar o sustituir uno o más, uno o unos pocos, uno o varios, uno a cinco, uno a diez, o dicho otro número de aminoácidos en la secuencia de la o las lisinas proporcionadas en la presente memoria para generar mutantes o variantes de estas. Dichos mutantes o variantes de estas pueden predecirse para la función o ensayarse para la función o capacidad de matar a bacterias, incluyendo bacterias estafilococales, estreptococales, Listeria, o enterococales, y/o para tener una actividad comparable a la o las lisinas proporcionadas en la presente memoria. Así, pueden hacerse cambios en la secuencia de PlySs2, por ejemplo, modificando la secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 4 de este documento, y los mutantes o variantes que tienen un cambio en la secuencia pueden ensayarse usando los ensayos y métodos descritos y ejemplificados en la presente memoria, incluyendo en los ejemplos. Un experto en la técnica, sobre la base de la estructura de los dominios de la(s) lisina(s) de este documento, puede predecir uno o más, uno o varios aminoácidos adecuados para sustitución o reemplazo y/o uno o más aminoácidos que no son adecuados para sustitución o reemplazo, incluyendo sustituciones conservativas o no conservativas razonables.

40 A este respecto, y con la referencia ejemplar a la lisina PlySs2, se indica que, aunque el polipéptido de lisina PlySs2 representa una clase divergente de enzima lítica de profago, la lisina comprende un dominio CHAP N-terminal (cisteína-histidina amidohidrolasa/peptidasa) y un dominio SH3 de tipo 5 C-terminal como se representa en la Figura 4. Los dominios se representan en la secuencia de aminoácidos en regiones con un color sombreado distintivo, correspondiendo el dominio CHAP a la primera región de la secuencia de aminoácidos sombreada empezando con LNN... y correspondiendo el dominio SH3 de tipo 5 a la segunda región sombreada empezando con RSY... Los dominios CHAP están incluidos en varias lisinas de fago estreptococal y estafilococal caracterizadas previamente. Así, un experto en la técnica puede hacer y ensayar de forma razonable sustituciones o reemplazos en el dominio CHAP y/o el dominio SH-3 de PlySs2. Las comparaciones de las secuencias con la base de datos Genbank pueden

5 hacerse con cualquiera o ambas de las secuencias del dominio CHAP y/o SH-3 o con la secuencia de aminoácidos completa de la lisina PlySs2, por ejemplo, para identificar aminoácidos para sustitución. En la Figura 30, el dominio CHAP de PlySs2 se alinea con el de la lisina estreptococal bien caracterizada PlyC, demostrando residuos catalíticos conservados, pero solo un nivel modesto de identidad global (28% de identidad de secuencia). En la Figura 30, las secuencias de aminoácidos con cisteína e histidina conservadas en el dominio CHAP se muestran con una flecha. Es razonable predecir, por ejemplo, que los residuos de cisteína e histidina conservados deberían mantenerse en un mutante o variante de PlySs2 con el fin de mantener la actividad o capacidad. Es notable que un mutante o variante que tiene una alanina reemplazada con valina en el aminoácido valina 19 en la secuencia de PlySs2 de la Figura 4 y la SEQ ID NO: 3 es activa y capaz de matar a bacterias gram positivas de una manera similar a y de forma tan efectiva como la lisina de la Figura 4 y la SEQ ID NO:3.

10 Lo siguiente es un ejemplo de agrupaciones de aminoácidos:

Aminoácidos con grupos R no polares

Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina, Prolina, Fenilalanina, Triptófano, Metionina

Aminoácidos con grupos R polares no cargados

15 Glicina, Serina, Treonina, Cisteína, Tirosina, Asparagina, Glutamina

Aminoácidos con grupos R polares cargados (cargados negativamente a Ph 6,0)

Ácido aspártico, Ácido glutámico

Aminoácidos básicos (cargados positivamente a pH 6,0)

Lisina, Arginina, Histidina (a pH 6,0)

20 Otra agrupación puede ser la de aquellos aminoácidos con grupos fenilo:

Fenilalanina, Triptófano, Tirosina

Otra agrupación puede ser según el peso molecular (es decir, tamaño de los grupos R):

Glicina	75	Alanina	89
Serina	105	Prolina	115
Valina	117	Treonina	119
Cisteína	121	Leucina	131
Isoleucina	131	Asparagina	132
Ácido aspártico	133	Glutamina	146
Lisina	146	Ácido glutámico	147
Metionina	149	Histidina (a pH 6,0)	155
Fenilalanina	165	Arginina	174
Tirosina	181	Triptófano	204

Las sustituciones particularmente preferidas son:

- 25
- Lys por Arg y viceversa de manera que puede mantenerse una carga positiva;
 - Glu por Asp y viceversa de manera que puede mantenerse una carga negativa;
 - Ser por Thr de manera que puede mantenerse un -OH libre; y

- Gln por Asn de manera que puede mantenerse un NH₂ libre.

Las sustituciones de aminoácidos conservativas ejemplares y preferidas incluyen cualquiera de: glutamina (Q) por ácido glutámico (E) y viceversa; leucina (L) por valina (V) y viceversa; serina (S) por treonina (T) y viceversa; isoleucina (I) por valina (V) y viceversa; lisina (K) por glutamina (Q) y viceversa; isoleucina (I) por metionina (M) y viceversa; serina (S) por asparagina (N) y viceversa; leucina (L) por metionina (M) y viceversa; lisina (L) por ácido glutámico (E) y viceversa; alanina (A) por serina (S) y viceversa; tirosina (Y) por fenilalanina (F) y viceversa; ácido glutámico (E) por ácido aspártico (D) y viceversa; leucina (L) por isoleucina (I) y viceversa; lisina (K) por arginina (R) y viceversa.

Las sustituciones de aminoácidos también pueden introducirse para sustituir un aminoácido con una propiedad particularmente preferible. Por ejemplo, una Cys puede introducir un sitio potencial para puentes disulfuro con otra Cys. Una His puede introducirse como un sitio particularmente "catalítico" (es decir, la His puede actuar como un ácido o base y es el aminoácido más común en la catálisis bioquímica). Pro puede introducirse debido a su estructura particularmente plana, que induce giros β en la estructura de la proteína.

Un polipéptido o epítipo como se describe en la presente memoria puede usarse para generar un anticuerpo y también puede usarse para detectar la unión a la lisina o a moléculas que reconocen la proteína lisina. Otra realización es una molécula tal como un anticuerpo u otro ligante específico que puede crearse a través del uso de un epítipo tal como por inmunización regular o por una estrategia de exposición en fase en la que un epítipo puede usarse para cribar una biblioteca para determinar ligantes potenciales. Dichas moléculas reconocen uno o más epítopos de la proteína lisina o un ácido nucleico que codifica la proteína lisina. Un anticuerpo que reconoce un epítipo puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, o una parte de una proteína de anticuerpo. De forma deseable, la molécula que reconoce un epítipo tiene una unión específica para ese epítipo que es al menos 10 veces tan fuerte como la que la molécula tiene para la albúmina sérica. La unión específica puede medirse como afinidad (Km). De forma más deseable, la unión específica es al menos 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, o incluso mayor que la de para la albúmina sérica en las mismas condiciones.

En una realización deseable, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está en una forma útil para detectar la presencia de la proteína lisina o, alternativamente, para detectar la presencia de una bacteria susceptible a la proteína lisina. En una realización adicional, el anticuerpo puede estar unido a o asociado de otra forma con el polipéptido de lisina de la invención, por ejemplo, en una proteína quimérica o de fusión, y puede servir para dirigir a la lisina a una célula o cepa bacteriana de interés o diana. Alternativamente, el polipéptido de lisina puede servir para dirigir al anticuerpo o actuar en conjunción con el anticuerpo, por ejemplo, en la lisis de la pared celular bacteriana completamente o parcialmente, de manera que el anticuerpo puede unirse específicamente a su epítipo en la superficie o bajo la superficie sobre o en la bacteria. Por ejemplo, una lisina de la invención puede estar unida a un anticuerpo anti-estreptococal y dirigir al anticuerpo a su epítipo.

Se conoce una variedad de formas y métodos para la síntesis de anticuerpos como apreciará un experto en la técnica. El anticuerpo puede estar conjugado (formando un complejo covalente) con una molécula o átomo informador tal como un fluor, una enzima que crea una señal óptica, un quimilumíforo, una micropartícula, o un átomo radiactivo. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede sintetizarse in vivo, después de la inmunización de un animal, por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede sintetizarse a través de cultivo celular después de recombinación genética. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede prepararse por una combinación de síntesis celular y modificación química.

Un "anticuerpo" es cualquier inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos y fragmentos de estos, que se une a un epítipo específico. El término engloba anticuerpos policlonales, monoclonales, y quiméricos, describiéndose el último mencionado con más detalle en las Patentes U.S. Nos. 4,816,397 y 4,816,567. El término "anticuerpo" describe una inmunoglobulina ya sea natural o producida parcialmente o completamente sintéticamente. El término también abarca cualquier polipéptido o proteína que tenga un dominio de unión que es, o es homólogo de, un dominio de unión de anticuerpo. Los anticuerpos injertados con CDR también están contemplados por este término. Un "anticuerpo" es cualquier inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos y fragmentos de estos, que se une a un epítipo específico. El término engloba anticuerpos policlonales, monoclonales, y quiméricos, describiéndose el último mencionado con más detalle en las Patentes U.S. Nos. 4,816,397 y 4,816,567. El término "anticuerpo(s)" incluye una molécula de inmunoglobulina (Ig) de tipo salvaje, que comprende generalmente cuatro cadenas polipeptídicas de longitud completa, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o una Ig equivalente homóloga de esta (p. ej., un nanocuerpo de camélido, que comprende solo una cadena pesada); incluyendo mutantes, variantes o derivados de estos funcionales de longitud completa, que retienen las características de unión a epítipo esenciales de una molécula de Ig, e incluyendo anticuerpos específicos duales, biespecíficos, multiespecíficos, y con dominios variables duales; Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier clase (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, e IgY), o subclase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2). También están incluidos en el significado del término "anticuerpo" cualquier "fragmento de anticuerpo".

Un "fragmento de anticuerpo" significa una molécula que comprende al menos una cadena polipeptídica que no tiene la longitud completa, incluyendo (i) un fragmento Fab, que es un fragmento monovalente que consiste en los dominios ligero variable (VL), pesado variable (VH), ligero constante (CL) y pesado constante 1 (CH1); (ii) un

fragmento F(ab')₂, que es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) una parte de cadena pesada de un fragmento Fab (Fd), que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento variable (Fv), que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento de anticuerpo de dominio (dAb), que comprende un único dominio variable (Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546 (1989)); (vi) un anticuerpo de camélido; (vii) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada; (viii) un Fragmento Fv de Cadena Única en el que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un conector peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird et al, Science, 242, 423-426, 1988; Huston et al, PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988); (ix) un diacuerpo, que es un anticuerpo bivalente, biespecífico, en el que los dominios VH y VL están expresados en una única cadena polipeptídica, pero usando un conector que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de esta manera a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (WO94/13804; P. Holliger et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, (1993)); y (x) un anticuerpo lineal, que comprende una pareja de segmentos Fv en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera con complementariedad, forman una pareja de regiones de unión a antígeno; (xi) fragmentos de anticuerpo multivalentes (dímeros, trímeros y/o tetrameros de scFv (Power y Hudson, J Immunol. Methods 242: 193-204 9 (2000)); y (xii) otras partes no de longitud completa de cadenas pesadas y/o ligeras, o mutantes, variantes, o derivados de estos, solos o en cualquier combinación.

Como los anticuerpos se pueden modificar de varias maneras, el término "anticuerpo" debe considerarse que abarca cualquier miembro o sustancia de unión específica que tenga un dominio de unión con la especificidad requerida. Así, este término abarca fragmentos de anticuerpo, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión de inmunoglobulina, ya sea natural o completamente o parcialmente sintético. Por lo tanto, están incluidas las moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión de inmunoglobulina, o equivalente, fusionado con otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en EP-A-0120694 y EP-A-0125023 y en las Patentes U.S. Nos. 4.816.397 y 4.816.567.

Un "sitio de combinación de anticuerpo" es la parte estructural de una molécula de anticuerpo comprendida por regiones variables e hipervariables de cadena ligera o cadena pesada y ligera que se unen específicamente a un antígeno.

La expresión "molécula de anticuerpo" en sus varias formas gramaticales tal y como se usa en la presente memoria, contempla tanto una molécula de inmunoglobulina intacta como una parte inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina. Las moléculas de anticuerpo ejemplares son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y aquellas partes de una molécula de inmunoglobulina que contienen el paratopo, incluyendo aquellas partes que se conocen en la técnica como Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v), partes que se prefieren para usarse en los métodos terapéuticos descritos en la presente memoria.

La expresión "anticuerpo monoclonal" en sus varias formas gramaticales se refiere a un anticuerpo que solo tiene una especie de sitio de combinación de anticuerpo capaz de inmunorreactar con un antígeno particular. Un anticuerpo monoclonal presenta así típicamente una única afinidad de unión para cualquier antígeno con el que inmunorreacta. Un anticuerpo monoclonal puede contener, por lo tanto, una molécula de anticuerpo que tiene una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpo, cada uno inmuno-específico para un antígeno diferente; p. ej., un anticuerpo monoclonal biespecífico (quimérico).

El término "específico" puede usarse para hacer referencia a la situación en la que un miembro de una pareja de unión específica no mostrará una unión significativa a moléculas distintas de su(s) compañero(s) de unión específico(s). El término también es aplicable cuando, p. ej., un dominio de unión a antígeno es específico para un epítipo particular que está presente en varios antígenos, en cuyo caso el miembro de unión específica que porta el dominio de unión a antígeno será capaz de unirse a los distintos antígenos que presentan el epítipo.

El término "comprenden" se usa generalmente en el sentido de incluyen, es decir, que permite la presencia de una o más características o componentes.

El término "que consiste esencialmente en" se refiere a un producto, particularmente a una secuencia peptídica, con un número definido de residuos que no está unido covalentemente a un producto mayor. En el caso del péptido de la invención de este documento, los expertos en la técnica apreciarán que pueden contemplarse, sin embargo, modificaciones menores en el extremo N o C del péptido, tal como la modificación química del extremo para añadir un grupo protector o semejantes, p. ej., la amidación del extremo C.

El término "aislado" se refiere al estado en el que estarán el o los polipéptidos de lisina de la invención, o ácido nucleico que codifica dichos polipéptidos, según la presente invención. Los polipéptidos y ácido nucleico carecerán o carecerán sustancialmente de material con el que están asociados naturalmente tal como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural, o el entorno en el que se preparan (p. ej., cultivo celular) cuando dicha preparación es por tecnología de ADN recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*. Los polipéptidos y ácido nucleico pueden formularse con diluyentes o adyuvantes y todavía para propósitos prácticos estar aislados - por ejemplo, los polipéptidos estarán normalmente mezclados con polímeros o mucoadhesivos u otros vehículos, o

estarán mezclados con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, cuando se usan en diagnóstico o terapia.

Ácidos nucleicos

5 En la presente memoria se proporcionan ácidos nucleicos capaces de codificar el o los polipéptidos de lisina de *S. suis* de la invención. Las secuencias de ácido nucleico representativas en este contexto son secuencias de polinucleótidos que codifican el polipéptido de cualquiera de las Figuras 3 y 4, los polipéptidos de las SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3, y secuencias que hibridan, en condiciones astringentes, con las secuencias complementarias del ADN de la(s) secuencia(s) de la Figura 3 o 4. Las variantes adicionales de estas secuencias y secuencias de ácidos nucleicos que hibridan con las mostradas en las figuras también se contemplan para uso en la producción de enzimas lisantes según la descripción, incluyendo variantes naturales que pueden obtenerse. Una gran variedad de secuencias de ácido nucleico aisladas o secuencias de ADNc que codifican enzimas lisantes asociadas con fagos y secuencias parciales que hibridan con dichas secuencias génicas son útiles para la producción recombinante de la(s) enzima(s) o polipéptido(s) de lisina de la invención.

10 Un "replicón" es cualquier elemento genético (p. ej., plásmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad autónoma de replicación de ADN *in vivo*; es decir, que es capaz de replicación bajo su propio control.

Un "vector" es un replicón, tal como un plásmido, fago o cósmido, al que puede unirse otro segmento de ADN de manera que se produce la replicación del segmento unido.

20 Una "molécula de ADN" se refiere a la forma polimérica de desoxirribonucleótidos (adenina, guanina, timina, o citosina) bien en su forma monocatenaria, o una hélice bicatenaria. Este término solo se refiere a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no la limita a ninguna forma terciaria particular. Así, este término incluye el ADN bicatenario encontrado, *inter alia*, en moléculas de ADN lineales (p. ej., fragmentos de restricción), virus, plásmidos, y cromosomas. En la discusión de la estructura de moléculas de ADN bicatenario particulares, las secuencias pueden describirse en la presente memoria según la convención normal de proporcionar solo la secuencia en la dirección 5' a 3' a lo largo de la cadena no transcrita de ADN (es decir, la cadena que tiene una secuencia homóloga a la del ARNm).

25 Un "origen de replicación" se refiere a aquellas secuencias de ADN que participan en la síntesis de ADN.

Una "secuencia codificadora" de ADN es una secuencia de ADN bicatenario que se transcribe y traduce en un polipéptido *in vivo* cuando se pone bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificadora están determinados por un codón de parada en el extremo 5' (amino) y un codón de parada de la traducción en el extremo 3' (carboxilo). Una secuencia codificadora puede incluir, pero no está limitada a, secuencias procariontas, ADNc de ARNm eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN eucariota (p. ej., de mamíferos), y también secuencias de ADN sintético. Una señal de poliadenilación y secuencia de terminación de la transcripción estarán localizadas habitualmente en 3' respecto a la secuencia codificadora.

30 Las secuencias de control de la transcripción y de la traducción son secuencias reguladoras de ADN, tales como promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, terminadores, y semejantes, que proporcionan la expresión de una secuencia codificadora en una célula huésped.

40 Una "secuencia promotora" es una región reguladora de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificadora aguas abajo (dirección 3'). Para los propósitos de definir la presente invención, la secuencia promotora está limitada en su extremo 3' por el sitio de inicio de la transcripción y se extiende aguas arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. En la secuencia promotora se encontrará un sitio de inicio de la transcripción (definido convenientemente por el mapeo con la nucleasa S1), así como dominios de unión a proteína (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa. Los promotores eucariotas contendrán frecuentemente, pero no siempre, cajas "TATA" y cajas "CAT". Los promotores procariontas contienen secuencias de Shine-Dalgarno además de las secuencias consenso -10 y -35.

Una "secuencia de control de la expresión" es una secuencia de ADN que controla y regula la transcripción y la traducción de otra secuencia de ADN. Una secuencia codificadora está "bajo el control" de secuencias de control de la transcripción y la traducción en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia codificadora en ARNm, que se traduce entonces en la proteína codificada por la secuencia codificadora.

50 Una "secuencia señal" puede incluirse antes de la secuencia codificadora. Esta secuencia codifica un péptido señal, N-terminal respecto al polipéptido, que comunica a la célula huésped dirigir el polipéptido a la superficie celular o secretar el polipéptido en el medio, y este péptido señal es escindido por la célula huésped antes de que la proteína deje la célula. Las secuencias señal pueden encontrarse asociadas con una variedad de proteínas nativas para los procariontas y eucariotas.

55 El término "oligonucleótido", tal y como se usa en la presente memoria en referencia a la sonda de la presente invención, se define como una molécula comprendida por dos o más ribonucleótidos, preferiblemente más de tres.

Su tamaño exacto dependerá de muchos factores que, a su vez, dependen de la función y uso final del oligonucleótido.

El término "cebador", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un oligonucleótido, ya aparezca naturalmente como en un digerido de restricción purificado o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como un punto de inicio de la síntesis cuando se pone en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de la extensión con el cebador, que es complementario a la cadena de ácido nucleico, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como una ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados. El cebador puede ser bien monocatenario o bicatenario y debe ser lo suficientemente largo como para cebar la síntesis del producto de extensión deseado en presencia del agente inductor. La longitud exacta del cebador dependerá de muchos factores, incluyendo temperatura, fuente del cebador y uso del método. Por ejemplo, para aplicaciones de diagnóstico, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, el cebador oligonucleotídico contiene típicamente 15-25 o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos.

Los cebadores de la presente memoria se seleccionan para ser "sustancialmente" complementarios a diferentes cadenas de una secuencia de ADN diana particular. Esto significa que los cebadores deben ser lo suficientemente complementarios como para hibridar con sus cadenas respectivas. Por lo tanto, no es necesario que la secuencia cebadora refleje la secuencia exacta del molde. Por ejemplo, un fragmento de nucleótido no complementario puede unirse al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia cebadora complementario a la cadena. Alternativamente, pueden intercarse bases no complementarias o secuencias más largas en el cebador, siempre que la secuencia cebadora tenga la complementariedad suficiente con la secuencia de la cadena para hibridar con ella y formar de esta manera el molde para la síntesis del producto de la extensión.

Tal y como se usa en la presente memoria, los términos "endonucleasas de restricción" y "enzimas de restricción" se refieren a enzimas bacterianas, cada una de las cuales cortan el ADN bicatenario en o cerca de una secuencia de nucleótidos específica.

Una célula se ha "transformado" con ADN exógeno o heterólogo cuando dicho ADN se ha introducido en el interior de la célula. El ADN transformante puede integrarse o no (unirse covalentemente) en el ADN cromosómico que constituye el genoma de la célula. En los procariontes, levaduras, y células de mamíferos, por ejemplo, el ADN transformante puede mantenerse en un elemento episomal tal como un plásmido. Respecto a las células eucariotas, una célula transformada de forma estable es una en la que el ADN transformante se ha integrado en un cromosoma de manera que se hereda por las células hijas a través de la replicación del cromosoma. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariota de establecer líneas celulares o clones comprendidos por una población de células hijas que contienen el ADN transformante. Un "clon" es una población de células derivada de una única célula o un ancestro común por mitosis. Una "línea celular" es un clon de una célula primaria que es capaz de crecer de forma estable *in vitro* durante muchas generaciones.

Dos secuencias de ADN son "sustancialmente homólogas" cuando al menos aproximadamente el 75% (preferiblemente, al menos aproximadamente el 80%, y lo más preferiblemente, al menos aproximadamente el 90 o 95%) de los nucleótidos concuerdan sobre la longitud definida de las secuencias de ADN. Las secuencias que son sustancialmente homólogas pueden identificarse comparando las secuencias usando software estándar disponible en bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación Southern, por ejemplo, bajo condiciones astringentes como se define para ese sistema particular. La definición de las condiciones de hibridación apropiadas está dentro de la experiencia en la técnica. Véase, p. ej., Maniatis et al., *supra*; DNA Cloning, Vols. I y II, *supra*; Nucleic Acid Hybridization, *supra*.

Muchas de las moléculas de ADN variantes contempladas en la presente memoria incluyen las creadas por técnicas estándar de mutagénesis de ADN, tales como mutagénesis con cebador M13. Los detalles de estas técnicas se proporcionan en Sambrook et al. (1989) En Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. Mediante el uso de dichas técnicas, pueden crearse variantes que se diferencian en pocas cosas de las descritas. Las moléculas de ADN y secuencias de nucleótidos que son derivados de aquellas descritas específicamente en la presente memoria y que se diferencian de las descritas por la delección, adición o sustitución de nucleótidos mientras todavía codifican una proteína que posee la característica funcional del o de los polipéptidos de lisina están contempladas por la descripción. También están incluidas moléculas de ADN pequeñas que derivan de las moléculas de ADN descritas. Dichas moléculas de ADN pequeñas incluyen oligonucleótidos adecuados para uso como sondas de hibridación o cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como tales, dichas moléculas de ADN pequeñas comprenderán al menos un segmento de una enzima lítica codificada genéticamente por un bacteriófago de *Staphylococcus suis* y, para los propósitos de la PCR, comprenderán al menos una secuencia de 10-15 nucleótidos y, más preferiblemente, una secuencia de 15-30 nucleótidos del gen. Las moléculas de ADN y secuencias de nucleótidos que derivan de las moléculas de ADN descritas como se ha descrito anteriormente también pueden definirse como secuencias de ADN que hibridan bajo condiciones astringentes con las secuencias de ADN descritas, o fragmentos de estas.

Las condiciones de hibridación correspondientes a grados particulares de astringencia varían dependiendo de la naturaleza del método de la hibridación elegido y de la composición y longitud del ADN para hibridar usado. Generalmente, la temperatura de la hibridación y la fuerza iónica (especialmente, la concentración del ion sodio) del

tampón de la hibridación determinarán la astringencia de la hibridación. Los cálculos respecto a las condiciones de la hibridación requeridas para conseguir grados particulares de astringencia se discuten en Sambrook et al. (1989), En Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y., capítulos 9 y 11.

5 Un ejemplo de dicho cálculo es como sigue. Puede realizarse un experimento de hibridación por la hibridación de una molécula de ADN (por ejemplo, una variación natural de la enzima lítica codificada genéticamente por un bacteriófago específico de Bacillus anthracis) con una molécula de ADN diana. Un ADN diana puede ser, por ejemplo, el ADNc correspondiente que se ha sometido a electroforesis en un gel de agarosa y se ha transferido a una membrana de nitrocelulosa por transferencia Southern (Southern (1975). J. Mol. Biol. 98:503), una técnica muy conocida en la técnica y descrita en Sambrook et al. (1989) En Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. La hibridación con una sonda diana marcada con dCTP marcado con P^{32} isotópico se lleva a cabo en una disolución de alta fuerza iónica tal como SSC 6 veces a una temperatura que es 20-25 grados Celsius por debajo de la temperatura de fusión, T_m (descrita infra). Para dichos experimentos de hibridación Southern en los que la molécula de ADN diana en la transferencia Southern contiene 10 ng de ADN o más, la hibridación se lleva a cabo durante 6-8 horas usando 1-2 ng/ml de sonda radiomarcada (con una actividad específica igual a 109 CPM/mug o mayor). Después de la hibridación, el filtro de nitrocelulosa se lava para retirar la hibridación de fondo. Las condiciones del lavado son tan astringentes como sea posible para retirar la hibridación de fondo mientras se retiene una señal de hibridación específica. El término " T_m " representa la temperatura por encima de la cual, bajo las condiciones iónicas predominantes, la molécula de sonda radiomarcada no hibridará con su molécula de ADN diana. La T_m de dicha molécula híbrida puede estimarse a partir de la siguiente ecuación: $T_m = 81,5^\circ C - 16,6(\log_{10} \text{ de concentración del ion sodio}) + 0,41(\%G+C) - 0,63(\% \text{ de formamida}) - (600/l)$ en la que l =la longitud del híbrido en pares de bases. Esta ecuación es válida para concentraciones de ion sodio en el intervalo de 0,01M a 0,4M, y es menos exacta para cálculos de T_m en disoluciones con una mayor concentración del ion sodio (Bolton y McCarthy (1962). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:1390). La ecuación también es válida para ADN que tiene contenidos de G+C en el 30% al 75%, y también se aplica a híbridos con una longitud mayor de 100 nucleótidos. El comportamiento de las sondas oligonucleotídicas se describe con detalle en el Cap. 11 de Sambrook et al. (1989), En Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.. Las condiciones ejemplificadas preferidas descritas aquí se contemplan particularmente para el uso en la selección de variaciones del gen lítico.

En realizaciones preferidas de la presente descripción, las condiciones astringentes pueden definirse como aquellas bajo las cuales las moléculas de ADN con una variación en la secuencia de más del 25% (también denominado "ausencia de concordancia") no hibridarán. En una realización más preferida, las condiciones astringentes son aquellas bajo las cuales las moléculas de ADN con una ausencia de concordancia de más del 15% no hibridarán, y más preferiblemente aún, las condiciones astringentes son aquellas bajo las cuales las secuencias de ADN con una ausencia de concordancia de más del 10% no hibridarán. Preferiblemente, las condiciones astringentes son aquellas bajo las cuales las secuencias de ADN con una ausencia de concordancia de más del 6% no hibridarán.

35 La degeneración del código genético amplía más el alcance de las realizaciones ya que permite variaciones principales en la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN mientras se mantiene la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. Por ejemplo, un residuo de aminoácido representativo es alanina. Este puede estar codificado en el ADNc por el triplete de codones de nucleótidos GCT. Debido a la degeneración del código genético, tres otros tripletes de codones de nucleótidos--GCT, GCC y GCA--también codifican alanina. Así, la secuencia de nucleótidos del gen puede cambiarse en esa posición a cualquiera de los tres codones sin afectar la composición de aminoácidos de la proteína codificada o las características de la proteína. El código genético y las variaciones en los codones de nucleótidos para aminoácidos particulares son muy conocidos para el experto en la técnica. Sobre la base de la degeneración del código genético, pueden derivarse moléculas de ADN variantes a partir de las moléculas de ADNc descritas en la presente memoria usando técnicas estándar de mutagénesis del ADN como se ha descrito anteriormente, o por síntesis de secuencias de ADN. Las secuencias de ADN que no hibridan bajo condiciones astringentes con las secuencias de ADNc descritas por virtud de la variación de la secuencia basada en la degeneración del código genético están comprendidas en la presente memoria por esta descripción.

50 Así, debe apreciarse que también están en el alcance de la presente invención las secuencias de ADN que codifican una lisina de la presente invención, incluyendo PlySs2 y PlySs1, cuyas secuencias codifican un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos como se proporciona en la Figura 3 o 4 o en la SEQ ID NO:1, 2 o 3, pero que son degeneradas respecto a estas o están degeneradas respecto a las secuencias de ácidos nucleicos ejemplares proporcionadas en la Figura 3 o 4. Por "degenerada respecto a" se quiere decir que se usa un codón de tres letras diferente para especificar un aminoácido particular. En la técnica es muy conocido que los siguientes codones pueden usarse indistintamente para codificar cada aminoácido específico:

Fenilalanina (Phe o F)	UUU o UUC
Leucina (Leu o L)	UUA o UUG o CUU o CUC o CUA o CUG

ES 2 682 670 T3

Isoleucina (Ile o I)	AUU o AUC o AUA
Metionina (Met o M)	AUG
Valina (Val o V)	GUU o GUC o GUA o GUG
Serina (Ser o S)	UCU o UCC o UCA o UCG o AGU o AGC
Prolina (Pro o P)	CCU o CCC o CCA o CCG
Treonina (Thr o T)	ACU o ACC o ACA o ACG
Alanina (Ala o A)	GCU o GCG o GCA o GCG
Tirosina (Tyr o Y)	UAU o UAC
Histidina (His o H)	CAU o CAC
Glutamina (Gln o Q)	CAA o CAG
Asparagina (Asn o N)	AAU o AAC
Lisina (Lys o K)	AAA o AAG
Ácido Aspártico (Asp o D)	GAU o GAC
Ácido Glutámico (Glu o E)	GAA o GAG
Cisteína (Cys o C)	UGU o UGC
Arginina (Arg o R)	CGU o CGC o CGA o CGG o AGA o AGG
Glicina (Gly o G)	GGU o GGC o GGA o GGG
Triptófano (Trp o W)	UGG
Codón de terminación	UAA (ocre) o UAG (ámbar) o UGA (ópalo)

Debe entenderse que los codones especificados anteriormente son para secuencias de ARN. Los codones correspondientes para ADN tienen una T sustituyendo U.

5 Un experto en la técnica reconocerá que las técnicas de mutagénesis del ADN descritas aquí y conocidas en la técnica pueden producir una amplia variedad de moléculas de ADN que codifican una lisina de bacteriófago de *Streptococcus suis* que todavía mantiene las características esenciales de los polipéptidos líticos descritos y proporcionados en la presente memoria. También pueden seleccionarse proteínas recién derivadas con el fin de obtener variaciones en la característica del o de los polipéptidos líticos, como se describirá más completamente más adelante. Dichos derivados incluyen aquellos con variaciones en la secuencia de aminoácidos incluyendo 10 delecciones, adiciones y sustituciones menores.

Aunque el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos puede predeterminarse, no es necesario que la mutación per se esté predeterminada. Por ejemplo, con el fin de optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, puede llevarse a cabo mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las variantes de la proteína expresada pueden cribarse para determinar la combinación óptima de la actividad deseada. Son muy 15 conocidas las técnicas para hacer mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en el ADN que tienen una secuencia conocida como se ha descrito anteriormente.

Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de residuos únicos, o pueden ser de uno o más, uno o unos

pocos, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete residuos; las inserciones serán habitualmente del orden de aproximadamente 1 a 10 residuos de aminoácidos; y las deleciones variarán de aproximadamente 1 a 30 residuos. Las deleciones e inserciones pueden ser en forma única, pero preferiblemente se hacen en parejas adyacentes, es decir, una deleción de 2 residuos o inserción de 2 residuos. Las sustituciones, deleciones, inserciones o cualquier combinación de estas pueden combinarse para obtener una construcción final. Obviamente, las mutaciones que se hacen en el ADN que codifica la proteína no deben poner la secuencia fuera de marco de lectura y preferiblemente no crearán regiones complementarias que podrían producir una estructura secundaria de ARNm (EP 75.444A).

Las variantes de sustitución son aquellas en las que al menos un residuo en la secuencia de aminoácidos se ha eliminado y un residuo diferente se ha insertado en su lugar. Dichas sustituciones pueden hacerse de manera que no se genere un efecto significativo en las características de la proteína o cuando se desea modular finamente las características de la proteína. Los aminoácidos que pueden sustituirse por un aminoácido original en una proteína y que se consideran como sustituciones conservativas se han descrito anteriormente y serán reconocidos por un experto en la técnica.

Pueden hacerse cambios sustanciales en la función o identidad inmunológica mediante la selección de sustituciones que son menos conservativas, por ejemplo, mediante la selección de residuos que se diferencian más significativamente en su efecto en el mantenimiento de: (a) la estructura del núcleo polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o helicoidal; (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana; o (c) el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que en general se espera que produzcan los mayores cambios en las propiedades de la proteína serán aquellas en las que: (a) un residuo hidrofílico, p. ej., seril o treonil, se sustituye por (o con) un residuo hidrofóbico, p. ej., leucil, isoleucil, fenilalanil, valil o alanil; (b) una cisteína o prolina se sustituye por (o con) cualquier otro residuo; (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, p. ej., lisil, arginil, o histadil, se sustituye por (o con) un residuo electronegativo, p. ej., glutamil o aspartil; o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, p. ej., fenilalanina, se sustituye por (o con) uno que no tiene una cadena lateral, p. ej., glicina.

Los efectos de estas sustituciones o deleciones o adiciones de aminoácidos pueden evaluarse para derivados o variantes del o de los polipéptidos léticos mediante el análisis de la capacidad de las proteínas derivadas o variantes de lisar o matar a bacterias susceptibles, o de complementar la sensibilidad a los agentes de entrecruzamiento del ADN presentada por fagos en huéspedes bacterianos infectados. Estos ensayos pueden realizarse mediante la transfección de moléculas de ADN que codifican las proteínas derivadas o variantes en las bacterias como se ha descrito anteriormente o mediante la incubación de las bacterias con las proteínas expresadas de huéspedes transfectados con las moléculas de ADN que codifican las proteínas derivadas o variantes.

Aunque el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos puede predeterminarse, no es necesario que la mutación per se esté predeterminada. Por ejemplo, con el fin de optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, puede llevarse a cabo mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las variantes de la proteína expresada pueden cribarse para determinar la combinación óptima de la actividad deseada. Son muy conocidas las técnicas para hacer mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en el ADN que tienen una secuencia conocida como se ha descrito anteriormente.

Otra característica de esta descripción es la expresión de las secuencias de ADN descritas en la presente memoria. Como es muy conocido en la técnica, las secuencias de ADN pueden expresarse uniéndolas de forma operativa a una secuencia de control de la expresión en un vector de expresión apropiado y empleando ese vector de expresión para transformar un huésped unicelular apropiado. Dicha unión operativa de una secuencia de ADN de esta invención a una secuencia de control de la expresión, por supuesto, incluye, si no es ya parte de la secuencia de ADN, el suministro de un codón de inicio, ATG, en el marco de lectura correcto aguas arriba de la secuencia de ADN. Pueden emplearse una amplia variedad de combinaciones de huésped/vector de expresión en la expresión de las secuencias de ADN de esta invención. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas. Los vectores adecuados incluyen derivados de SV40 y plásmidos bacterianos conocidos p. ej., los plásmidos de *E. coli* colE1, pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos tales como RP4; ADNS de fago, p. ej., los numerosos derivados del fago λ , p. ej., NM989, y otros ADN de fago, p. ej., M13 y ADN monocatenario de fagos filamentosos; plásmidos de levadura, tales como el plásmido 2 μ o derivados de este; vectores útiles en células eucariotas, tales como los vectores útiles en células de insectos o mamíferos; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, tales como plásmidos que han sido modificados para emplear ADN de fagos u otras secuencias de control de la expresión; y semejantes.

Puede usarse cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión -- secuencias que controlan la expresión de una secuencia de ADN unida de forma operativa a ellas -- en estos vectores para expresar las secuencias de ADN de esta invención. Dichas secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos o tardíos de SV40, CMV, vaccinia, polioma o adenovirus, el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *TAC*, el sistema *TRC*, el sistema *LTR*, las regiones operadoras y promotoras principales del fago λ , las regiones de control de la proteína de cubierta fd, el promotor para la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida (p. ej., Pho5), los promotores de los factores de apareamiento \square de levaduras, y otras secuencias que se sabe que controlan la expresión de genes de células procariontas o eucariotas o sus virus, y varias combinaciones de estas.

También es útil una amplia variedad de células huésped unicelulares en la expresión de las secuencias de ADN de esta invención. Estos huéspedes pueden incluir huéspedes eucariotas y procariotas muy conocidos, tales como cepas de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, hongos tales como levaduras, y células animales, tales como células CHO, R.I.I, B-W y L-M, células de riñón de Mono Verde Africano (p. ej., COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, y BMT10), células de insectos (p. ej., Sf9), y células humanas y células de plantas en cultivo tisular.

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

Pueden usarse bibliotecas de fragmentos de la secuencia codificadora de un polipéptido para generar una población variegada de polipéptidos para el cribado y posterior selección de variantes. Por ejemplo, una biblioteca de fragmentos de secuencia codificadora puede generarse tratando un fragmento de PCR bicatenario de la secuencia codificadora de interés con una nucleasa en condiciones en las que se produce el mellado solo aproximadamente una vez por molécula, desnaturalizando el ADN bicatenario, renaturalizando el ADN para formar un ADN bicatenario que puede incluir parejas con sentido/antisentido de diferentes productos mellados, eliminación de las partes monocatenarias de los dúplex reformados por tratamiento con la nucleasa S1, y ligando la biblioteca de fragmentos resultante en un vector de expresión. Mediante este método, puede derivarse una biblioteca de expresión que codifica fragmentos N-terminales e internos de varios tamaños de la proteína de interés.

En la técnica se conocen varias técnicas para el cribado de productos génicos de bibliotecas combinatorias preparadas por mutaciones puntuales o truncamiento, y para el cribado de bibliotecas de ADNc para productos génicos que tienen una propiedad seleccionada. Las técnicas más ampliamente usadas, que son factibles para análisis de alto rendimiento, para el cribado de bibliotecas génicas grandes incluyen típicamente la clonación de la biblioteca génica en vectores de expresión replicables, transformación de células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante, y la expresión de los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. La mutagénesis repetitiva de conjunto (REM), una técnica que aumenta la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, puede usarse en combinación con los ensayos de cribado para identificar variantes de una proteína (Arkin y Yourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3):327-331).

30 **Composiciones**

Según la invención se proporcionan composiciones terapéuticas o farmacéuticas que comprenden la(s) enzima(s)/polipéptido(s) lítico(s) de la invención, así como métodos de uso relacionados. En la presente memoria también se describen los métodos de fabricación. Las composiciones terapéuticas o farmacéuticas pueden comprender uno o más polipéptidos líticos, y opcionalmente pueden incluir enzimas líticas naturales, truncadas, quiméricas o con redistribución de dominios, combinadas opcionalmente con otros componentes tales como un transportador, vehículo, polipéptido, polinucleótido, proteína(s) holina, uno o más antibióticos o excipientes adecuados, transportadores o vehículos. La invención proporciona composiciones terapéuticas o composiciones farmacéuticas de las lisinas de la invención, incluyendo PlySs2 y/o PlySs1 (particularmente Δ PlySs1), para uso en matar, aliviar, descolonizar, profilaxis o tratamiento de bacterias gram-positivas, incluyendo infecciones bacterianas o afecciones relacionadas. La invención proporciona composiciones terapéuticas o composiciones farmacéuticas de las lisinas de la invención, incluyendo PlySs2 y/o PlySs1 (particularmente Δ PlySs1), para uso en el tratamiento, reducción o control de la contaminación y/o infecciones por bacterias gram positivas, particularmente incluyendo *Streptococcus suis*, incluyendo de la contaminación o infección de o a través de una superficie externa tal como la piel. Las composiciones se contemplan y proporcionan de esta forma para aplicaciones tópicas o dermatológicas y la administración general al exterior, incluyendo la piel u otra superficie externa. Las composiciones que comprenden la lisina PlySs2 o PlySs1, incluyendo truncamientos o variantes de esta, se proporcionan en la presente memoria para uso en matar, aliviar, descolonizar, profilaxis o tratamiento de bacterias gram-positivas, incluyendo infecciones bacterianas o afecciones relacionadas, particularmente de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* o *Listeria*, incluyendo *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos.

La(s) enzima(s) o polipéptido(s) incluido en las composiciones terapéuticas puede ser uno o más o cualquier combinación de enzima o enzimas líticas asociadas a fagos inalteradas, polipéptidos líticos truncados, polipéptidos líticos variantes, y enzimas líticas quiméricas y/o con redistribución de dominios. Adicionalmente, pueden usarse polipéptidos líticos diferentes codificados genéticamente por diferentes fagos para el tratamiento de las mismas bacterias. Estas enzimas líticas también pueden estar en cualquier combinación de enzimas o polipéptidos líticos "inalterados", polipéptidos líticos truncados, polipéptidos líticos variantes, y enzimas líticas quiméricas y con redistribución de dominios. La(s) enzima(s)/polipéptido(s) lítico(s) en una composición terapéutica o farmacéutica para bacterias gram-positivas, incluyendo *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Listeria*, pueden usarse solos o en combinación con antibióticos o, si se van a tratar otros organismos bacterianos invasivos, en combinación con otras enzimas líticas asociadas a fagos específicas para las otras bacterias diana. La enzima lítica, enzima truncada, enzima variante, enzima quimérica, y/o enzima lítica con redistribución de dominios puede usarse en conjunción con una proteína holina. La cantidad de la proteína holina también puede variarse. Pueden incluirse

opcionalmente varios antibióticos en la composición terapéutica con la(s) enzima(s) o polipéptido(s) y con o sin la presencia de lisostafina. En la composición terapéutica puede incluirse más de una enzima o polipéptido lítico.

La composición farmacéutica también puede incluir una o más enzimas líticas alteradas, incluyendo isozimas, análogos, o variantes de estas, producidas por síntesis química o técnicas de ADN recombinante. En particular, la proteína lítica alterada puede producirse por sustitución, delección, de aminoácidos truncamiento, quimerización, redistribución de dominios, o combinaciones de estos. La composición farmacéutica puede contener una combinación de una o más proteínas líticas naturales y una o más proteínas líticas truncadas, variantes, quiméricas o con redistribución de dominios. La composición farmacéutica también puede contener un péptido o un fragmento peptídico de al menos una proteína lítica derivada de la misma especie bacteriana o una diferente, con una adición opcional de uno o más agentes complementarios, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona lisinas bacterianas que comprenden una variante del polipéptido de lisina PlySs que tiene actividad letal para las bacterias. La invención describe mutantes de truncamiento de la lisina PlySs que solo contienen un dominio catalítico o enzimático y retienen actividad antibacteriana gram positiva. La invención describe, por ejemplo, mutantes de truncamiento ejemplares de la lisina PlySs que solo contienen un dominio seleccionado del dominio de alanina-amidasa predicho y el dominio de glucosaminidasa predicho. En el mutante de truncamiento de PLYSS1, por ejemplo, el dominio de glucosaminidasa C terminal se deleciona, de manera que la lisina truncada comprende y contiene un dominio enzimático N-terminal y un dominio de unión a la pared celular. El truncamiento Δ PlySS1 tiene los 254 aminoácidos N-terminales, mientras la lisina PlySs1 de longitud completa tiene 452 aminoácidos. Así, la invención proporciona mutantes de la lisina de *S suis*, particularmente mutantes de la lisina PlySs1 que son mutantes truncados que solo contienen un dominio catalítico y que retienen la actividad letal frente a *S. suis* y numerosas otras cepas bacterianas incluyendo otros estreptococos, así como estafilococos, Listeria, y otras bacterias, como se proporciona y demuestra en la presente memoria. En la presente memoria se proporciona una composición que comprende una lisina mutante PlySs, incluyendo una lisina mutante PlySS1, que tiene una actividad letal igual o mayor frente a las células de *Streptococcus*, incluyendo *Streptococcus suis* comparado con la proteína lisina PlySs de longitud completa, incluyendo la proteína lisina PlySs1 de longitud completa, la lisina mutante PlySs que tiene una variante de polipéptido de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 con una modificación seleccionada del grupo que consiste en: a) el mutante PlySs es una lisina mutante troncada que solo contiene un dominio catalítico seleccionado del grupo que consiste en un dominio de endopeptidasa y un dominio de glucosaminidasa; b) el mutante PlySs es una lisina mutante truncada sin un dominio enzimático C-terminal; c) el mutante PlySs tiene un único dominio catalítico y un dominio de unión a la pared celular; y d) el mutante PlySs corresponde a SEQ ID NO:2, o variantes de aminoácidos de esta que tienen una o más sustituciones conservativas.

La composición terapéutica también puede comprender una proteína holina. Las proteínas holinas (u "holinas") son proteínas que producen agujeros en la membrana celular. Las proteínas holinas pueden formar lesiones letales en la membrana que finalizan la respiración celular en una bacteria. Como las proteínas líticas, las proteínas holinas están codificadas y transportadas por un fago. De hecho, es bastante común que el código genético de la proteína holina esté cerca o incluso en el código para la proteína lítica del fago. La mayor parte de las secuencias de las proteínas holinas son cortas, y globalmente, de naturaleza hidrofóbica, con un dominio carboxilo-terminal altamente hidrofílico. En muchos casos, la proteína holina potencial está codificada en un marco de lectura diferente en el dominio enzimáticamente activo del fago. En otros casos, la proteína holina está codificada en el ADN próximo o cercano al ADN que codifica la proteína lítica de la pared celular. Las proteínas holinas se sintetizan frecuentemente durante la etapa tardía de la infección del fago y se encuentran en la membrana citoplásmica donde causan las lesiones en la membrana. Las holinas pueden agruparse en dos clases generales sobre la base del análisis de la estructura primaria. Las holinas de la Clase I tienen habitualmente una longitud de 95 residuos o mayor y pueden tener tres dominios transmembrana potenciales. Las holinas de la Clase II son habitualmente menores, con aproximadamente 65-95 residuos, indicando la distribución de los residuos cargados e hidrofóbicos dos dominios TM (Young, et al. Trends in Microbiology v. 8, No. 4, marzo 2000). Al menos para los fagos de los huéspedes gram-positivos, sin embargo, el sistema de lisis de componente dual puede no ser universal. Aunque la presencia de las holinas se ha mostrado o sugerido para varios fagos, todavía no se han encontrado genes que codifiquen holinas potenciales para todos los fagos. Se ha mostrado que las holinas están presentes en varias bacterias, incluyendo, por ejemplo, bacteriófago lactococcal Tuc2009, NLC3 lactococcal, bacteriófago pneumococcal EJ-1, bacteriófago de *Lactobacillus gasserii* Nadh, bacteriófago de *Staphylococcus aureus* Twort, bacteriófagos de *Listeria monocytogenes*, fago pneumococcal Cp-1, fago de *Bacillus subtilis* M29, lisina LL-H del bacteriófago de *Lactobacillus delbrueckii*, y bacteriófago N 11 de *Staphylococcus aureus*. (Loessner, et al., Journal of Bacteriology, agosto 1999, p. 4452-4460).

Por ejemplo, las proteínas holinas pueden usarse en conjunción con las enzimas líticas para acelerar la velocidad y eficiencia de la muerte de las bacterias. Las proteínas holinas también pueden estar en la forma de enzimas quiméricas y/o con redistribución de dominios. Las proteínas holinas también pueden usarse solas en el tratamiento de infecciones bacterianas según algunas realizaciones.

La composición farmacéutica puede contener un agente complementario, incluyendo uno o más agentes antimicrobianos y/o uno o más antibióticos convencionales. Con el fin de acelerar el tratamiento de la infección, el agente terapéutico puede incluir además al menos un agente complementario que también puede potenciar la actividad bactericida de la enzima lítica. Los antimicrobianos actúan en gran medida interfiriendo con la estructura o función de una célula bacteriana por la inhibición de la síntesis de la pared celular, inhibición de la función de la

membrana celular y/o inhibición de las funciones metabólicas, incluyendo la síntesis de proteínas y ADN. Los antibióticos pueden subagruparse ampliamente en aquellos que afectan la biosíntesis del peptidoglicano de la pared celular y aquellos que afectan la síntesis del ADN o proteínas en las bacterias gram positivas. Los inhibidores de la síntesis de la pared celular, incluyendo penicilina y antibióticos como esta, disrumen la pared celular exterior rígida de manera que la célula relativamente sin soporte se hincha y eventualmente se rompe. Los antibióticos que afectan la biosíntesis del peptidoglicano de la pared celular incluyen: Glicopéptidos, que inhiben la síntesis del peptidoglicano mediante la prevención de la incorporación de subunidades peptídicas de ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina (NAG) en la matriz del peptidoglicano. Los glicopéptidos disponibles incluyen vancomicina y teicoplanina.; Penicilinas, que actúan inhibiendo la formación de los entrecruzamientos de peptidoglicano. El grupo funcional de las penicilinas, el resto β -lactama, se une a e inhibe la DD-transpeptidasa que une las moléculas de peptidoglicano en las bacterias. Las enzimas hidrolíticas continúan degradando la pared celular, causando la citolisis o muerte debido a la presión osmótica. Las penicilinas comunes incluyen oxacilina, ampicilina y cloxacilina; y Polipéptidos, que interfieren con la defosforilación del pirofosfato de isoprenilo C₅₅, una molécula que transporta bloques de construcción de peptidoglicano fuera de la membrana plasmática. Un polipéptido que impacta en la pared celular es bacitracina.

El agente complementario puede ser un antibiótico, tal como eritromicina, claritromicina, azitromicina, roxitromicina, otros miembros de la familia de macrólidos, penicilinas, cefalosporinas, y cualesquiera combinaciones de estos en cantidades que son efectivas para potenciar de forma sinérgica el efecto terapéutico de la enzima lítica. Prácticamente, puede usarse cualquier otro antibiótico con la enzima lítica alterada y/o inalterada. De forma similar, pueden incluirse otras enzimas líticas en el vehículo para tratar otras infecciones bacterianas. Los suplementos de antibióticos pueden usarse en prácticamente todos los usos de la enzima cuando se tratan diferentes enfermedades. La composición farmacéutica también puede contener un péptido o un fragmento peptídico de al menos una proteína lítica, una proteína holina, o al menos una proteína holina y una lítica, proteínas líticas y holinas que derivan cada una de la misma especie bacteriana o una diferente, con una adición opcional de agentes complementarios, y un vehículo o diluyente adecuado.

También se proporcionan composiciones que contienen moléculas de ácido nucleico que, bien solas o en combinación con otras moléculas de ácido nucleico, son capaces de expresar una cantidad efectiva de un polipéptido(s) lítico(s) o un fragmento peptídico de un polipéptido(s) lítico(s) *in vivo*. También se proporcionan cultivos celulares que contienen esas moléculas de ácido nucleico, polinucleótidos, y vectores que portan y expresan esas moléculas *in vitro* o *in vivo*.

Las composiciones terapéuticas o farmacéuticas pueden comprender polipéptido(s) lítico(s) combinado(s) con una variedad de vehículos para tratar las enfermedades causadas por las bacterias gram-positivas susceptibles. El vehículo contiene adecuadamente cantidades menores de aditivos tales como sustancias que potencian la isotonicidad y estabilidad química. Dichos materiales no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, succinato, ácido acético, y otros ácidos orgánicos o sus sales; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menor de aproximadamente diez residuos), p. ej., poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; glicina; aminoácidos tales como ácido glutámico, ácido aspártico, histidina, o arginina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo celulosa o sus derivados, glucosa, manosa, trehalosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones tales como sodio; tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos, poloxámeros, o polietilen glicol (PEG); y/o sales neutras, p. ej., NaCl, KCl, MgCl.sub.2, CaCl.sub.2, y otras. La glicerina o glicerol (1,2,3-propanotriol) está disponible comercialmente para uso farmacéutico. Puede diluirse en agua estéril para inyección, o inyección de cloruro de sodio, u otro fluido de inyección acuoso farmacéuticamente aceptable, y usarse en concentraciones de 0,1 a 100% (v/v), preferiblemente 1,0 a 50% más preferiblemente aproximadamente 20%. El DMSO es un disolvente aprótico con una actividad notable para potenciar la penetración de muchos fármacos aplicados localmente. El DMSO puede diluirse en agua estéril para inyección, o inyección de cloruro de sodio, u otro fluido de inyección acuoso farmacéuticamente aceptable, y usarse en concentraciones de 0,1 a 100% (v/v). El vehículo transportador también puede incluir disolución de Ringer, una disolución tamponada, y disolución de dextrosa, particularmente cuando se prepara una disolución intravenosa.

Cualquiera de los vehículos para el o los polipéptidos líticos puede fabricarse por medios convencionales. Sin embargo, se prefiere que cualquier lavado bucal o productos de tipo similar no contengan alcohol para prevenir la desnaturalización del polipéptido/enzima. De forma similar, cuando el o los polipéptidos líticos se van a poner en gotas para la tos, chicle, caramelo o comprimido para chupar durante el proceso de fabricación, dicho posicionamiento debe hacerse antes del endurecimiento del comprimido para chupar o caramelo, pero después de que se haya enfriado en cierto modo las gotas para la tos o caramelo, para evitar la desnaturalización por calor de la enzima.

Uno o unos polipéptidos líticos pueden añadirse a estas sustancias en una forma líquida o en un estado liofilizado, con lo cual se solubilizará cuando se encuentre con fluidos corporales tales como la saliva. El o los polipéptidos/enzima también pueden estar en una micela o liposoma.

Las proporciones o cantidades de dosificación efectivas de una enzima/polipéptido(s) lítico(s) alterados o inalterados

para tratar la infección dependerán, en parte, de si la enzima/polipéptido(s) lítico(s) se usarán terapéuticamente o profilácticamente, de la duración de la exposición del receptor a las bacterias infecciosas, del tamaño y peso del individuo, etc. La duración para uso de la composición que contiene la enzima/polipéptido(s) también depende de si el uso es para propósitos profilácticos, en el que el uso puede ser una vez a la hora, diario o semanal, durante un corto periodo de tiempo, o de si el uso será para propósitos terapéuticos en el que puede ser necesario un régimen más intensivo del uso de la composición, de manera que el uso puede durar horas, días o semanas, y/o en una base diaria, o a intervalos programados durante el día. Cualquier forma de dosificación empleada debería proporcionar un mínimo número de unidades durante una mínima cantidad de tiempo. La concentración de las unidades activas de enzima que se cree que proporcionan una cantidad o dosificación efectiva de enzima puede estar en el intervalo de aproximadamente 100 unidades/ml a aproximadamente 500.000 unidades/ml de fluido en el entorno mojado o húmedo de las cavidades nasal y oral, y posiblemente en el intervalo de aproximadamente 100 unidades/ml a aproximadamente 50.000 unidades/ml. Más específicamente, el tiempo de exposición a las unidades activas de enzima/polipéptido(s) puede influir en la concentración deseada de unidades activas de enzima por ml. Los vehículos que se clasifican como vehículos de liberación "prolongada" o "lenta" (tales como, por ejemplo, determinados pulverizadores nasales o comprimidos para chupar) podrían poseer o proporcionar una concentración menor de unidades activas (enzima) por ml, pero durante un periodo de tiempo más largo, mientras un vehículo de liberación "corta" o "rápida" (tal como, por ejemplo, un enjuague bucal) podría poseer o proporcionar una concentración alta de unidades activas (enzima) por ml, pero durante un periodo de tiempo más corto. La cantidad de unidades activas por ml y la duración del tiempo de exposición dependen de la naturaleza de la infección, de si el tratamiento va a ser profiláctico o terapéutico, y de otras variables. Hay situaciones en las que puede ser necesario tener una dosificación en unidad/ml mucho más alta o una dosificación en unidad/ml más baja.

La enzima/polipéptido(s) lítico(s) deben estar en un entorno que tenga un pH que permita la actividad de la enzima/polipéptido(s) lítico(s). Por ejemplo, si un individuo humano se ha expuesto a otro ser humano con un trastorno bacteriano del tracto respiratorio superior, la enzima/polipéptido(s) lítico(s) residirán en el revestimiento mucosal y prevendrán cualquier colonización de las bacterias infecciosas. Antes de, o en el momento en el que la enzima lítica alterada se pone en el sistema vehicular o modo de administración oral, se prefiere que la enzima esté en un entorno de un tampón estabilizante para mantener un intervalo de pH entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 9,0, más preferiblemente entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,5.

Un tampón estabilizante puede permitir la actividad óptima de la enzima/polipéptido(s) de lisina. El tampón puede contener un reactivo reductor, tal como ditiotreitol. El tampón estabilizante también puede ser o incluir un reactivo quelante de metales, tal como la sal de sodio del ácido etilendiaminotetracético, o también puede contener un tampón fosfato o citrato-fosfato, o cualquier otro tampón. El ADN que codifica estos fagos y otros fagos puede alterarse para permitir que una enzima recombinante ataque una pared celular en más de dos localizaciones, para permitir que la enzima recombinante escinda la pared celular de más de una especie de bacteria, para permitir que la enzima recombinante ataque a otras bacterias, o cualesquiera combinaciones de estas. El tipo y número de alteraciones en una enzima producida por un bacteriófago recombinante son incalculables.

Un tensioactivo suave puede incluirse en una composición terapéutica o farmacéutica en una cantidad efectiva para potenciar el efecto terapéutico de la enzima/polipéptido(s) lítico(s) puede usarse en una composición. Los tensioactivos suaves adecuados incluyen, entre otros, ésteres de polioxietileno sorbitán y ácidos grasos (serie Tween), octilfenoxi polietoxi etanol (serie Tritón-X), n-Octil-.beta.-D-glucopiranosido, n-Octil-.beta.-D-tioglucopiranosido, n-Decil-.beta.-D-glucopiranosido, n-Dodecil-.beta.-D-glucopiranosido, y tensioactivos biológicos, p. ej., ácidos grasos, glicéridos, monoglicéridos, desoxicolato y ésteres de desoxicolato.

En esta invención pueden usarse conservantes y preferiblemente comprenden aproximadamente un 0,05% a 0,5% en peso de la composición total. El uso de conservantes asegura que, si el producto se contamina con microbios, la formulación prevendrá o disminuirá el crecimiento de los microorganismos. Algunos conservantes útiles en esta invención incluyen metilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, cloroxilenol, benzoato de sodio, DMDM Hidantoína, carbamato de 3-yodo-2-propilbutilo, sorbato de potasio, digluconato de clorhexidina, o una combinación de estos.

Los productos farmacéuticos para uso en todas las realizaciones de la invención incluyen agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, agentes antivirales, agente anestésicos locales, corticosteroides, agentes de terapia destructiva, antifúngicos, y antiandrógenos. En el tratamiento del acné, los productos farmacéuticos activos que pueden usarse incluyen agentes antimicrobianos, especialmente aquellos que tienen propiedades antiinflamatorias tales como dapsona, eritromicina, minociclina, tetraciclina, clindamicina, y otros antimicrobianos. Los porcentajes en peso preferidos para los antimicrobianos son 0,5% a 10%.

Los anestésicos locales incluyen tetracaína, hidrocloreto de tetracaína, lidocaína, hidrocloreto de lidocaína, diclonina, hidrocloreto de diclonina, hidrocloreto de dimetisoquina, dibucaína, hidrocloreto de dibucaína, butambenpicrato, e hidrocloreto de pramoxina. Una concentración preferida para los anestésicos locales es aproximadamente 0,025% a 5% en peso de la composición total. Los anestésicos tales como benzocaína también pueden usarse a una concentración preferida de aproximadamente 2% a 25% en peso.

Los corticosteroides que pueden usarse incluyen dipropionato de betametasona, fluocinolona actínido, valerato de

betametasona, triamcinolona actínido, propionato de clobetasol, desoximetasona, diacetato de diflorasona, amcinonida, flurandrenolida, valerato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, y desonida se recomiendan a concentraciones de aproximadamente 0,01% a 1,0% en peso. Las concentraciones preferidas para los corticosteroides tales como hidrocortisona o acetato de metilprednisolona son de aproximadamente 0,2% a aproximadamente 5,0% en peso.

Adicionalmente, la composición terapéutica puede comprender además otras enzimas, tales como la enzima lisostafina para el tratamiento de cualquier bacteria *Staphylococcus aureus* presente junto con las bacterias gram-positivas susceptibles. Se ha sugerido que los péptidos mucolíticos, tales como lisostafina, son eficaces en el tratamiento de infecciones por *S. aureus* en los seres humanos (Schaffner et al., Yale J. Biol. & Med., 39:230 (1967)). La lisostafina, un producto génico de *Staphylococcus simulans*, ejerce un efecto bacteriostático y bactericida sobre *S. aureus* mediante la degradación enzimática de los entrecruzamientos de poliglicina de la pared celular (Browder et al., Res. Comm., 19: 393-400 (1965)). La Pat. U.S. No. 3.278.378 describe métodos de fermentación para producir lisostafina a partir del medio de cultivo de *S. staphylolyticus*, posteriormente red denominada *S. simulans*. Otros métodos para producir lisostafina se describen adicionalmente en las Pat. U.S. Nos. 3.398.056 y 3.594.284. El gen de la lisostafina se ha clonado y secuenciado posteriormente (Recsei et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 1127-1131 (1987)). La proteína bactericida mucolítica recombinante, tal como r-lisostafina, puede eludir potencialmente los problemas asociados con la terapia actual de antibióticos debido a su especificidad dirigida, baja toxicidad y posible reducción de residuos biológicamente activos. Además, la lisostafina es también activa frente a las células que no están en división, mientras la mayor parte de los antibióticos requieren células que se dividan activamente para mediar sus efectos (Dixon et al., Yale J. Biology and Medicine, 41: 62-68 (1968)). La lisostafina, en combinación con la enzima lítica alterada, puede usarse en presencia o ausencia de antibióticos. Existe un grado de importancia añadida en el uso tanto de lisostafina como de la enzima lisina en el mismo agente terapéutico. Frecuentemente, cuando un ser humano tiene una infección bacteriana, la infección por un género de bacterias debilita al cuerpo humano o cambia la flora bacteriana del cuerpo, permitiendo que otras bacterias potencialmente patogénicas infecten el cuerpo. Una de las bacterias que algunas veces coinfecta un cuerpo es *Staphylococcus aureus*. Muchas cepas de *Staphylococcus aureus* producen penicilinas, de manera que los antibióticos estándar no serán letales para *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y otras cepas bacterianas Gram positivas. Consecuentemente, el uso de la lisina y lisostafina, posiblemente en combinación con antibióticos, puede servir como el tratamiento más rápido y efectivo de infecciones bacterianas. Una composición terapéutica también puede incluir mutanolisina, y lisozima.

Los medios para la aplicación de la composición terapéutica que comprende una enzima/polipéptido(s) líticos incluyen, pero no están limitados a medios directos, indirectos, vehiculares y especiales o cualquier combinación de medios. La aplicación directa de la enzima/polipéptido(s) líticos puede ser por cualquier medio adecuado para poner en contacto directamente el polipéptido con el sitio de la infección o colonización bacteriana, tal como en el área nasal (por ejemplo, pulverizadores nasales), aplicaciones dérmicas o en la piel (por ejemplo, pomadas o formulaciones tópicas), supositorios, aplicación con tampón, etc. Las aplicaciones nasales incluyen, por ejemplo, pulverizadores nasales, gotas nasales, pomadas nasales, lavados nasales, inyecciones nasales, envases nasales, pulverizadores e inhaladores bronquiales, o indirectamente a través del uso de comprimidos para chupar para la garganta, lavados o gárgaras bucales, o a través del uso de pomadas aplicadas en los orificios nasales, o la cara o cualquier combinación de estos métodos de aplicación y similares. Las formas en las que la enzima lítica puede administrarse incluyen, pero no están limitadas a comprimidos para chupar, tabletas, caramelos, inyectables, chicles, comprimidos, polvos, pulverizaciones, líquidos, pomadas, y aerosoles.

Cuando la(s) enzima(s)/polipéptido(s) lítico(s) natural y/o alterado se introduce directamente por el uso de pulverizadores, gotas, pomadas, lavados, inyecciones, envasados e inhaladores, la enzima está preferiblemente en un entorno líquido o de gel, actuando el líquido como el vehículo. Una versión anhidra seca de la enzima alterada puede administrarse por el inhalador y pulverizador bronquial, aunque se prefiere una forma líquida de administración.

Las composiciones para tratar infecciones o contaminaciones tópicas comprenden una cantidad efectiva de al menos una enzima lítica, incluyendo PlySs1 y/o PlySs2, según la invención y un vehículo para administrar al menos una enzima lítica a la piel, pelo, o superficie externa infectada o contaminada de un animal de compañía o ganado. El modo de aplicación para la enzima lítica incluye varios tipos y combinaciones diferentes de vehículos que incluyen, pero no están limitados a, un líquido acuoso, un líquido con base de alcohol, un gel soluble en agua, una loción, una pomada, una base de líquido no acuoso, una base de aceite mineral, una mezcla de aceite mineral y petróleo, lanolina, liposomas, vehículos proteicos tales como albúmina de suero o gelatina, carmel de celulosa en polvo, y combinaciones de estos. Un modo de administración del vehículo que contiene el agente terapéutico incluye, pero no está limitado a, un frotis, pulverizador, un parche con liberación en el tiempo, una toallita con líquido absorbido, y combinaciones de estos. La enzima lítica puede aplicarse en un vendaje directamente o en uno de los demás vehículos. Los vendajes pueden venderse húmedos o secos, en los que la enzima está en una forma liofilizada en el vendaje. Este método de aplicación es el más efectivo para el tratamiento de la piel infectada. Los vehículos de las composiciones tópicas pueden comprender vehículos semisólidos y semejantes a geles que incluyen un espesante polimérico, agua, conservantes, tensioactivos activos o emulsionantes, antioxidantes, pantallas solares, y un disolvente o sistema de disolventes mixto. La Pat. U.S. No. 5,863,560 (Osborne) discute varias combinaciones diferentes de vehículos que pueden ayudar en la exposición de la piel a un medicamento. Los espesantes poliméricos que pueden usarse incluyen aquellos conocidos para un experto en la técnica, tales como

agentes gelificantes hidrofílicos e hidroalcohólicos usados frecuentemente en las industrias cosmética y farmacéutica. CARBOPOL[®]™ es uno de los numerosos polímeros de ácido acrílico entrecruzado a los que se proporciona el nombre general adoptado de carbómero. Estos polímeros se disuelven en agua y forman un gel transparente o ligeramente turbio después de la neutralización con un material cáustico tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, trietanolamina, u otras bases amina. KLUCEL[®]™ es un polímero de celulosa que se dispersa en agua y forma un gel uniforme después de la hidratación completa. Otros polímeros gelificantes preferidos incluyen hidroxietilcelulosa, goma de celulosa, polímero entrecruzado de decadieno MVE/MA, copolímero PVM/MA, o una combinación de estos.

Una composición que comprende una enzima/polipéptido(s) lítico(s) puede administrarse en la forma de un caramelo, chicle, comprimido para chupar, tableta, comprimido, un polvo, un aerosol, un líquido, un pulverizador líquido, o pasta de dientes para la prevención o tratamiento de infecciones bacterianas asociadas con enfermedades del tracto respiratorio superior. El comprimido para chupar, comprimido, o chicle en el que se añade la enzima/polipéptido(s) lítico(s) puede contener azúcar, jarabe de maíz, una variedad de colorantes, edulcorantes no azucarados, saborizantes, cualesquiera aglutinantes, o combinaciones de estos. De forma similar, cualesquiera productos basados en goma pueden contener goma arábiga, cera de carnauba, ácido cítrico, almidón de maíz, colorantes alimentarios, saborizantes, edulcorantes no azucarados, gelatina, glucosa, glicerina, base de goma, goma laca, sacarina de sodio, azúcar, agua, cera blanca, celulosa, otros aglutinantes, y combinaciones de estos. Los comprimidos para chupar pueden contener además sacarosa, almidón de maíz, goma arábiga, goma de tragacanto, anetol, semilla de lino, oleoresina, aceite mineral, y celulosa, otros aglutinantes, y combinaciones de estos. También pueden usarse sustitutos del azúcar en lugar de dextrosa, sacarosa, u otros azúcares.

Las composiciones que comprenden enzimas líticas, o sus fragmentos peptídicos pueden estar dirigidas al revestimiento mucosal, donde, al ser residentes, son letales para las bacterias patógenas colonizadoras. El revestimiento mucosal, como se divulga y describe en la presente memoria, incluye, por ejemplo, el tracto respiratorio superior e inferior, ojo, cavidad bucal, nariz, recto, vagina, bolsillo periodontal, intestinos y colon. Debido a los mecanismos naturales de eliminación o limpieza de los tejidos mucosales, las formas de dosificación convencionales no se retienen en el sitio de aplicación durante un periodo de tiempo significativo.

Puede ser ventajoso tener materiales que presentan adhesión a tejidos mucosales, que se administren con una o más enzimas de fago y otros agentes complementarios durante un periodo de tiempo. Los materiales que tienen una capacidad de liberación controlada son particularmente deseables, y el uso de mucoadhesivos de liberación sostenida ha recibido un grado significativo de atención. J. R. Robinson (Pat. U.S. No. 4.615.697) proporciona una buena revisión de las distintas composiciones poliméricas de liberación controlada usadas en la administración mucosal de fármacos. La patente describe una composición de tratamiento de liberación controlada que incluye un bioadhesivo y una cantidad efectiva de un agente de tratamiento. El bioadhesivo es un polímero entrecruzado con funcionalidad carboxi fibroso hinchable en agua, pero insoluble en agua, que contiene (a) una pluralidad de unidades de repetición de las cuales al menos aproximadamente el 80 por ciento contienen al menos una funcionalidad carboxi, y (b) aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1,5 por ciento de agente de entrecruzamiento que sustancialmente carece de polialqueniil poliéter. Aunque los polímeros de Robinson son hinchables en agua, pero insolubles, están entrecruzados, no termoplásticos, y no son tan fáciles de formular con agentes activos, y en las distintas formas de dosificación, como los sistemas de copolímeros de la presente solicitud. También pueden usarse micelas y micelas multilamelares para controlar la liberación de la enzima.

Se conocen otras estrategias que implican mucoadhesivos que son la combinación de materiales hidrofílicos e hidrofóbicos. Orahesive.RTM. de E.R. Squibb & Co es un adhesivo que es una combinación de pectina, gelatina, y carboximetil celulosa de sodio en un polímero de hidrocarburo pegajoso, para adherirse a la mucosa oral. Sin embargo, dichas mezclas físicas de componentes hidrofílicos e hidrofóbicos eventualmente se separan. Por el contrario, los dominios hidrofílicos e hidrofóbicos en esta solicitud producen un copolímero insoluble. La Pat. U.S. No. 4.948.580, describe un sistema de administración oral de fármacos bioadhesivo. La composición incluye una mezcla de polímeros liofilizada formada por el copolímero poli(metil vinil éter/anhídrido maleico) y gelatina, dispersado en una base de pomada, tal como aceite mineral que contiene polietileno dispersado. La Pat. U.S. No. 5.413.792 describe preparaciones semejantes a pastas que comprenden (A) una base semejante a pasta que comprende un poliorganosiloxano y un material polimérico soluble en agua que están presentes preferiblemente en una proporción en peso de 3:6 a 6:3, y (B) un ingrediente activo. La Pat. U.S. No. 5.554.380 reivindica un sistema de administración de fármacos oralmente ingerible bioadherente sólido o semisólido que contiene un sistema de agua en aceite que tiene al menos dos fases. Una fase comprende de aproximadamente 25% a aproximadamente 75% en volumen de una fase hidrofílica interna y la otra fase comprende de aproximadamente 23% a aproximadamente 75% en volumen de una fase hidrofóbica externa, en el que la fase hidrofóbica externa está comprendida por tres componentes: (a) un emulsionante, (b) un éster de glicérido, y (c) un material de cera. La Pat. U.S. No. 5.942.243 describe algunos materiales de liberación representativos útiles para administrar agentes antibacterianos.

Las composiciones terapéuticas o farmacéuticas también pueden contener mucoadhesivos poliméricos incluyendo un copolímero injertado que comprende una cadena principal hidrofílica y cadenas injertadas hidrofóbicas para la liberación controlada de agentes biológicamente activos. El copolímero injertado es un producto de la reacción de (1) un macromonómero de poliestireno que tiene un grupo funcional etilénicamente insaturado, y (2) al menos un monómero ácido hidrofílico que tiene un grupo funcional etilénicamente insaturado. Las cadenas injertadas consisten

esencialmente en poliestireno, y la cadena del polímero principal en restos monoméricos hidrofílicos, algunos de los cuales tienen funcionalidad ácida. El porcentaje en peso del macromonomero de poliestireno en el copolímero injertado es entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20% y el porcentaje en peso del monómero hidrofílico total en el copolímero injertado es entre 80 y 99%, y en el que al menos el 10% de dicho monómero hidrofílico total es ácido, teniendo dicho copolímero injertado cuando se hidrata completamente un contenido de agua en equilibrio de al menos el 90%. Las composiciones que contienen los copolímeros se hidratan gradualmente por sorción de fluidos tisulares en el sitio de la aplicación para rendir una masa semejante a jalea muy blanda que presenta adhesión a la superficie mucosal. Durante el periodo de tiempo en el que la composición se adhiere a la superficie mucosal, proporciona una liberación sostenida del agente farmacológicamente activo, que es absorbido por el tejido mucosal.

Las composiciones de esta solicitud pueden contener opcionalmente otros materiales poliméricos, tales como poli(ácido acrílico), poli-(vinil pirrolidona), y plastificantes carboximetil celulosa de sodio, y otros excipientes farmacéuticamente aceptables en cantidades que no causan un efecto perjudicial en la mucoadhesividad de la composición.

Las formas de dosificación de las composiciones de esta invención pueden prepararse por métodos convencionales. En los casos en los que el modo de administración elegido es inyección intramuscular, se usa preferiblemente una formulación isotónica. Generalmente, los aditivos para la isotonicidad pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En algunos casos, se prefieren las disoluciones isotónicas tales como disolución salina tamponada con fosfato. Los estabilizantes incluyen gelatina y albúmina. Puede añadirse a la formulación un agente de vasoconstricción. Las preparaciones farmacéuticas según esta solicitud se proporcionan estériles y libres de pirógenos.

Una enzima/polipéptido(s) lítico(s) de la invención también puede administrarse por cualquier medio farmacéuticamente aplicable o aceptable incluyendo por vía tópica, oral o parenteral. Por ejemplo, la enzima/polipéptido(s) lítico(s) puede administrarse por vía intramuscular, intratecal, subdérmica, subcutánea, o intravenosa para tratar infecciones por bacterias gram-positivas. En los casos en los que el modo de administración elegido es inyección parenteral, se usa preferiblemente una formulación isotónica. Generalmente, los aditivos para la isotonicidad pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En algunos casos, se prefieren las disoluciones isotónicas tales como disolución salina tamponada con fosfato. Los estabilizantes incluyen gelatina y albúmina. Puede añadirse a la formulación un agente de vasoconstricción. Las preparaciones farmacéuticas según esta solicitud se proporcionan estériles y libres de pirógenos.

Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente bien en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, habitualmente ratones, conejos, perros, o cerdos. El modelo animal también se usa para conseguir un intervalo de concentración deseable y una ruta de administración. Dicha información puede usarse entonces para determinar dosis y rutas de administración útiles para la administración a seres humanos. La dosificación exacta la elige el médico individual a la vista del paciente que se va a tratar. La dosificación y administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del resto activo o para mantener el efecto deseado. Los factores adicionales que pueden tenerse en cuenta incluyen la gravedad del estado de la enfermedad, edad, peso y sexo del paciente; dieta, duración deseada del tratamiento, método de administración, tiempo y frecuencia de la administración, combinación o combinaciones de fármacos, reacción de sensibilidad, y tolerancia/respuesta a la terapia. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada podrían administrarse cada 3 a 4 días, cada semana, o una vez cada dos semanas dependiendo de la semivida y tasa de aclaramiento de la formulación particular.

Las tasas y cantidades de dosificación efectiva de la enzima/polipéptido(s) lítico(s) que se va a administrar por vía parenteral, y la duración del tratamiento dependerán, en parte, de la gravedad de la infección, del peso del paciente, particularmente ser humano, de la duración de la exposición del receptor a la bacteria infecciosa, del número de centímetros cuadrados de la piel o tejido que están infectados, de la profundidad de la infección, de la gravedad de la infección, y de una variedad de varias otras variables. La composición puede aplicarse en cualquier lugar de una a varias veces al día, y puede aplicarse durante un periodo de tiempo corto o largo. El uso puede durar días o semanas. Cualquier forma de dosificación empleada debería proporcionar un mínimo número de unidades durante una mínima cantidad de tiempo. La concentración de las unidades activas de las enzimas que se cree que proporcionan una cantidad o dosificación efectiva de enzimas puede seleccionarse según sea apropiado. La cantidad de unidades activas por ml y la duración de tiempo de la exposición dependen de la naturaleza de la infección, y de la cantidad de contacto que el vehículo permite que tenga la enzima/polipéptido(s) lítico(s).

Métodos y Ensayos

La capacidad letal para bacterias, y de hecho el rango significativamente amplio de letalidad bacteriana, presentada por el o los polipéptidos de lisina de la invención proporciona varios métodos basados en la efectividad antibacteriana del o de los polipéptidos de la invención. Así, la presente invención contempla métodos antibacterianos, incluyendo métodos para matar a bacterias gram-positivas, para reducir una población de bacterias gram-positivas, para tratar o aliviar una infección bacteriana, para tratar a un sujeto humano expuesto a una bacteria patógena, y para tratar a un sujeto humano que presenta riesgo de dicha exposición. En la presente memoria se

demuestra que las bacterias susceptibles incluyen las bacterias de las que se derivan originariamente la o las enzimas del fago de la invención, *Streptococcus suis*, así como varias otras cepas bacterianas estreptococales, estafilococales, enterococales y *Listeria*. También se proporcionan métodos para tratar varias afecciones, incluyendo métodos de tratamiento profiláctico de infecciones estreptococales, estafilococales, enterococales o de *Listeria*, el tratamiento de infecciones estreptococales, estafilococales, enterococales o de *Listeria*, reducción de la población o transporte estreptococal, estafilococal, enterococal o de *Listeria*, tratamiento de infección del tracto respiratorio inferior, tratamiento de infecciones de oído, tratamiento de otitis media, tratamiento de endocarditis, y tratamiento o prevención de otras infecciones o afecciones locales o sistémicas.

La(s) lisina(s) de la presente invención demuestran una capacidad notable para matar y efectividad frente a bacterias de varias especies tales como múltiples especies estreptococales o estafilococales, bacterias de distintos grupos de especies tales como bacterias de cada uno de estreptococales, estafilococales, enterococales y/o *Listeria*, y bacterias de distintos órdenes. La clase taxonómica de las bacterias de Bacilli incluye dos órdenes, Bacillales y Lactobacillales. El orden Bacillales incluye *Staphylococcus*, *Listeria* y también *Bacillus*. El orden Lactobacillales incluye *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*. La(s) lisina(s) de la presente invención demuestran actividad antibacteriana y la capacidad de matar a bacterias de distintos órdenes de bacterias, particularmente de distintos órdenes de bacterias Bacilli. La(s) lisina(s) proporcionadas en la presente memoria son capaces de matar a bacterias del orden Bacillales y también del orden Lactobacillales. En la presente memoria se demuestra que la lisina PlySs2 mata a bacterias de dos órdenes distintos, particularmente Bacillales y Lactobacillales, in vitro e in vivo. La lisina de la presente invención es capaz de matar a bacterias Bacillales y Lactobacillales en cultivo mixto y en infecciones mixtas in vivo. La invención contempla así el tratamiento, descolonización, y/o descontaminación de bacterias, cultivos o infecciones o en los casos en los que se sospecha que está presente más de una bacteria gram positiva. En particular, la invención contempla el tratamiento, descolonización, y/o descontaminación de bacterias, cultivos o infecciones o en casos en los que más de un tipo de bacterias Bacillales, más de un tipo de bacterias Lactobacillales, o al menos un tipo de bacterias Bacillales y un tipo de bacterias Lactobacillales se sospecha que están presentes, están presentes o pueden estar presentes.

Esta invención también puede usarse para tratar la septicemia, particularmente en un ser humano. Para el tratamiento de una infección septicémica, tal como para neumonía, o meningitis bacteriana, debe haber un flujo intravenoso continuo del agente terapéutico en la corriente sanguínea. La concentración de las enzimas para el tratamiento de septicemia depende del recuento bacteriano en la sangre y del volumen de sangre.

También se proporciona una composición para uso en un método para tratar una infección, transporte, o poblaciones estreptococales, estafilococales, enterococales o de *Listeria*, que comprende tratar la infección con un agente terapéutico que comprende una cantidad efectiva de al menos una(s) enzima(s)/polipéptido(s) lítico(s) de la invención, particularmente PlySs2 y/o PlySs1, particularmente PlySs2. Más específicamente, la enzima/polipéptido lítico capaz de lisar la pared celular de cepas bacterianas de estreptococales, estafilococales, enterococales o de *Listeria* se produce a partir de material genético de un bacteriófago específico para *Streptococcus suis*. En los métodos de la invención, el o los polipéptidos de lisina de la presente invención, incluyendo PlySs2 y/o PlySs1, particularmente PlySs2, son útiles y capaces en métodos profilácticos y de tratamiento dirigidos frente a bacterias gram-positivas, particularmente infecciones o colonización bacteriana por estreptococales, estafilococales, enterococales o *Listeria*. Las cepas bacterianas susceptibles y relevantes como dianas en los métodos de la invención incluyen y pueden seleccionarse de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus equi zoo*, *Streptococcus agalactiae* (GBS), *Streptococcus pyogenes* (GAS), *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus* Grupo G, *Streptococcus* Grupo E, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus pneumoniae*.

La invención incluye uno o unos polipéptidos de lisina aislados para uso como una composición en métodos para tratar o aliviar infecciones o afecciones relacionadas con *Streptococcus*, incluyendo *S. pyogenes*, y/o *Staphylococcus*, incluyendo *S. aureus*, incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a antibiótico, particularmente incluyendo MRSA, en el que las bacterias o un sujeto humano infectado con o expuesto a la bacteria particular, o que sospecha que está expuesto o que presenta riesgo, se pone en contacto con o se le administra una cantidad del o de los polipéptidos de lisina aislados de la invención efectivos para matar a la bacteria particular. Así, uno o más de PlySs2 y/o PlySs1, incluyendo truncamientos o variantes de estos, incluyendo los polipéptidos como se proporciona en la presente memoria en la Figura 3 y 4 y en las SEQ ID NOS: 1, 2 o 3, se pone en contacto con o se administra de manera que es efectivo para matar a las bacterias relevantes o para aliviar o tratar de otra forma la infección bacteriana.

El término 'agente' significa cualquier molécula, incluyendo polipéptidos, anticuerpos, polinucleótidos, compuestos químicos y moléculas pequeñas. En particular, el término agente incluye compuestos tales como compuestos de ensayo, compuesto o compuestos adicionales añadidos, o compuestos de enzima lisina.

El término 'agonista' se refiere a un ligando que estimula el receptor al que se une el ligando en el sentido más amplio.

El término 'ensayo' significa cualquier proceso usado para medir una propiedad específica de un compuesto. Un

'ensayo de cribado' significa un proceso usado para caracterizar o seleccionar compuestos sobre la base de su actividad a partir de una colección de compuestos.

5 El término 'prevenir' o 'prevención' se refiere a una reducción en el riesgo de adquirir o desarrollar una enfermedad o trastorno (es decir, causar que al menos uno de los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrolle) en un sujeto que puede estar expuesto a un agente causante de la enfermedad, o que está predispuesto a la enfermedad antes del inicio de la enfermedad.

10 El término 'profilaxis' está relacionado con y englobado en el término 'prevención', y se refiere a una medición o procedimiento cuyo propósito es prevenir, en lugar de tratar o curar una enfermedad. Los ejemplos no limitativos de medidas profilácticas incluyen la administración de vacunas; la administración de heparina de bajo peso molecular a pacientes hospitalarios que presentan riesgo de trombosis debido, por ejemplo, a la inmovilización; y la administración de un agente antimalaria tal como cloroquina, antes de una visita a una región geográfica en la que la malaria es endémica o en la que el riesgo de contraer malaria es alto.

15 'Cantidad terapéuticamente efectiva' significa esa cantidad de un fármaco, compuesto, antimicrobiano, anticuerpo, polipéptido, o agente farmacéutico que incitará la respuesta biológica o médica de un sujeto que está siendo buscada por un médico u otro sanitario. En particular, respecto a las infecciones por bacterias gram-positivas y el crecimiento de bacterias gram-positivas, el término "cantidad efectiva" se pretende que incluya una cantidad efectiva de un compuesto o agente que producirá una disminución, que tenga sentido biológicamente, de la cantidad de o el grado de la infección por las bacterias gram-positivas, incluyendo que tiene un efecto bactericida y/o bacteriostático. La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se usa en la presente memoria para significar una cantidad suficiente para prevenir, y preferiblemente reducir al menos aproximadamente un 30 por ciento, más preferiblemente al menos un 50 por ciento, lo más preferiblemente al menos un 90 por ciento, un cambio clínicamente significativo en el crecimiento o cantidad de las bacterias infecciosas, u otra característica de la patología tal como, por ejemplo, fiebre elevada o recuento de células blancas como puede asistir su presencia y actividad.

25 El término 'tratar' o 'tratamiento' de cualquier enfermedad o infección se refiere, en una realización, a mejorar la enfermedad o infección (es decir, parar la enfermedad o crecimiento del agente infeccioso o bacteria o reducir la manifestación, grado o gravedad de al menos uno de los síntomas clínicos de esta). En otra realización, 'tratar' o 'tratamiento' se refiere a mejorar al menos un parámetro físico, que puede no ser discernible por el sujeto. En otra realización más, 'tratar' o 'tratamiento' se refiere a modular la enfermedad o infección, bien físicamente (p. ej., estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (p. ej., estabilización de un parámetro físico), o ambos. En una realización adicional, 'tratar' o 'tratamiento' se refiere a ralentizar la progresión de una enfermedad o reducir una infección.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y que típicamente no producen una reacción alérgica o similar inapropiada, tal como malestar gástrico, mareo y semejantes, cuando se administra a un ser humano.

35 Se indica que, en el contexto de los métodos de tratamiento que se llevan a cabo *in vivo* o métodos de tratamiento médicos y clínicos según la presente solicitud y reivindicaciones, el término sujeto, paciente o individuo se pretende que se refiera a un ser humano.

40 Los términos "bacterias gram-positivas", "bacterias Gram-positivas", "gram-positivas" y cualesquiera variantes no listadas específicamente, pueden usarse en la presente memoria indistintamente, y tal y como se usan en la presente solicitud y reivindicaciones se refieren a bacterias Gram-positivas que son conocidas y/o pueden identificarse por la presencia de determinadas características de la pared celular y/o membrana celular y/o por la tinción con el tinte de Gram. Las bacterias Gram positivas se conocen y pueden identificarse fácilmente y pueden seleccionarse de, pero no están limitadas a, los géneros *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, y *Clostridium*, e incluyen cualesquiera y todas las especies y cepas reconocidas y no reconocidas de estas. En un aspecto de la invención, las bacterias gram-positivas sensibles a la lisina PlyS incluyen bacterias seleccionadas de uno o más de *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y *Enterococcus*.

El término "bactericida" se refiere a capaz de matar a células bacterianas.

El término "bacteriostático" se refiere a capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, incluyendo inhibir el crecimiento de células bacterianas.

50 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y que típicamente no producen una reacción alérgica o similar inapropiada, tal como malestar gástrico, mareo y semejantes, cuando se administra a un ser humano.

55 La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se usa en la presente memoria para significar una cantidad suficiente para prevenir, y preferiblemente reducir al menos aproximadamente un 30 por ciento, más preferiblemente al menos un 50 por ciento, lo más preferiblemente al menos un 90 por ciento, un cambio clínicamente significativo en la actividad de la fase S de una masa celular diana, u otra característica de la patología tal como, por ejemplo, presión sanguínea elevada, fiebre o recuento de células blancas como puede asistir su presencia y actividad.

En un aspecto de la invención, se proporciona una composición para uso en un método para tratar infecciones bacterianas sistémicas o tisulares causadas por bacterias *Streptococcus* o *Staphylococcus* que comprende tratar por vía parenteral la infección con un agente terapéutico que comprende una cantidad efectiva de uno o más polipéptidos de lisina de la invención, particularmente PlySs2 y/o PlySs1, incluyendo truncamientos o variantes de estos, incluyendo los polipéptidos como se proporciona en la presente memoria en la Figura 3 y 4 y en las SEQ ID NOS: 1, 2 o 3 y un vehículo apropiado. Puede usarse una variedad de otros métodos diferentes para introducir la(s) enzima(s)/polipéptido(s) lítico(s). Estos métodos incluyen introducir la(s) enzima(s)/polipéptido(s) lítico(s) por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratecal, y subdérmica. Un experto en la técnica, incluyendo el personal médico, será capaz de evaluar y reconocer el modo o medio de administración más apropiado, dada la naturaleza y grado de la afección bacteriana y la cepa o tipo de bacteria implicada o sospechosa. Por ejemplo, el uso y administración intratecal de uno o más polipéptidos líticos sería la más beneficiosa para el tratamiento de la meningitis bacteriana.

Las infecciones también pueden tratarse inyectando en el tejido infectado del paciente humano un agente terapéutico que comprende la(s) enzima(s)/polipéptido(s) lítico(s) apropiado y un vehículo para la enzima. El vehículo puede estar comprendido por agua destilada, una disolución salina, albúmina, un suero, o cualquier combinación de estos. Más específicamente, las disoluciones para infusión o inyección pueden prepararse de una manera convencional, p. ej., con la adición de conservantes tales como p-hidroxibenzoatos o estabilizantes tales como sales de metales alcalinos de ácido etilendiamino tetraacético, que pueden transferirse entonces a recipientes de fusión, viales de inyección o ampollas. Alternativamente, el compuesto para inyección puede liofilizarse bien con o sin los demás ingredientes y solubilizarse en una disolución tamponada o agua destilada, según sea apropiado, en el momento del uso. En la presente memoria también son útiles los vehículos no acuosos tales como aceites fijados, liposomas, y oleato de etilo. Otras enzimas líticas asociadas a fagos, junto con una proteína holina, pueden incluirse en la composición.

Se proporcionan varias composiciones para uso en métodos de tratamiento para usar una enzima/polipéptido(s) lítico, tal como PlySs2 y PlySS1 como se ejemplifica en la presente memoria, como un tratamiento profiláctico para eliminar o reducir el transporte de bacterias susceptibles, previniendo que aquellos seres humanos que han estado expuestos a otros que tienen los síntomas de una infección, enfermen, o como un tratamiento terapéutico para aquellos que ya han enfermado como consecuencia de la infección. De forma similar, la(s) enzima(s)/polipéptido(s) lítico(s) puede usarse para tratar, por ejemplo, enfermedades del tracto respiratorio inferior, particularmente por el uso de pulverizadores bronquiales o la administración intravenosa de la enzima. Por ejemplo, una enzima lítica puede usarse para el tratamiento profiláctico y terapéutico de infecciones oculares, tales como conjuntivitis. El tratamiento comprende administrar gotas oculares o un lavado ocular que comprende una cantidad efectiva de al menos un polipéptido lítico de la invención y un vehículo que puede ser aplicado de forma segura en un ojo, conteniendo el vehículo las enzimas líticas. Las gotas oculares o lavado ocular están preferiblemente en la forma de una disolución isotónica. El pH de la disolución debería ajustarse de manera que no haya irritación del ojo, que, a su vez, daría lugar a una posible infección por otros organismos, y posible daño en el ojo. Aunque el intervalo de pH debería estar en el mismo intervalo que para otras enzimas líticas, el pH más óptimo estará en el intervalo tal y como se demuestra y proporciona en la presente memoria. De forma similar, también deberían usarse los tampones de la clase descrita anteriormente para las demás enzimas líticas. Pueden añadirse otros antibióticos que son adecuados para uso en gotas oculares en la composición que contiene las enzimas. También pueden añadirse compuestos bactericidas y bacteriostáticos. La concentración de la o las enzimas en la disolución puede estar en el intervalo de aproximadamente 100 unidades/ml a aproximadamente 500.000 unidades/ml, con un intervalo más preferido de aproximadamente 100 a aproximadamente 5.000 unidades/ml, y aproximadamente 100 a aproximadamente 50.000 unidades/ml. Las concentraciones pueden ser mayores o menores que los intervalos proporcionados.

El o los polipéptidos líticos de la invención también pueden usarse en una disolución de lentes de contacto, para empapar y limpiar las lentes de contacto. Esta disolución, que normalmente es una disolución isotónica, puede contener, además de la enzima, cloruro de sodio, manitol y otros alcoholes de azúcar, boratos, conservantes, y semejantes. Una enzima/polipéptido lítico de la invención también puede administrarse en el oído de un paciente. Así, por ejemplo, uno o unos polipéptidos líticos de la invención pueden usarse para tratar infecciones de oído, por ejemplo, causadas por *Streptococcus pneumoniae*. La otitis media es una inflamación del oído medio caracterizada por síntomas tales como otalgia, pérdida auditiva y fiebre. Una de las causas principales de estos síntomas es una acumulación de fluido (efusión) en el oído medio. Las complicaciones incluyen pérdida auditiva permanente, perforación de la membrana timpánica, colesteatoma adquirido, mastoiditis, y otitis adhesiva. Los niños que desarrollan otitis media en los primeros años de vida presentan riesgo de enfermedad recurrente aguda o crónica. Una de las causas principales de la otitis media es *Streptococcus pneumoniae*. La(s) enzima(s)/polipéptido(s) lítico(s) puede aplicarse en el oído infectado mediante la administración de la(s) enzima(s) en un vehículo apropiado en el canal del oído. El vehículo puede comprender disoluciones o suspensiones acuosas u oleosas estériles. La o las enzimas líticas pueden añadirse al vehículo, que también puede contener conservantes adecuados, y preferiblemente un agente tensioactivo. Los agentes bactericidas y fungicidas incluidos preferiblemente en las gotas son nitrato o acetato fenilmercúrico (0,002%), cloruro de benzalconio (0,01%) y acetato de clorhexidina (0,01%). Los disolventes adecuados para la preparación de una disolución oleosa incluyen glicerol, alcohol diluido y propilen glicol. Adicionalmente, puede usarse cualquier número de otros vehículos de gotas de oído. Las concentraciones y conservantes usados para el tratamiento de la otitis media y otras infecciones de oído similares son las mismas que

las discutidas para las infecciones oculares, y el vehículo en el que está la enzima es similar o idéntico a los vehículos para el tratamiento de las infecciones oculares. Adicionalmente, el vehículo puede incluir típicamente vitaminas, minerales, carbohidratos, azúcares, aminoácidos, materiales proteínicos, ácidos grasos, fosfolípidos, antioxidantes, compuestos fenólicos, disoluciones isotónicas, disoluciones basadas en aceite, suspensiones basadas en aceite, y combinaciones de estos.

Las posibilidades y aplicaciones en diagnóstico, profilácticas y terapéuticas que surgen por el reconocimiento de y el aislamiento del o de los polipéptidos de lisina de la invención, derivan del hecho de que los polipéptidos de la invención causan efectos directos y específicos (p. ej., letales) en bacterias susceptibles. Así, los polipéptidos de la invención pueden usarse para eliminar, caracterizar, o identificar a las bacterias relevantes y susceptibles.

Así, un método de diagnóstico de la presente descripción puede comprender examinar una muestra o medio celular para el propósito de determinar si contiene bacterias susceptibles, o si las bacterias en la muestra o medio son susceptibles mediante un ensayo que incluye una cantidad efectiva de uno o más polipéptidos de lisina y un medio para caracterizar una o más células en la muestra, o para determinar si se ha producido o se está produciendo o no la lisis celular. Los pacientes que se pueden beneficiar de este método incluyen aquellos que padecen una infección indeterminada, una infección bacteriana reconocida, o que se sospecha que están expuestos a o portan una bacteria particular. Puede examinarse un fluido, alimento, dispositivo médico, composición u otra muestra semejante que se pondrá en contacto con un sujeto o paciente para determinar bacterias susceptibles o pueden tratarse para eliminar las bacterias relevantes. En un aspecto como este, un fluido, alimento, dispositivo médico, composición u otra muestra semejante puede esterilizarse o tratarse de otra forma para eliminar o retirar cualquier bacteria relevante potencial por la incubación con o exposición a uno o más polipéptidos líticos de la invención.

Los procedimientos y su aplicación son todos familiares para los expertos en la técnica y, de acuerdo con esto, pueden utilizarse en el alcance de la presente invención. En un caso, el o los polipéptidos líticos de la invención forman un complejo con o se unen de otra manera a o se asocian con bacterias relevantes o susceptibles en una muestra y un miembro del complejo se marca con un marcador detectable. El hecho de que se haya formado un complejo y, si se desea, la cantidad de este, puede determinarse por métodos conocidos aplicables a la detección de marcadores. Los marcadores empleados más comúnmente para estos estudios son elementos radiactivos, enzimas, compuestos químicos que fluorescen cuando se exponen a luz ultravioleta, y otros. Se conocen varios materiales fluorescentes y pueden utilizarse como marcadores. Estos incluyen, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, auramina, Rojo Texas, AMCA azul y Lucifer Amarillo. El marcador radiactivo puede detectarse por cualquiera de los procedimientos de contaje actualmente disponibles. El isótopo preferido puede seleccionarse de ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , y ^{186}Re . Los marcadores enzimáticos son asimismo útiles, y pueden detectarse por cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas, amperométricas o gasométricas utilizadas actualmente. La enzima se conjuga con la partícula seleccionada por reacción con moléculas formadoras de puentes tales como carbodiimidas, diisocianatos, glutaraldehído y semejantes. Muchas enzimas que pueden usarse en estos procedimientos son conocidas y pueden utilizarse. Las preferidas son peroxidasa, β -glucuronidasa, β -D-glucosidasa, β -D-galactosidasa, ureasa, glucosa oxidasa más peroxidasa y fosfatasa alcalina. Se hace referencia a las Patentes U.S. Nos. 3.654.090; 3.850.752; y 4.016.043 como ejemplo por su descripción de materiales y métodos de marcaje alternativo.

La invención puede entenderse mejor por referencia a los siguientes Ejemplos no limitativos, que se proporcionan como ejemplares de la invención. Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención y, sin embargo, no deberían considerarse de ninguna manera como limitantes del amplio alcance de la invención.

Ejemplo 1:

Clonación y Caracterización de Lisinas de Fago De *S. suis*

Streptococcus suis es un patógeno Gram-positivo que infecta a los cerdos en todo el mundo. Los reportes de transmisión zoonótica de cerdos a seres humanos están incrementando (Srisikandan S. et al (2006) PLoS Medicine 3(5):585-567). *S.suis* puede desarrollar una presencia consistente en poblaciones humanas en los años venideros. Los seres humanos y los cerdos se han tratado con penicilina o gentamicina, pero existen aislados de *S. suis* resistentes a estos antibióticos (Cantin, M. et al (1992) J Vet Diagnostic Investig 4:170-174).

Purificamos y caracterizamos dos lisinas de fago de cepas de *S. suis* (PlySs1 y PlySs2) y confirmamos su actividad *in vitro* frente a varias cepas de *S. suis*. Además, se mostró que la lisina de *S. suis*, particularmente la lisina PlySs2, mataba *in vitro* a varias otras y distintas cepas de *Streptococcus*, incluyendo strep. del Grupo B. La lisina PlySs2 también es efectiva para matar numerosas otras bacterias, incluyendo otras bacterias patogénicas y clínicamente significativas, particularmente *Staphylococcus*, incluyendo *Staphylococcus aureus*, incluido *S. aureus* resistente a antibiótico tal como MRSA, *Enterococcus*, incluyendo *Enterococcus faecalis*, y *Listeria*.

Resultados

PlySs1 se aisló y clonó mediante un cribado genómico funcional usando el ADN genómico del profago de *S. suis* y PlySs2 se identificó por el análisis de la secuencia del genoma del profago de *S. suis* y después se aisló y clonó. La

lisina PlySs1 se clonó a través del cribado aleatorio funcional del genoma de *S. suis* 7711, una cepa de serotipo 7. Las cantidades de microgramos del ADN genómico (ADNg) se sometieron brevemente a digestión con restricción con Tsp509I (NEB). Los fragmentos con una longitud de 1,5 - 4 kb se aislaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se ligaron en el plásmido pBAD24 linearizado con EcoRI. Este plásmido confiere resistencia a ampicilina y permite la inducción por arabinosa del inserto recombinante. Para identificar los clones que codificaban la lisina, se sometieron bibliotecas a una nueva técnica de cribado que se basa en la toxicidad de proteínas holina codificadas adyacentemente (Schmitz J.E. et al (2010) Adv Environ Microbiol 76(21):7181-7187). Brevemente, los transformantes *E. coli* TOP10 se sembraron en placas en agar LB suplementado con ampicilina y sangre de oveja. Después de la proliferación hasta colonias macroscópicas, las placas se expusieron a una rociada de arabinosa para inducir la transcripción recombinante. Los clones tóxicos se revelaron por el desarrollo de una zona circundante de hemólisis. Estas colonias se identificaron, se volvieron a propagar y se sometieron a un cribado secundario en el que se cubrieron con bacterias matadas con calor (para ensayar directamente la producción de la enzima lítica). Para la cepa de *S. suis* (7711) que rindió la lisina PlySs1, se sometieron ~3.500 clones al cribado de hemólisis original; 100 de estos se seleccionaron para el cribado secundario, 2 de los cuales codificaban la enzima lítica. Para la proteína traducida teórica, se hicieron asignaciones de dominios enzimáticos y de unión posibles mediante el análisis Pfam (pfam.sanger.ac.uk). Sobre la base de esta información, se diseñaron cebadores para sintetizar una construcción truncada (de aquí en adelante referida como PlySs1) con un codón de parada insertado precediendo el dominio de glucosaminidasa C-terminal. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de la lisina PlySs1 de longitud completa y la secuencia de aminoácidos de una enzima truncada se proporcionan en la Figura 3.

Para la identificación y clonación de PlySs2, los genomas de 8 aislados secuenciados de *S. suis* se inspeccionaron para determinar la presencia de genes que codificaban la lisina en el profago integrado. Estas cepas fueron: 05ZYH33 (NCBI Proyecto Genoma #17153); 98HAH33 (#17155); BM407 (#32237); GZ1 (#18737); P1/7 (#352); SC84 (#32239); 05HAS68 05HAH33 (#17157); y 89/1591 (#12417). Para cada genoma, la lista organizada topológicamente de ORF anotadas se inspeccionó manualmente para determinar las regiones de profago potenciales. Si se sospechaba un profago, las traducciones teóricas de cada ORF en esa región se sometieron a, y se asignó un estado de lisina posible sobre la base de la combinación de dominios enzimáticos y de unión predichos. El único gen de lisina identificado de esta manera (PlySs2 de la cepa 89/1591) se clonó por PCR a partir de ADN genómico y se clonó en el plásmido de expresión pBad24 de *E. coli* (véase más adelante). La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la lisina PlySs2 se proporcionan en la Figura 4.

Como se ha descrito anteriormente, se han identificado y clonado dos lisinas de *S. suis* a través de una combinación de cribado recombinante funcional y análisis computacional de genomas publicados de *S. suis*. Estas lisinas se han clonado y denominado PlySs1 y PlySs2. Como otras lisinas, las lisinas de *S. suis*, particularmente PlySs2, tienen un dominio catalítico N-terminal y un dominio de unión a células C-terminal (dominio de unión SH-3 Tipo 5 en PlySs2) (Figura 2). De hecho, la estructura natural de PlySs1 como se clonó a partir de la cepa de *S. suis* 7711, contenía un dominio catalítico secundario adicional aguas abajo del dominio de unión (una organización atípica de la lisina), sin embargo, este dominio se eliminó recombinantemente (como se ha descrito anteriormente) para ajustarse a la estructura estándar.

El gen que codifica la lisina PlySs2 se encontró en un genoma de profago integrado junto con el genoma secuenciado de la cepa de *S. suis* serotipo 2 89/1591 (NCBI Proyecto Genoma #12417, acceso en GenBank ZP_03625529) (Lucas, S. et al, US DOE Joint Genome Institute, envío directo). PlySs2 se clonó por PCR a partir de ADN genómico de la cepa 89/1591 con los siguientes cebadores: AATGCTAGCCTGATACACAGTTAGAGACC-dir (SEQ ID NO:9) y CCTAAGCTTCTTTTCACAAATCATAATCCCCAG-inv (SEQ ID NO:10). Los cebadores incluyen sitios de restricción (NheI y HindIII) para la clonación en pBAD24. El cebador directo corresponde a una posición ≈ 60 pb aguas arriba del punto de inicio del gen, porque varios tripletes ATG en marco están situados cerca entre sí en el extremo 5'. Esto permite que el sitio de unión ribosomal nativo (en lugar del RBS preparado por ingeniería de pBAD24) guíe la transcripción. PlySs2 se clonó de un genoma de profago en *S. suis* en un vector pBAD24 (pBAD24_PlySs2, Figura 5) y se transformó en células de *Escherichia coli* Top 10. pBAD24 codifica β-lactamasa, permite el control transcripcional firme, y se induce por arabinosa, poco costosa. Las *E. coli* transformadas con el vector se crecieron en una placa opaca que contenía halos de peptidoglicano de *Pseudomonas* suspendidos en agar blando (Wang, Y et al (2009) Curr Microbiol 58(6):609-615). Aparecieron zonas claras alrededor de las colonias de *E. coli* indicando la expresión de PlySs2 activa, que hidrolizó el peptidoglicano en el agar blando. La estructura de PlySs2 es bastante diferente a la de LySMP. Codifica un dominio predicho CHAP N-terminal (amidohidrolasa/peptidasa de cisteína-histidina, PF05257) y un dominio SH3 tipo 5 C-terminal (PF08460) (Figura 4). La secuenciación N-terminal confirmó el inicio como "MTTVNEA...".

Producción de Proteínas Lisinas

Las *E. coli* que contenían el plásmido pBAD24_PlySs2 se crecieron a 37°C en 10 L de LB AMP100 y se indujeron para la expresión de toda la noche con 0,2% arabinosa a una DO₆₀₀ ~0,8. Los cultivos se centrifugaron a 10.722 rcf durante 20 mins. Los sedimentos se resuspendieron en 100 mL de Na₃PO₄ 15 mM, pH 7,4 y se mezclaron con comprimidos de mezclas de inhibidores de proteasas. Esta mezcla se homogeneizó y el homogenado se centrifugó a 1.723 rcf durante 20 mins. El sobrenadante se ultra-centrifugó a 30.000 rpm durante 1 hr. Se añadió suficiente Na₃PO₄ 15 mM, pH 8,0 al sobrenadante como para llevar el pH a 7,4.

La proteína se corrió en una columna aniónica HiTrap Fast Flow DEAE (Na₃PO₄ 15mM (PB), pH 7,4) sin unión de PlySs2 (Figura 6A). Se añadió sulfato de amonio al flujo pasante hasta una concentración del 40%. El precipitado se centrifugó y se resuspendió en 200 mL de Na₃PO₄ 15 mM, pH 6,7. La proteína se dializó toda la noche en Na₃PO₄ 15 mM, pH 6,7 con un tubo de 20 µm. El dializado se corrió sobre una columna catiónica HiTrap Fast Flow CM con PlySs2 eluyendo limpiamente en el hombro de flujo pasante, así como a NaCl 70 mM, Na₃PO₄ 15 mM, pH 6,7 (Figura 6B). Todas las fracciones que mostraron PlySs2 pura se combinaron (Figura 6C). Es notable que hay tres codones de inicio en marco precediendo PlySs2: "ATGATGCGTGGAAAGGAGAAGCCTATGACAACAGTAAATGAAGCATTA..." (correspondiente a: "MMRGKEKPM TVNEAL..."). Una muestra pura de la proteína se sometió a secuenciación de proteínas para confirmar que el inicio era "MTTVNEAL...".

Para expresar PlySs1, el clon se creció en Caldo Power + LB-Booster (Athena Enzyme System) hasta una DO₆₀₀ ≈ 1,0 y se indujo con 0,2% arabinosa. El cultivo se agitó durante 4 hr a 37°C (los cuerpos de inclusión se formarían a tiempos más largos). Las células que expresaban se sedimentaron, se resuspendieron en tampón fosfato 15 mM pH 6,2, y se lisaron por tres pasos a través de un homogeneizador EmulsiFlex C-5. Los restos celulares residuales se eliminaron por centrifugación (1 hr, 35.000 X G), y se añadió sulfato de amonio a 225 g/L (saturación del 40%). La proteína precipitada se sedimentó y se resolubilizó en fosfato 15 mM pH 7,4, y se dializó frente a este tampón toda la noche. El dializado se pasó a continuación a través de una columna de intercambio aniónico DEAE equilibrada frente al mismo tampón (resina de flujo rápido, General Electric).

La preparación mencionada anteriormente dio lugar a una preparación de lisina altamente pura en solo dos etapas cromatográficas (Figura 6). Con un pl predicho de 9,01, PlySs2 fluyó directamente a través de la columna de DEAE a pH = 7,4 dejando la mayor parte de las proteínas contaminantes unidas en la columna de DEAE. PlySs2 eluyó claramente en el hombro del flujo pasante y a NaCl 17 mM, purificándose de las proteínas que fluyeron rápidamente a través de la resina CM. Esta preparación rindió ≈ 60 mg de proteína por litro de cultivo de *E. coli* a ≈ 1,5 mg/ml con una pureza > 99%. El rendimiento se incrementó hasta ≈ 150 mg por litro de cultivo de *E. coli* a ≈ 2,0 mg/ml con una pureza > 90% cuando la etapa de la columna CM se evitó. Si fue necesario, el último producto se: dializó (en PB 5 mM, NaCl 15 mM); se liofilizó; se reconstituyó (al 10% del volumen original); se centrifugó; y se esterilizó por filtración (para eliminar cualquier material insoluble). Esto generó una disolución soluble de PlySs2 a ≈ 20 mg/ml, que retuvo la actividad ajustada por la concentración del material de partida de menor concentración. PlySs2 puede producirse más eficientemente, y a una concentración mayor, que muchas lisinas publicadas (Daniel A et al (2010) Antimicrob Agents Chemother 54(4):1602-1612; Wang, Y. et al (2009) Curr Microbiol 58(6):609-615; Nelson, D et al (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103(28):10765-10770).

Caracterización Bioquímica de PlySs2

Las lisinas de *S. suis* se caracterizaron adicionalmente y se ensayaron para determinar las condiciones bioquímicas incluyendo pH óptimo, salinidad óptima, estabilidad frente a la temperatura, y el efecto de EDTA. La actividad se determinó por el grado de reducción de la turbidez de *S. suis* 7997 (DO₆₀₀) después de la adición de PlySs2 a 32 µg/ml. Brevemente, 5 mL de un cultivo de toda la noche de la cepa de *S. suis* 7997 en infusión de cerebro corazón (BHI) se inoculó en 45 mL de BHI y se creció a 37°C durante 2 horas. El cultivo de 50 mL se centrifugó a 1.789 rcf durante 10 min. Un cultivo de 50 mL de *S. suis* 7997 se centrifugó. El sedimento se lavó con 50 mL de H₂O doblemente destilada (ddH₂O) para el ensayo del pH, o 25 mL de Na₃PO₄ 15 mM, pH 8,0 para los demás ensayos y se centrifugó de nuevo. El sedimento se resuspendió entonces en dd H₂O o Na₃PO₄ 15 mM, pH 8,0 suficiente como para llegar a una DO₆₀₀ final de ~1,0 para cada condición del ensayo. En todos los controles, PB reemplazó a PlySs2. Se tomaron lecturas espectrofotométricas de cada muestra a DO₆₀₀ cada minuto durante una hora. Los resultados globales para el pH óptimo, salinidad óptima, estabilidad frente a la temperatura, y el efecto de EDTA se representan en la Figura 7A-7D. La dependencia del pH de la enzima se abordó en primer lugar usando dos conjuntos de tampones con intervalos adyacentes de pH, citrato/fosfato: 4,6 - 8,0; y bis-tri-propano (BTP): 7,0 - 9,7. También se variaron NaCl, EDTA, y DTT para ensayar las condiciones para la actividad de PlySs2. Para determinar el pH óptimo, la actividad de PlySs2 se ensayó frente a la cepa de *S. suis* 7997 en tampón fosfato/citrato a varios niveles de pH (Figura 7A). PlySs2 tuvo la actividad más potente a pH 8,0. Observamos un espectro de lisis extendido a los valores más altos de pH. El pH óptimo se determinó de forma similar frente a la cepa de *S. suis* 7997, en este caso usando tampón Bis-tris propano (BTP), lo que permitió la evaluación hasta un nivel de pH más alto (Figura 8). Se mostró que PlySs2 tenía una actividad aguda hasta un pH de 9,7. En BTP, la lisis fue máxima al pH más alto, 9,7, pero este no es un tampón adecuado para las células vivas. La lisis también se produjo en BTP, pH 7,0-8,0; a valores de pH proporcionales, sin embargo, la magnitud de la caída de DO fue mucho más pronunciada en citrato/fosfato (un tampón más fisiológico para el crecimiento de los cultivos de ensayo). Hubo actividad en valores inferiores hasta un pH 6,0, que es significativo, porque el pH de la sangre es aproximadamente 7,4. Para determinar la concentración óptima de sal, en 195 µL de células, se añadieron 5µL de lisina a 50 µL de varias concentraciones de NaCl (Figura 7B). PlySs2 tuvo la mayor actividad en NaCl 0 mM. Las células son más susceptibles a la lisis en una disolución más hipotónica. La sal no aumentó la lisis inducida por PlySs2. A concentraciones constantes de enzima, la bacteriolisis disminuyó de 0 - 1.000 mM de NaCl. Por lo tanto, NaCl 0 mM es óptimo, porque las células son más susceptibles a la lisis en una disolución más hipotónica.

Para determinar la estabilidad frente a la temperatura de la lisina, se incubó durante 30 minutos a varias temperaturas, se enfrió y después se añadió a 245 µL de células suspendidas en Na₃PO₄ 15 mM, pH 8,0 (Figura

7C). La exposición de PlySs2 a un exceso de DTT no tuvo ningún impacto (ni positivo ni negativo) en la actividad (datos no mostrados). El tratamiento con EDTA impidió la lisis inducida por PlySs2 de *S. suis*. Se añadió la lisina a células suspendidas en Na₃PO₄ 15 mM, pH 8,0 junto con varias concentraciones de etilendiaminotetraacetato (EDTA) para determinar si requiere un cofactor. En los controles, el dd H₂O reemplazó a la lisina (PlySs2) para todos los ensayos. Concentraciones muy bajas de etilendiaminotetraacetato (EDTA) disminuyeron la actividad de PlySs2 (Figura 7D). Esto significa que PlySs2 requiere un cofactor o algún otro modificador. La lisina (PlySs2) se ensayó con EDTA a concentraciones muy bajas para determinar qué nivel permitiría alguna actividad residual. A ese nivel (entre 4 μM y 200 μM de EDTA), se añaden cantidades bajas (5 - 50 μM) de diferentes cationes divalentes (Ca²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺) para determinar el cofactor.

La estabilidad de PlySs2 se ensayó cuando se incubó a: diferentes temperaturas durante 30 minutos; 37°C durante horas; 4°C durante días; y -80°C durante meses. La actividad de cada parte alícuota (a 32 μg/ml) frente a *S. suis* 7997 se determinó espectrofotométricamente como se ha indicado anteriormente. PlySs2 también se ensayó después de una a diez congelaciones-descongelaciones consecutivas de temperatura ambiente a -80°C. Cuando se incubó a 22°C - 85°C durante 30 min, la actividad de PlySs2 no estuvo principalmente afectada a través de un intervalo de temperatura significativo, incluyendo 55°C; a 60°C, la actividad de PlySs2 se suprimió completamente. Después de incubación a 37°C durante 24 horas, PlySs2 retuvo una actividad completa; pero después de una incubación de 48 horas a 37°C, PlySs2 mostró una actividad disminuida. No hubo una disminución observable en la actividad después de 15 días de incubación a 4°C. Además, PlySs2 duró más de 7 meses a -80°C sin una reducción en la actividad. La lisina puede soportar 10 congelaciones-descongelaciones consecutivas de temperatura ambiente a -80°C sin ningún efecto observable en su actividad. La estabilidad de la lisina PlySs2 purificada se determinó después de mantenerla a 37°C durante hasta 48 horas en tampón. La efectividad letal se determinó frente a la cepa de *S. suis* 7997 periódicamente, como se muestra en la Figura 9. La lisina PlySs2 es >90% estable hasta 24 horas y mantiene al menos un 50% de actividad después de 48 horas. La estabilidad de la lisina PlySs2 se evaluó en almacenamiento en congelador a -80°C. La lisina PlySs2 retiene esencialmente el 100% de actividad después de almacenamiento en tampón durante hasta al menos 7 meses a -80°C (Figura 10).

Se han emprendido las investigaciones para determinar el enlace catalizado por la lisina PlySs2. PlySs2 se incubó con peptidoglicano purificado de *S. suis* desprovisto de ácido lipoteicoico y carbohidratos toda la noche a 37°C y el producto se sometió a espectroscopía de masa. Los datos sugieren que la escisión es una N-acetilmuramoiil,-L-alanina amidasa.

30 Caracterización Bioquímica de PlySs1

Una enzima lítica de profago se clonó a partir de un cribado genómico funcional de la cepa de *S. suis* 7711, un aislado de serotipo 7 que se originó de the Netherlands1. El gen completo de la lisina PlySs1 codifica una proteína de 452 residuos: el análisis Pfam predice un dominio alanina-amidasa de tipo 5 (PF05832) en el extremo N, seguido de un doble dominio de unión a la pared celular CPL-7 (PF08230) en la región central y un dominio secundario glucosaminidasa (PF01832) en el extremo C. Arquitectualmente, la organización de los dominios de la lisina clonada es altamente atípica. Las lisinas de Gram-positivas consisten típicamente en un dominio enzimático N-terminal y un dominio de unión C-terminal. Aunque se observan ocasionalmente lisinas con dos dominios líticos N-terminales, es raro que un segundo enzimático funcionalmente esté codificado *después* del dominio de unión. Un ejemplo es la lisina LambdaSa2 de *S. agalactiae* (Pritchard DG et al (2007) Appl Environ Microbiol 73(22):7150-7154). Trabajando con LambdaSa2, Donovan y Foster-Frey observaron sorprendentemente una actividad enzimática *incrementada* después de la eliminación del dominio glucosaminidasa C-terminal (Donovan DM y Foster-Frey J (2008) FEMS Microbiol Lett 287(1):22-33). Con esta motivación, preparamos por ingeniería una construcción truncada de la lisina clonada solo con los dominios enzimáticos N-terminal y el de unión central. Esta construcción truncada se expresó y se purificó para análisis funcional posterior; los estudios de actividad y caracterización descritos en la presente memoria se basaron en la PlySs1 truncada; en la presente memoria se refiere como PlySs1 truncada o ΔPlySs1. Como se ha indicado anteriormente, la estructura y secuencia de aminoácidos de la lisina PlySs1 de longitud completa y truncada se representa en la Figura 3.

Las condiciones bioquímicas óptimas para PlySs1 se determinaron frente a células vivas de la cepa codificadora de *S. suis* (7711). Para estos experimentos, la actividad se estimó a través del grado de reducción de la turbidez (DO₆₀₀) de una suspensión bacteriana acuosa después de la adición de la lisina. La dependencia del pH de la enzima se abordó en primer lugar usando dos conjuntos de tampones con intervalos adyacentes de pH, citrato/fosfato: 4,6 - 8,0; y bis-tris-propano (BTP): 7,0 - 9,7. Se observó un espectro de lisis extendido, de 5,4 - 9,4 (Figura 11A). En BTP, la lisis fue máxima de 8,2 - 9,0; a valores de pH proporcionales, sin embargo, la magnitud de la caída de la DO fue ligeramente más pronunciada en citrato/fosfato (Figura 11B).

El papel de la concentración de sal se consideró asimismo, aunque no afectó en gran medida la lisis inducida por PlySs1. A concentraciones constantes de enzima, la bacteriolisis varió poco de 0 - 1.000 mM de NaCl, con solo pequeños incrementos numéricos bajo las condiciones más hipotónicas (Figura 12). La exposición de PlySs1 a un exceso de DTT o EDTA no impactó negativamente en la actividad, indicando que la enzima no se basa en puentes disulfuro intramoleculares o cationes que se pueden quelar como cofactores (Figura 13A y 13B). La estabilidad térmica de PlySs1 se examinó incubando la enzima a varias temperaturas elevadas antes de su uso (el experimento de la caída de la DO en sí mismo se llevó a cabo siempre a 37°C). Cuando se mantuvo a 35°C - 60°C durante 30

min, la actividad de la lisina no se vio afectada prácticamente hasta 50°C, punto en el que se suprimió completamente (Figura 14A). Para la incubación de 6 hr, se observó una disminución parcial en la actividad a 45°C, mientras la muestra de 40°C no se vio afectada (Figura 14B). La última corresponde a la temperatura corporal porcina típica.

- 5 Para determinar la especificidad del enlace del dominio enzimático de PlySs1, se sometieron paredes celulares purificadas de *S. suis* (de la cepa tipo S735) a doble digestión con HEWL (una muramidasa) y PlySs1. Los dos picos predominantes fueron m/z = 718 y m/z = 734. Esto corresponde exactamente a las masas predichas de los aductos [Na-M]⁺ y [K-M]⁺ de GlcNAc-MurNAc-LAla-D-Gln. Esto sugiere que PlySs1 posee actividad gamma-endopeptidasa, escindiendo el tallo de peptidoglicano entre D-Gln y L-Lys como característico de una γ-D-glutaminil-L-lisina endopeptidasa. Cuando se tomó un espectro de masa de la pared celular no digerida, los dos picos anteriores estaban ausentes.

Ejemplo 2

Ensayo *In Vitro* de la Actividad Específica de la Lisina

Actividad de PlySs2

- 15 Para determinar la actividad de la lisina PlySs2 frente a diferentes tipos celulares, se añadieron 5 µL de 1,6 µg/µL (8 µg) de PlySs2 en un pocillo de microtitulación a 245 µL de células (suspendidas en Na₃PO₄ 15 mM, pH 8,0). En un pocillo correspondiente como control, se añadieron 5 µL de dd H₂O a 245 µL de células. Se tomaron lecturas (DO₆₀₀) para cada pocillo en un espectrofotómetro cada minuto durante una hora. La densidad DO indica la cantidad de crecimiento de las células bacterianas en el pocillo de microtitulación.
- 20 Este ensayo de actividad se determinó en primer lugar para la cepa patogénica de *S. suis* 7997 con varias concentraciones de PlySs2 (Figura 15A). La actividad específica de la lisina PlySs2 purificada también se evaluó *in vitro* frente a la cepa de *S. suis* S735 (Figura 15B). Este ensayo se realizó entonces usando 32 µg/mL de PlySs2 para determinar la actividad de PlySs2 frente a otras especies de bacterias (se encontró que, sobre la base del ensayo lítico, esta era una buena concentración para los estudios de letalidad *in vitro* frente a otros organismos)
- 25 (Figura 16A a 16D). Los resultados adicionales de letalidad en cepas se muestran en la Figura 17A y 17B. Los resultados adicionales se tabulan a continuación en la Tabla 1.

Como se demuestra y representa en los resultados anteriores, la enzima lisina PlySs2 tiene una actividad letal amplia no solo frente a *S. suis*, sino frente a otros patógenos particularmente incluyendo *S. aureus*, *S. pyogenes*, *Listeria* y estreptococos del Grupo B. Los resultados mostrados demuestran una reducción del crecimiento y letalidad frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). En ensayos *in vitro* comparables, PlySs2 es efectiva adicionalmente y de forma similar frente a cepas de *Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia a vancomicina (VISA) y *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (VRSA) (Figura 18).

35 Esta lisina de *S. suis* es similar a las lisinas previamente identificadas y caracterizadas en su capacidad de matar rápidamente bacterias patogénicas. Sin embargo, es inhabitual y destacable en su actividad amplia frente a patógenos importantes. También es notable que la lisina puede producirse y purificarse fácilmente, como se ha mostrado anteriormente, y que es estable en varias temperaturas, pH y salinidad relevantes, lo que hace que sea una enzima terapéutica candidata atractiva.

Tabla 1

Reducción por PlySs2 del Crecimiento (Densidad Óptica) de Diferentes Bacterias			
Ninguna (caída de 0,3-0,8 en la DO ₆₀₀)	Ligera (caída de 0,05-0,3 en la DO ₆₀₀)	Moderada (caída de 0,3-0,8 en la DO ₆₀₀)	Aguda (caída >0,8 en la DO ₆₀₀)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus suis</i> , Cepa (Serotipos): 10 (2), 735 (2), 6112 (1), 6388 (1), 7997 (9), 8067 (9)
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Streptococcus rattus</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> -GGS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Streptococcus agalactiae</i> -GBS - 090R	<i>Staphylococcus simulans</i>
<i>Bacillus anthracis</i>		<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

Reducción por PlySs2 del Crecimiento (Densidad Óptica) de Diferentes Bacterias			
Ninguna (caída de 0,3-0,8 en la DO ₆₀₀)	Ligera (caída de 0,05-0,3 en la DO ₆₀₀)	Moderada (caída de 0,3-0,8 en la DO ₆₀₀)	Aguda (caída >0,8 en la DO ₆₀₀)
		-GAS	
<i>Escherichia coli</i>		<i>Streptococcus agalactiae</i> -GBS - Tipo II	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Enterococcus faecium</i>			

Actividad de PlySs1

La actividad de la lisina PlySs1 truncada (Δ PlySs1) se determinó frente a diferentes tipos celulares. Dados los experimentos anteriores, se emplearon las siguientes condiciones de tampón óptimas para todos los experimentos *in vitro* adicionales con Δ PlySs1: tampón fosfato 20 mM, pH = 7,8, EDTA 2 mM. Se introdujo un intervalo de concentraciones de lisina, de 6,5 - 130 μ g/ml, en células vivas de *S. suis* en este tampón. Tres cepas se consideraron particularmente relevantes: 7711, la cepa de serotipo 7 que codifica PlySs1; S735, la cepa de serotipo 2 de referencia; y 7997, una cepa de serotipo 9 altamente virulenta. Para cada una de estas cepas, la respuesta de DO600 dependiente del tiempo a varias dosificaciones de PlySs1 se proporciona en la Figura 19. En términos de viabilidad bacteriana, solo la concentración más alta de PlySs1 (130 μ g/ml) dio lugar a una disminución >90% en las CFU para 7711, S735, y 7997 después de 1 hr de tratamiento (Tabla 2). La lisina también se ensayó frente a células que se dividían activamente en cultivo en caldo (cepa 7711) (Figura 20). Aunque retrasó la proliferación bacteriana de una manera dependiente de la dosis, estos efectos fueron generalmente suaves y Δ PlySs1 no pudo inhibir el crecimiento de *S. suis* completamente.

15 Tabla 2

Análisis de CFU de las Cepas 7711, S735 y 7997

Cepa	13 μ g/ml	130 μ g/ml
S735 (ST2)	80,4% - 92,6%	95,4% - 99,5%
7997 (ST9)	16,8% - 30,3%	89,9% - 93,9%
7711 (ST7)	0% - 35,6%	95,3% - 99,2%

Para dos concentraciones de Δ PlySs1 (130 y 13 μ g/ml), el análisis de CFU se llevó a cabo en las cepas de *S. suis* S735, 7997, y 7711 después de 1 hr de tratamiento (condiciones de tampón óptimas). En cada experimento, el porcentaje de disminución de las CFU se determinó para la muestra tratada frente a la no tratada. El intervalo de los valores observados (en 3 experimentos independientes) se reporta aquí para cada cepa. El serotipo de cada cepa se indica entre paréntesis.

Δ PlySs1 se ensayó adicionalmente frente a un panel de 19 cepas adicionales de *S. suis* de diversos serotipos, así como frente a otras especies de bacterias Gram-positivas. Se usaron las mismas concentraciones de lisina que anteriormente. Para cada dosificación, los valores de lisis observados después de 1 hr se listan en la Tabla 3 y Tabla 4, y la información se resume gráficamente en la Figura 21.

Tabla 3

Análisis de Otras Cepas de <i>S. suis</i>					
Cepa	6,5 µg/ml	13 µg/ml	30 µg/ml	65 µg/ml	130 µg/ml
ST13	0,32	0,17	0,04	0,02	0,02
6112 (ST1)	0,14	0,11	0,06	0,02	0,01
ST8	0,25	0,12	0,06	0,03	0,03
6388 (ST1)	0,15	0,13	0,06	0,03	0,02
10 (ST2)	0,29	0,18	0,10	0,05	0,02
8076 (ST9)	0,52	0,40	0,21	0,14	0,04
ST9	0,50	0,30	0,23	0,13	0,05
ST4	0,63	0,47	0,32	0,22	0,12
ST11	0,64	0,47	0,32	0,19	0,07
ST14	0,79	0,57	0,33	0,15	0,06
ST7	0,65	0,47	0,34	0,22	0,11
ST1	0,80	0,34	0,36	0,19	0,06
ST5	0,78	0,59	0,39	0,22	0,10
7197 (ST7)	0,64	0,49	0,39	0,16	0,07
ST6	0,76	0,56	0,40	0,21	0,06
ST3	0,81	0,71	0,48	0,32	0,16
ST2	0,79	0,70	0,49	0,34	0,17
ST10	0,85	0,72	0,55	0,44	0,28

ST12 Véase la Leyenda a Continuación**

**Varios aislados de *S. suis* se expusieron (a condiciones de tampón óptimas) a Δ PlySs1 a las concentraciones anteriores. La mayoría de estas bacterias son aislados clínicos no identificados del serotipo indicado (p. ej., ST1, ST2, etc...). Para las cepas identificadas, el serotipo se proporciona entre paréntesis. La proporción de DO₆₀₀ de tratada 1 hora/no tratada se proporciona para cada concentración de Δ PlySs1 (representando un único experimento), y las cepas se listan en el orden de sensibilidad decreciente. Para la cepa ST12, no fue posible realizar el análisis de DO. Después de la adición de Δ PlySs1 (todas las concentraciones anteriores), las células se auto-adhirieron rápidamente y salieron de la suspensión. Este fenómeno no se observó para las células ST12 no tratadas.

Tabla 4

Análisis de Otras Bacterias Gram Positivas					
Cepa	6,5 µg/ml	13 µg/ml	30 µg/ml	65 µg/ml	130 µg/ml
<i>S. oralis</i> 35037	0,30	0,13	0,08	0,07	0,04
<i>S. agalactiae</i> tipo II	0,61	0,21	0,11	0,08	0,04
<i>S. dysgalactiae</i> 21597	0,26	0,18	0,12	0,10	0,09
<i>S. pyogenes</i> A486	0,12	0,13	0,13	0,11	0,10
<i>S. pneumoniae</i> R36	0,25	0,22	0,14	0,16	0,12
<i>S. dysgalactiae</i> GGS	0,30	0,27	0,15	0,11	0,14
<i>S. equi</i> 700400	0,48	0,25	0,15	0,07	0,09
<i>S. uberis</i> 27598	0,42	0,23	0,16	0,14	0,12
<i>S. pyogenes</i> D471	0,39	0,27	0,17	0,13	0,09
<i>S. gordonii</i> 10558	0,76	0,32	0,19	0,09	0,06
<i>S. equi</i> 9528	0,66	0,45	0,25	0,19	0,16
<i>L. monocytogenes</i> HER1084	0,63	0,52	0,26	0,14	0,04
<i>S. sanguinis</i> 10556	0,48	0,44	0,28	0,21	0,11
estreptococos del Grupo E K131	0,69	0,50	0,33	0,22	0,15
<i>S. sobrinus</i> 6715	0,64	0,48	0,39	0,32	0,23
<i>E. faecium</i> EFSK2	0,85	0,67	0,52	0,32	0,13
<i>S. aureus</i> RN4220	0,89	0,78	0,55	0,31	0,10
<i>S. salivarius</i> 9222	0,80	0,76	0,56	0,53	0,37
<i>S. rattus</i> BHT	0,82	0,84	0,82	0,83	0,79
<i>M. luteus</i> 4698	0,84	0,90	0,83	0,87	0,82
<i>E. faecalis</i> V583	0,98	0,93	0,84	0,71	0,52
<i>B. cereus</i> 14579	0,93	0,92	0,86	0,90	0,86
<i>B. thuringiensis</i> HD73	0,99	0,98	0,93	0,86	0,60
<i>S. mutans</i> U159	0,95	0,99	0,94	0,76	0,85

Análisis de Otras Bacterias Gram Positivas					
Cepa	6,5 µg/ml	13 µg/ml	30 µg/ml	65 µg/ml	130 µg/ml
<i>S. epidermidis</i> HN1292	1,04	1,00	0,96	0,94	0,87
<i>S. agalactiae</i> 090R	0,97	0,99	0,97	0,98	0,93
<i>S. simulans</i> TNK3	0,96	1,00	1,00	1,00	0,96
<i>B. anthracis</i> ΔSterne	1,02	1,03	1,02	0,98	0,90
<i>B. subtilis</i> SL4	1,07	1,05	1,04	1,03	0,96

5 Todas las cepas de *S. suis* demostraron algún grado de susceptibilidad. De forma interesante, muchos de los estreptococos distintos de *suis* (e incluso algunos no estreptococos) también se lisaron a concentraciones de la enzima proporcionales. Como se demuestra y representa en los resultados anteriores, la enzima lisina PlySs1 tiene una actividad letal amplia y equivalente no solo frente a *S. suis*, sino frente a numerosas cepas de *Streptococcus*, incluyendo estreptococos del Grupo B, y adicionalmente frente a otros patógenos, incluyendo particularmente *S. aureus*, *Enterococcus*, *Bacillus* y *Listeria*. Clásicamente, una lisina de fago demuestra una disminución importante de la actividad cuando va desde su especie huésped a otras. Aquí, sin embargo, se observó un intervalo amplio de susceptibilidad entre bacterias distintas de *suis*, algunas de ellas demostrando una lisis idéntica a la de *S. suis* misma.

Ejemplo 3

Ensayo de Letalidad en CFU

La letalidad específica y caída en las unidades formadoras de colonias (CFU) de *S. suis* S735 y 7997 se determinó cuando se expusieron a 32 µg/mL de PlySs2 durante 60 minutos en PB 15 mM, pH 8,0 (Figura 22).

15 Ejemplo 4

Evaluación de Resistencia

20 Para ensayar el desarrollo de resistencia a la lisina de *S. suis* en bacterias susceptibles, cada una de las cepas de *S. aureus* estafilococales MW2 y 8325 y la cepa de *Streptococcus pyogenes* 5005 se expusieron a concentraciones crecientes de forma incremental de PlySs2. Ninguna de las cepas de *S. aureus* desarrolló resistencia durante el curso del estudio (Figura 23). Siguiendo un protocolo establecido (Rouse, M.S. et al (2005) Antimicrob Agents Chemother 49(8):3187-3191; Pastagia M et al (2011) Antimicrob Agents Chemother 55(2):738-44) para el desarrollo de cepas resistentes a mupirocina, las cepas de *S. aureus* MW2 y 8325 y la cepa de *S. pyogenes* 5005 se crecieron en presencia de PlySs2. La concentración de PlySs2 se duplicó diariamente de 1/32^o de la concentración inhibitoria mínima (MIC) de PlySs2 frente a cada cepa hasta 4× su MIC durante un periodo de 8 días. Inicialmente, las células bacterianas a 5×10^8 CFU/ml se crecieron toda la noche en presencia de 1/32× MIC de PlySs2 en MHB a 37°C. Estas células se centrifugaron durante 10 min a 900 rcf y se dividieron en dos partes alicuotas. Una parte alicuota se diluyó 10 veces en medio MHB fresco con una concentración que era el doble de la concentración previa de PlySs2; una parte de la otra parte alicuota se extendió sobre la superficie de una placa de MHA que contenía la MIC de PlySs2 para cribar los clones resistentes. Se crecieron cultivos separados de cada cepa en presencia de mupirocina de la misma manera como un control positivo.

35 En este experimento, las MIC se determinaron por la detección de formación de sedimento en la parte inferior de los pocillos redondeados de una placa de poliestireno. Cada día, se extendió 1,0 µL de muestra de cada cultivo en placas selectivas que contenían la MIC del fármaco respectivo a la que se había expuesto cada cultivo. La MIC de PlySs2 o mupirocina se ensayó para 4 colonias por cultivo cada día por microdilución para cada paso seriado como se ha descrito anteriormente (Wiegard, I et al (2008) Nat Protoc 3(2):163-175) para determinar si había surgido un clon resistente (definido como un incremento de 4 veces en la MIC). El procedimiento se repitió con mupirocina y cada cepa como un control positivo.

Ejemplo 6

Estudio de la Microbiota de la Cavidad Oral

40 Los efectos de las lisinas de *S. suis* sobre la flora bacteriana natural se evaluaron usando un estudio de la microbiota

de la cavidad oral de la rata. Se estiraron placas de agar sangre con frotis de las cavidades orales de dos ratas. Los cultivos se aislaron de cada placa mediante dos ciclos de subcultivo y se crecieron toda la noche en caldo BHI. Al día siguiente, se sembró en placas 1 mL de cada cultivo en placas de agar BHI seco dando como resultado una capa fina de estos cultivos en agar. Después de que se secaran, se depositaron 10 µL de PlySs2 en cada lado de una gota de 10 µL de dd H₂O central como un control. De los 6 cultivos, solo apareció una zona de aclaramiento alrededor de las gotas de PlySs2 en un cultivo (datos no mostrados). Este cultivo se envió y se confirmó como *S. aureus*. Se tomaron frotis de las cavidades orales de cada una de 3 ratas de Harlan, 4 Charles River, y 2 ratas separadas de Charles River. Crecieron colonias amarillas en cada placa de sal de manitol estriada con el frotis de cada rata indicando que todas contenían oralmente *S. aureus* (datos no mostrados).

10 Ejemplo 7

Modelo de Sepsis en Ratón por MRSA

La actividad de la lisina PlySs2 frente a *S. aureus* se ha evaluado adicionalmente en un modelo de sepsis en ratón por MRSA. En el modelo de sepsis en ratón por MRSA, se inyectaron a ratones susceptibles (ratones FVB/NJ, intervalo de peso 15-20g) 500 µL de 5×10⁵ (aprox DL₁₀₀) células MRSA/mL en mucina gástrica de cerdo al 5% en PBS por vía intraperitoneal (IP). Después de 3 horas, todos los ratones son bacterémicos con MRSA en sus órganos (incluyendo bazo, hígado, riñón, y corazón/sangre). Para determinar la actividad de PlySs2 en este modelo, se inyectaron 500 µL de PlySs2 a 2 mg/mL IP 3 horas después de inyectar MRSA. Esto da como resultado ~1 mg/mL de PlySs2 en la corriente sanguínea de cada ratón de ensayo. A los ratones control se les inyectaron 500 µL de PBS. La supervivencia se evaluó durante diez días. Los ratones control murieron en 18-20 horas. Este estudio rindió resultados prometedores, mostrando una supervivencia importante de los ratones tratados con PlySs2 (Figura 25).

Ejemplo 8

Modelo de la Infección de Heridas

La lisina de *S. suis* se ensayó en un modelo de infección de heridas por MRSA en ratas. En este modelo, se crea una incisión de 3 centímetros a lo largo del lado dorsal de la rata. Posteriormente, se corta una incisión de 1 cm de longitud, 1 cm de profundidad en el músculo espinotrapecio. Se inoculan entonces 50 µL de MRSA a 1×10⁸ CFU/mL (5×10⁶CFU en total) en la herida. Después de 3-5 minutos, las ratas de ensayo se tratan con 500 µL de PlySs2 a 10 mg/mL. Después de 3-5 minutos más, la herida se cierra con grapas y se añaden 100 µL de PlySs2 a 10 mg/mL en la parte exterior de la herida. Se tiene cuidado para asegurar que ninguna de las bacterias ni la lisina salen de la herida al sellarse con grapas. Después de 10 días, las CFU de MRSA se examinan en el sitio de la infección. En las primeras 2 rondas de ensayos, se mostró que PlySs2 tiene un efecto perjudicial en MRSA en las heridas dorsales, con las CFU de MRSA cayendo 3-4 logs en las ratas tratadas con PlySs2 comparado con las ratas control.

Experimentos en animales

Los experimentos en animales se iniciaron mediante la determinación de la dosis infecciosa de MRSA necesaria para causar infección en la herida de la rata. Encontramos que incluso a dosis de hasta 10⁹ CFU no se produjo una infección. Sin embargo, cuando añadimos un cuerpo extraño (lechos de vidrio estériles), la infección se produjo a <10⁸ CFU. Específicamente, se hicieron incisiones en las espaldas de las ratas (5-6 cm de longitud) y se hizo una incisión de 2-3 mm en el tejido subyacente. A esto se añadieron 100 mg de arena estéril y 50 µl de MRSA. Las heridas se cerraron con grapas y se hizo un seguimiento de los animales durante 10 días y las heridas se abrieron y examinaron para cambios gruesos y se tomaron muestras de tejido para un examen bacteriológico.

40 Resultados

Los animales control que solo recibieron arena estéril mostraron una cicatrización normal sin características inhabituales y sin contaminación bacteriana. Los animales que recibieron MRSA mostraron una formación clara de absceso, tejido necrótico y pus. Las muestras (tejido pesado y homogeneizado) tomadas de la herida abierta rindieron aproximadamente 10⁷ CFU de MRSA / gramo de tejido. Este modelo fue muy reproducible rindiendo los mismos resultados en al menos 10 animales.

Tratamiento

Usamos el modelo como se ha descrito anteriormente para tratar con lisina PlySs2 para determinar los efectos del tratamiento. En este caso, la mitad de los animales que recibió el MRSA y la arena se trató con 10 mg de PlySs2 en 50 ul de tampón fosfato (PB), los animales control recibieron PB en su lugar 10 minutos después de la dosificación con MRSA. Se hizo un seguimiento a los animales durante 10 días. En ese momento, los animales se analizaron para determinar cambios gruesos y microbiología. Las heridas en los animales control presentaron pus, necrosis, y baja cicatrización. Esto contrasta de forma acusada con los animales tratados con una única dosis de PlySS2. Estas heridas no presentaron pus ni necrosis y presentaron una mejor cicatrización.

Resultados

5 Como puede observarse en la Tabla 5, las heridas de las ratas que fueron tratadas con tampón solo presentaron un promedio de $4,27 \times 10^6$ CFU/gramo de tejido de MRSA mientras los animales tratados con PlySs2 tuvieron un promedio de $1,41 \times 10^2$ CFU/gramo de tejido, una reducción de >4 logs de MRSA. Este número es menor de 4 logs ya que la mayor parte de las heridas tratadas con PlySs2 fueron menores que nuestros límites de detección.

Tabla 5 Infecciones En Heridas de Ratas Con MRSA Después de Tratamiento Con PlySS2 o Tampón

PLYSS2	CFU/Gramo	Tampón	CFU/Gramo
P1	<5,00E + 01	B1	1,80E + 05
P2	<5,00E + 01	B2	1,18E + 06
P3	3,20E + 02	B3	2,05E + 05
P4	3,20E + 02	B4	7,25E + 06
P5	<5,00E + 01	B5	3,20E + 05
P6	<5,00E + 01	B6	1,40E + 07
P7	9,10E + 01	B7	5,80E + 05
P8	<5,00E + 01	B8	3,00E + 05
P9	5,00E + 01	B9	9,60E + 06
P10	<5,00E + 01	B10	4,40E + 06
P11	<5,00E + 01	B11	2,94E + 06
P12	8,40E + 02	B12	4,81E + 06
P13	<5,00E + 01	B13	5,83E + 06
P14	<5,00E + 01	B14	2,82E + 06
P15	<5,00E + 01	B15	9,63E + 06
PROM*	1,41E + 02	PROM	4,27E+ 06
Reducción de CFU frente a Control 3,02E + 04			
< = CFU por debajo del nivel de detección			
Sin Crecimiento en las Placas			
*Sin prom verdadero ya que < # real			

Ejemplo 19

Descolonización Nasal *In Vivo* de MRSA

10 El transporte tanto de MSSA como de MRSA en las fosas nasales anteriores humanas es el reservorio principal para la infección por *S. aureus*. Los estudios han mostrado que aproximadamente el 80% de la población podría estar colonizada nasalmente por *S. aureus*, y que la colonización puede ser un factor de riesgo incrementado para

desarrollar otras infecciones por *S. aureus* más graves (Kluytmans, J., A. van Belkum (1997) Clin Microbiol Rev 10(3):505-520). De hecho, la evaluación de la colonización nasal se está instaurando en la admisión en entornos de cuidado crítico en hospitales en los EEUU. La eliminación del transporte nasal en la comunidad o en el entorno hospitalario podría reducir así posiblemente el riesgo de infección y ralentizar la diseminación de *S. aureus* resistentes a fármacos. Para estudiar la capacidad de la lisina de *S. suis* para reducir la colonización por MRSA de la mucosa nasal, se inocularon intranasalmente a ratones C57BL/6J $\sim 2 \times 10^7$ de una cepa de MRSA resistente espontáneamente a estreptomycin (191-SMR). Veinticuatro horas después de la infección, se administraron a los ratones tres dosis (1mg) cada hora bien de disolución salina tamponada con fosfato (control), o lisina PlySs en los conductos nasales. Una hora después del último tratamiento, los ratones se sacrifican y las colonias bacterianas se enumeraron en agar Spectra MRSA (un medio cromogénico selectivo desarrollado para detectar diagnósticamente la colonización nasal por MRSA) y agar sangre Columbia. Se realizan tres experimentos independientes para evaluar al menos 10 ratones para cada grupo de tratamiento. Se determina una reducción significativa en la CFU media en la mucosa nasal después del tratamiento con la lisina de *S. suis*.

Referencias

1. Beres, S.B., J.M. Musser. *Contribution of Exogenous Genetic Elements to the Group A Streptococcus Metagenome*. PLoS ONE, 2007. **2**(8):1-14.
2. Cantin, M., J. Harel, R. Higgins, M. Gottschalk. *Antimicrobial resistance patterns and plasmid profiles of Streptococcus suis isolates*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1992. **4**:170-174.
3. Fischetti, V.A. *Bacteriophage lysins as effective antibacterials*. Current Opinion in Microbiology, 2008. **11**:393-400.
4. Nelson, D., L. Loomis, V.A. Fischetti. *Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**:4107-4112.
5. Srisikandan, S., J.D. Slater, *Invasive Disease and Toxic Shock due to Zoonotic Streptococcus suis: An Emerging Infection in the East?* PLoS Medicine, 2006. **3**(5):585-587.
6. Wang, I.N., D.L. Smith, R. Young, *Holins: the protein clocks of bacteriophage infections*. Annual Review of Microbiology, 2000. **54**:799-825.

Ejemplo 20

La Lisina PlySs2 de Bacteriófago con una Amplia Actividad Lítica Protege frente a una Infección Mixta con *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina y *Streptococcus pyogenes*

Staphylococcus aureus resistente a meticilina (MRSA) y *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A - GrAS) causan varias enfermedades infecciosas en los seres humanos. Estos patógenos bacterianos están entre muchos patógenos Gram-positivos que han establecido resistencia frente a antibióticos líderes. Existe una necesidad de terapias alternativas para combatir a estos agentes infecciosos. Hemos desarrollado una nueva lisina de bacteriófago (fago) con actividad frente a MRSA, *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina, *Streptococcus suis*, *Listeria*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus agalactiae*, *S. pyogenes*, *Streptococcus sanguinis*, estreptococos del grupo G, estreptococos del grupo E, y *S. pneumoniae*. Esta lisina de fago de *S. suis* se denominó PlySs2. Consistente con las lisinas exógenas previas, PlySs2 no presentó actividad frente a ninguna bacteria Gram-negativa (p. ej., *Escherichia*, *Bacillus*, o *Pseudomonas*). PlySs2 tiene un dominio de aminopeptidasa cisteína histidina (CHAP) N-terminal, y un dominio de unión SH3b C-terminal. PlySs2 es estable a 50°C durante 30 min, 37°C durante 24 horas, 4°C durante 15 días, y -80°C durante > 8 meses. Mantiene una actividad completa después de 10 congelaciones-descongelaciones. A 128 µg/ml, PlySs2 fue capaz de reducir las unidades formadoras de colonias (CFU) de MRSA y *S. pyogenes* en 5 logs y 3 logs, respectivamente. La concentración inhibidora mínima (MIC) de PlySs2 fue 16 µg/ml para MRSA. Una única dosis de 2 mg de PlySs2 protegió a 22 de 24 ratones en un modelo de septicemia en ratón frente a una infección mixta de MRSA y *S. pyogenes*. Después de una exposición creciente de forma seriada a PlySs2, ni MRSA ni *S. pyogenes* establecieron resistencia a PlySs2 como MRSA hizo con mupirocina. Ninguna lisina ha mostrado esta actividad lítica efectiva amplia; estabilidad; y eficacia frente a patógenos bacterianos humanos principales. PlySs2 es un agente terapéutico prometedor para MRSA, *S. pyogenes*, y muchos otros patógenos sin incidencia de resistencia.

Hay muchos patógenos Gram-positivos que causan enfermedades e infecciones en todo el mundo, incluyendo: *S. pyogenes*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *Listeria*, y otros. Causan una variedad de enfermedades, y hay límites para los tratamientos actuales.

Más del 30% de la población humana puede estar colonizada con *Streptococcus pyogenes* en el tracto respiratorio superior - el único sitio conocido de colonización benigna [1]. Es mucho menos probable que los individuos colonizados transmitan la enfermedad respecto a las personas gravemente enfermas [1]. *S. pyogenes* (estreptococos del grupo A - GrAS), infecta anualmente a más de 750 millones de personas [2-4]. Cada año, hay una tasa de mortalidad del 25% entre los ≈ 650.000 casos que progresan a infección grave [2]. *S. pyogenes* causa

faringitis en el tracto respiratorio superior, e impétigo en la piel de huéspedes humanos [5]. Fiebre escarlata, erisipelas, celulitis, fascitis necrosante, y síndrome de choque tóxico y otras enfermedades surgen de la infección por *S. pyogenes*. Las tasas de mortalidad pueden ser muy altas para estas infecciones, incluyendo el 20% para fascitis necrosante, y el 50% para el síndrome de choque tóxico [6]. La fiebre reumática, glomerulonefritis aguda, y formas del trastorno obsesivo compulsivo son secuelas no supurativas asociadas con un *S. pyogenes* [7]. Los brotes de fiebre reumática se han elevado en todo el mundo desde los años 80 [8]. Aunque es raro, la fiebre reumática puede progresar a enfermedad grave si entra profundamente en el tejido blando [4].

De todos los patógenos Gram-positivos, *Staphylococcus aureus* se ha convertido en el más difícil de tratar. *S. aureus* es un anaerobio facultativo Gram-positivo que causa la mayor parte de las infecciones por *Staphylococcus* en el hombre. Las fosas nasales anteriores humanas (orificios nasales) son típicamente los sitios primarios de la colonización de *S. aureus*, junto con otras aberturas húmedas del cuerpo que sirven como sitios de entrada adicionales [9-12]. *S. aureus* causa frecuentemente infecciones secundarias graves en individuos inmunocomprometidos, así como causa enfermedades en individuos por lo demás sanos. Además de las infecciones en la piel y el tejido blando (SSTI), puede causar sepsis, síndrome de choque tóxico, y neumonía necrosante, fascitis necrosante, y piomiositis, endocarditis, e impétigo. Estas infecciones se tratan habitualmente con meticilina, mupirocina, o vancomicina.

Muchas cepas de *S. aureus*, tales como *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA), han desarrollado resistencia a uno o más de los antibióticos usados como tratamiento estándar [13], haciendo que su tratamiento sea aún más difícil con los antimicrobianos disponibles [13]. El patógeno causante para numerosas infecciones nosocomiales, MRSA, representa más del 50% de los aislados hospitalarios de *S. aureus* causando neumonía y septicemia [14]. Exacerbando más el problema, MRSA se transmite fácilmente entre los pacientes en los hospitales [15]. Casi la mitad de todos los casos de bacteremia en las unidades de cuidado intensivo están causados por MRSA teniendo una tasa de mortalidad del 30-40% [16, 17]. Es la causa principal de infecciones en el tracto respiratorio inferior, infecciones en el sitio quirúrgico, y ≈ 19.000 muertes/año en los EEUU solo [14, 18].

Aunque MRSA asociado a la atención médica infecta a los pacientes susceptibles, las infecciones por MRSA asociado a la comunidad (CA-MRSA) surgen en individuos sanos [19, 20]. Las cepas de CA-MRSA parecen ser más virulentas y contagiosas que las cepas tradicionales de MRSA en los seres humanos y modelos animales, causando enfermedades más graves [21-24]. Distintas cepas de CA-MRSA son epidémicas en Europa, América del Norte, Oceanía, y otras regiones [20, 25, 26]. La cepa MW2 (tipo de campo pulsado USA400) es la CA-MRSA prototípica, habiendo contribuido al brote incipiente de CA-MRSA en los EEUU, dando lugar así a una epidemia [19, 27].

Un estreptococo beta-hemolítico Gram-positivo, *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del Grupo B - GBS) contiene una cápsula antifagocítica como su principal factor de virulencia [28, 29]. *S. agalactiae* puede existir en el sistema gastrointestinal humano, colonizando ocasionalmente sitios secundarios como la vagina en más del 33% de las mujeres [30, 31]. La *S. agalactiae* colonizadora puede infectar a un neonato durante el nacimiento resultando en septicemia bacteriana, haciendo que *S. agalactiae* de inicio temprano sea la causa principal de muerte en recién nacidos durante más de 4 décadas [32-34],[35]. El estándar de práctica actual expone a la madre a antibióticos que aumentan la probabilidad de resistencia.

Un brote reciente de patógenos Gram-positivos implica a *Listeria*, y ha matado a 29 en los Estados Unidos desde julio a noviembre de 2011 - el brote de enfermedad transmitida por alimentos más mortal en los EEUU desde los años 70 [36]. La mayor parte de los individuos contraen listeriosis después del consumo de alimento contaminado, enfrentándose a una tasa de mortalidad del 20-30%, incluso con terapia de antibióticos [37, 38]. *Listeria* sobrevive bien en los sistemas de procesamiento de alimentos y en el tracto gastrointestinal humano, ajustándose fácilmente a cambios rápidos del pH, salinidad, y temperatura [37, 39, 40].

Hay muchos otros patógenos humanos Gram-positivos, incluyendo: *Streptococcus sanguinis* (placa y caries dental); *S. sanguinis* (endocarditis); *Streptococcus* del Grupo G; *Streptococcus* del Grupo E; y *S. pneumococcus* (neumonía, otitis media, meningitis, bacteremia, sepsis, endocarditis, peritonitis, y celulitis).

Los patógenos zoonóticos Gram-positivos incluyen: *Streptococcus equi* (adenitis equina - una infección del tracto respiratorio superior - en equinos, p. ej., caballos); y *Streptococcus suis* (sepsis y meningitis en cerdos y seres humanos). La cepa patogénica de *S. suis* de serotipo 9 7997 se ha asociado con reportes crecientes de transmisión zoonótica de cerdos a seres humanos [41]. Los seres humanos y los cerdos se han tratado con penicilina o gentamicina, pero existen aislados de *S. suis* resistentes a estos antibióticos [42]. *S. suis* puede desarrollar una presencia consistente en poblaciones humanas en los años venideros.

Ha habido un incremento agudo en la resistencia a antibióticos entre todos estos microbios Gram-positivos. Por lo tanto, deben desarrollarse terapias alternativas para tratar a los patógenos bacterianos. Las nuevas fuentes de antimicrobianos incluyen antibióticos basados en enzimas ("enzibióticos") tales como las enzimas líticas de fagos (también conocidas como endolisinas o "lisinas").

Las lisinas han obtenido mucha atención recientemente como nuevos agentes antibacterianos (revisado en [18, 43,

44)). Después de que los virus bacteriófagos se replican en el interior de un huésped, su progenie debe escapar. El fago codifica tanto holinas que abren un poro en la membrana bacteriana como hidrolasas de peptidoglicanos denominadas lisinas que rompen los enlaces en la pared bacteriana [45]. Como las bacterias Gram-positivas son hipotónicas respecto a su alrededor, la disrupción de la pared celular da lugar a la lisis osmótica de la bacteria y a la liberación de la progenie viral [18]. Estas hidrolasas de peptidoglicano (que catalizan una variedad de uniones específicas) están codificadas por prácticamente todos los fagos con ADN bicatenario.

Las lisinas pueden clonarse a partir de secuencias de profagos virales en genomas bacterianos, expresarse recombinantemente en *Escherichia coli*, purificarse, y usarse para tratamiento [46]. Cuando se aplican exógenamente, estas proteínas son capaces de acceder a los enlaces de la pared celular de una bacteria Gram-positiva, al ser el peptidoglicano de estas especies continuo con el espacio extracelular [18]. Las lisinas matan a las bacterias más rápidamente que cualesquiera compuestos biológicos que no son agentes químicos [47-49].

Se ha mostrado que las lisinas demuestran una actividad letal alta frente a numerosos patógenos Gram-positivos - generalmente, especies que infecta el fago codificador u organismos relacionados de cerca [18, 47]. Habiéndose propuesto como agentes *enzibióticos* potenciales, las lisinas son notables por la potencia y especificidad que demuestran frente a bacterias particulares [47, 48, 50, 51]. Como tales, deberían tener un efecto menos dramático sobre la flora no patogénica normal en el huésped que los antibióticos con un espectro de acción más amplio [18]. Hasta la fecha, ninguna lisina ha mostrado una actividad amplia *in vivo* frente a múltiples especies de patógenos bacterianos.

Se han desarrollado lisinas frente a MRSA, incluyendo ClyS (una lisina química específica estafilococal desarrollada previamente en nuestro laboratorio) [50]. Las lisinas han evolucionado en los virus en una lucha evolutiva para infectar bacterias durante billones de años. Por lo tanto, hay una presión selectiva para ellos para elegir una característica que sea esencial para la función normal de las bacterias - y así, que sea improbable que se altere.

Previamente, se han aislado y estudiado dos fagos que infectan a *S. suis*. Harel et al. indujeron un profago sifoviral del genoma de una cepa de serotipo 2 89-999, aunque la identidad de su lisina permanece sin determinar [52]. Más recientemente, Ma y Lu aislaron un fago lítico de frotis nasales de cerdos sanos, secuenciando su genoma de 36 kb [53]. Este fago, denominado SMP, demostró un rango de huéspedes limitado, infectando solo 2/24 cepas de *S. suis* en el serotipo 2. El mismo grupo posteriormente clonó por PCR y expresó recombinantemente la lisina SMP (LySMP); la enzima demostró una actividad bacteriolítica *in vitro* frente a varios serotipos de *S. suis*. LySMP, como una proteína recombinante, no se plegó apropiadamente por sí misma y solo fue activa en presencia de agentes reductores, lo que puede limitar su potencial para ensayos *in vivo* [54].

Hay más de 11 genomas completados de *S. suis* en la base de datos NCBI. Las secuencias de las cepas de *S. suis* se analizaron para identificar lisinas de fagos candidatas potenciales en regiones de los profagos y una nueva lisina de fago de *S. suis* (denominada PlySs2) se identificó, aisló, clonó y caracterizó finalmente (véanse los Ejemplos anteriores). Ahora se proporciona una caracterización adicional incluyendo la actividad aguda de PlySs2 frente a MRSA y *S. pyogenes*.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas. Todas las cepas se almacenaron a -80°C (Tabla 6). Las cepas de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* spp. se cultivaron en medio de infusión de corazón cerebro (BHI). *Escherichia coli* se creció en medio de Luria Bertain (LB). Todos los medios se adquirieron en Becton, Dickinson, and Company (Sparks, MD), a no ser que se afirme otra cosa. Las bacterias se mantuvieron a 37°C. Los cultivos de toda la noche se crecieron a 37°C, y se agitaron a 200 rpm, si era necesario.

Tabla 6

Listado de Cepas					
Organismo	Serotipo	Cepa	ATCC	Fuente ^a	Notas
<i>Streptococcus</i> del Grupo E	2	K131	123191	1	
<i>Streptococcus suis</i>	9	7997		6	
<i>Streptococcus sobrinus</i>		6715		1	

ES 2 682 670 T3

Listado de Cepas					
Organismo	Serotipo	Cepa	ATCC	Fuente ^a	Notas
<i>Streptococcus sanguinis</i>			10556	1	
<i>Streptococcus rattus</i>		BHT		1	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	M6	D471		1	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	MΔ	D471		1	mutante JRS75
<i>Streptococcus pyogenes</i>	M6	10394		1	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	M49	NZ131		1	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	M4			1	resistente estreptomicina mucoide a -
<i>Streptococcus pyogenes</i>	M3	315		1	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	M18	8232		1	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	M1	SF370		1	fago 159-1 KO - mucoide
<i>Streptococcus pyogenes</i>	M1	SF370		1	fago 159-1 KO
<i>Streptococcus pyogenes</i>	M1	SF370		1	mucoide
<i>Streptococcus pyogenes</i>	M1	SF370		1	mucoide
<i>Streptococcus</i>	M1	SF370		1	
<i>pyogenes</i>					
<i>Streptococcus pyogenes</i>	M1	5005		1	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	9V	DCC1335		1	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6	DCC1850		1	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	15	DCC1476		1	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	11			1	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>				1	mutante Lyt 4-4
<i>Streptococcus oralis</i>		35037		1	
<i>Streptococcus mutans</i>		U159		1	
<i>Streptococcus gordonii</i>			10558	1	

Listado de Cepas					
Organismo	Serotipo	Cepa	ATCC	Fuente ^a	Notas
<i>Streptococcus equi</i>			9528	1	
<i>Streptococcus equi zoo</i>			700400	1	
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>				1	Estreptococos del Grupo G
<i>Streptococcus dysgalactiae equisimilis</i>		26RP66		1	Estreptococos del Grupo C
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Tipo II			1	Estreptococos del Grupo B
<i>Streptococcus agalactiae</i>		090R		1	Estreptococos del Grupo B
<i>Staphylococcus simulans</i>				2	TNK3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		HER 1292		3	
<i>Staphylococcus aureus</i>				4	resistencia intermedia a vancomicina IV
<i>Staphylococcus aureus</i>				4	resistencia intermedia a vancomicina III
<i>Staphylococcus aureus</i>		RN4220		1	
<i>Staphylococcus aureus</i>		Newman		2	sensible a meticilina - mutante LyrA
<i>Staphylococcus aureus</i>		Newman		2	sensible a meticilina
<i>Staphylococcus aureus</i>		MW2		5	resistente a meticilina -
<i>Staphylococcus aureus</i>					adquirido en comunidad
<i>Staphylococcus aureus</i>		192		1	resistente a meticilina
<i>Staphylococcus aureus</i>				1	resistente a meticilina del paciente DS
<i>Staphylococcus aureus</i>				1	altamente resistente a mupirocina
<i>Staphylococcus aureus</i>				1	D712 - resistente a daptomicina
<i>Staphylococcus aureus</i>				1	0325 - resistente a daptomicina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		RS1		1	

Listado de Cepas					
Organismo	Serotipo	Cepa	ATCC	Fuente ^a	Notas
<i>Listeria monocytogenes</i>		HER 1184		1	
<i>Listeria monocytogenes</i>	4b	N3013		1	
<i>Listeria monocytogenes</i>	3b	FSLJ 1		1	
<i>Listeria monocytogenes</i>				1	RS823
<i>Listeria monocytogenes</i>				1	RS820
<i>Listeria monocytogenes</i>		HER1083		1	
<i>Listeria monocytogenes</i>			BAA-680	1	
<i>Escherichia coli</i>		Top10		1	
<i>Enterococcus faecium</i>				1	EFSK-2
<i>Enterococcus faecalis</i>		V583		1	
<i>Bacillus thuringiensis</i>		HD-73		1	
<i>Bacillus subtilis</i>		SL4		1	
<i>Bacillus cereus</i>		14579		1	
<i>Bacillus anthracis</i>		Δ sterne		1	

^a 1, The Rockefeller University Collection; 2, Olaf Schneewind, Universidad de Chicago, Chicago, IL; 3, Barry Kreiswirth, Public Health Research Institute, Nueva Jersey; 4, Alexander Tomasz, The Rockefeller University; 5, ATCC; 6, Jaap A. Wagenaar, Universidad de Utrecht, Utrecht, Holanda.

5 **Estudios de CFU.** Se resuspendieron bacterias en fase logarítmica en tampón A hasta una DO_{600} de 0,1 (= 0,5 McFarland $\approx 10^8$ CFU/ml). Se añadió PlySs2 a 128 $\mu\text{g/ml}$ a placas de microtitulación de polipropileno (Costar) en triplicado para cada organismo de ensayo. Las placas se sellaron y se incubaron a 37°C con agitación cada 5 minutos durante 1 hora. Después de 1 hora de incubación, las células se diluyeron de forma seriada en incrementos de 10 veces y se sembraron en placas en BHI. Los controles en triplicado para cada cepa se realizaron con tampón B reemplazando a PlySs2.

10 **Estudios de MIC.** Se siguió el protocolo de Wiegand, et al. para determinar las concentraciones inhibitoras mínimas con los ajustes detallados más adelante [57]. Una suspensión final de $\approx 5 \times 10^5$ células/ml en MHB (o BHI para *S. pyogenes*) se obtuvo después de añadir lisina o vehículo esterilizado por filtración a la concentración apropiada [57]. Estos ensayos se distribuyeron en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Las MIC se determinaron en este experimento, por la detección de formación de sedimento en la parte inferior de los pocillos redondeados de una placa de poliestireno. También se corroboraron colorimétricamente con alamarBlue®.

15 **Modelo murino in vivo.** El Comité Institucional de Cuidado y Uso Animal de la Rockefeller University aprobó todos los protocolos in vivo. Se usó un modelo de infección sistémica descrito en Daniel, A. et al., para ensayar la eficacia in vivo de PlySs2 frente a múltiples bacterias gram-positivas [50]. Brevemente, se obtuvieron ratones FVB/NJ hembras de 4-5 semanas de edad (intervalo de peso 15 a 20 g) de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Después de un periodo de aclimatación, se inyectaron a los ratones por vía intraperitoneal (IP) 0,5 ml de bacterias en fase semi logarítmica (DO_{600} 0,5) diluidas con mucina gástrica de cerdo al 5% (Sigma) en disolución salina. Las suspensiones bacterianas contenían $\sim 5 \times 10^5$ CFU/ml de MW2, una cepa de MRSA que codifica la toxina PVL, $\sim 1 \times 10^7$ de MGAS5005, un serotipo M1 de *Streptococcus pyogenes* que es virulenta en los seres humanos y los

ratones (Musser), o una combinación de ambas bacterias simultáneamente a las concentraciones anteriores para los experimentos de infección mixta. Las titulaciones reales de la inoculación bacteriana se calcularon por dilución seriada y siembra en placas de agar sangre Columbia para cada experimento. Los ratones se volvieron bacterémicos en una a tres horas y contenían MRSA y/o *S. pyogenes* en sus órganos (incluyendo el bazo, hígado, riñón, y corazón/sangre) ([50], y observaciones no publicadas). Tres horas después de la infección, los animales se dividieron en 4 a 5 grupos de tratamiento y se les administraron por vía intraperitoneal 0,5 ml bien de tampón fosfato 20 mM, 2 mg/ml de la lisina estreptococal PlyC [59], 2 mg/ml de ClyS [50], 2-4 mg/ml de PlySs2, o una combinación de 2 mg/ml de PlyC y 2 mg/ml de ClyS. La tasa de supervivencia para cada grupo experimental se monitorizó cada 12 horas para las primeras 24 horas y después cada 24 horas hasta 10 días después de la infección. Los datos se analizaron estadísticamente por las curvas de Supervivencia de Kaplan Meier y un ensayo de rango logarítmico para intervalos de confianza del 95% usando el programa informático Prism (GraphPad Software; La Jolla, CA).

Resultados

Actividad lítica amplia de PlySs2.

Todas las cepas de *S. aureus* ensayadas fueron altamente susceptibles a la lisis por PlySs2 (Figura 25). Esto incluye cepas resistentes a metilicina, vancomicina, daptomicina, mupirocina, y lisostafina. La actividad de PlySs2 frente a *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (VISA) y cepas Newman fue menos severa que frente a otras cepas, pero no obstante fue robusta. Además de *aureus*, otras especies de *Staphylococcus* (*epidermidis* y *simulans*) también fueron sensibles. PlySs2 presentó una actividad convencional frente a su especie nativa, *S. suis*. Dos cepas de *Listeria* presentaron una lisis significativa por PlySs2, pero otras cepas de *Listeria* fueron insensibles al tratamiento con PlySs2. En un grado menor, PlySs2 tuvo actividad frente a *S. equi zoo*, *S. equi*, *S. agalactiae* Tipo II (encapsulada), y *S. agalactiae* 090R. Debe indicarse que PlySs2 también presentó actividad frente a todas las cepas de *S. pyogenes*. Esto incluyó los serotipos M1, M3, M4, M6, M18, M49, y una variante sin proteína M. Las cepas no encapsuladas, encapsuladas, y mucoides de *S. pyogenes* presentaron todas una susceptibilidad comparable a PlySs2.

Hubo varias especies que presentaron menos lisis que las anteriores. Fueron *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus* grupo G, *Streptococcus* grupo E, *Enterococcus faecalis*, y una cepa de *S. pneumococcus*. *S. gordonii* fue el único comensal frente al que PlySs2 tuvo una actividad sustancial. La membrana externa que rodea el peptidoglicano de las Gram-negativas evitó que PlySs2 presentara actividad frente a *Escherichia*, *Bacillus*, o *Pseudomonas*, como se esperaba.

La actividad de PlySs2 se comparó con la de ClyS en un ensayo paralelo simultáneo usando el mismo lote de células (datos no mostrados). La actividad de cada una fue comparable, pero PlySs2 es mucho más manejable; continuamos el seguimiento de PlySs2 como un agente terapéutico frente a MRSA. Clásicamente, una lisina de fago demuestra una disminución importante de la actividad frente a especímenes fuera de su especie huésped. Aquí, sin embargo, se observó un intervalo amplio de susceptibilidad entre bacterias distintas de *S. suis*, algunas de ellas demostrando más sensibilidad que *S. suis*.

Eficacia de PlySs2 frente a patógenos Gram-positivos.

PlySs2 presentó una actividad significativa en la reducción del número de *L. monocytogenes*, *S. agalactiae*, *S. aureus*, y *S. pyogenes* (Figura 26). Redujo todas las cepas ensayadas de *S. agalactiae* y *L. monocytogenes* más que *S. pyogenes* 5005. El control negativo *E. coli* no se redujo en número después del tratamiento con PlySs2.

MIC de PlySs2 para patógenos.

La MIC de PlySs2 fue relativamente baja para *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Figura 27). *S. pyogenes* y *S. agalactiae* registraron MIC similares de PlySs2. La MIC para el control negativo *E. coli* fue demasiado alta para calcularla.

Modelo de septicemia murina mixta con MRSA y *S. pyogenes*.

Para determinar si la actividad lítica amplia de PlySs2 podía proporcionar una protección in vivo frente a una infección con patógenos gram-positivos, bien solos o como una infección mixta, se inyectaron a ratones FVB/NJ por vía intraperitoneal $\sim 5 \times 10^5$ CFU de la cepa de MRSA MW2, $\sim 1 \times 10^7$ de la cepa de *S. pyogenes* MGAS5005 y/o ambas bacterias simultáneamente a las concentraciones anteriores. Tres horas después, los ratones se dividieron en 5 grupos de tratamiento y se les inyectó IP bien tampón fosfato 20mM, 1mg de la lisina estafilococal control; ClyS, 1 mg de la lisina estreptococal control; PlyC, 1 mg de ClyS + 1 mg de PlyC, o PlySs2 (1 mg para las infecciones con MRSA o 2 mg para las infecciones estreptococales y mixtas, respectivamente). Los ratones se monitorizaron entonces para determinar la supervivencia durante diez días. Los resultados de 4 experimentos independientes se combinaron y los datos de supervivencia de los ratones se representaron gráficamente con una curva de Supervivencia de Kaplan Meier (Figura 28).

En veinticuatro horas después de la infección con MRSA solo, 17/18 de los ratones del control de tampón y 10/12 de los ratones tratados con la lisina estreptococal PlyC murieron de sepsis bacteriana en sus órganos (incluyendo el

bazo, hígado, riñón, y corazón/sangre). Solo 2/18 de los ratones tratados con PlySs2 murieron a las cuarenta y ocho horas, el resto de los ratones tratados con PlySs2 sobrevivieron durante el curso de 10 días de los experimentos con resultados en los ratones comparables con la lisina específica estafilococal: ClyS (24/28, 86%) frente a PlySs2 (16/18, 88%) (Figura 28A).

- 5 Los ratones infectados con *S. pyogenes* solo tendieron a sucumbir a una tasa más lenta, 14/15 de los ratones tratados con tampón y 12/12 de los ratones tratados con la lisina específica estafilococal ClyS murieron sobre el día tres y cuatro, respectivamente. Por el contrario, solo 1/16 de los ratones tratados con PlySs2 murieron en el día tres, el resto sobrevivió (15/16, 94%) para proporcionar resultados comparables a la lisina específica estreptococal PlyC (12/12, 100%) (Figura 28B). Para simular una infección bacteriana mixta, se inyectó a los ratones IP una mezcla
10 tanto de MRSA como de *S. pyogenes* de los inóculos bacterianos anteriores. El tratamiento con tampón o los controles de única lisina específica no prolongó significativamente la supervivencia de los ratones. Una mayoría de los ratones tratados con PlyC (15/18) y tampón (21/23) murieron en 24 y 48 horas, respectivamente (Figura 28C). Aunque los animales con la infección mixta tratados con ClyS sucumbieron más lentamente, con 14/16 muertos sobre el día 4, de forma similar a los ratones infectados solo con *S. pyogenes*. A diferencia de los controles, la
15 mayoría de los ratones tratados con PlySs2 sobrevivieron a la infección mixta (22/24, 92%) y fue comparable, si no mejor, con los ratones tratados con ClyS + PlyC al mismo tiempo (16/20, 80%) (Figura 28C).

PlySs2 Demuestra una Letalidad Rápida Frente a Antibióticos en Cepas de MRSA

- Varias cepas de MRSA (Cepa 245, 223, 926 y 932), que demuestran todos valores similares de MIC (aprox 32 µg/ml) para PlySs2, se ensayaron para log de letalidad por comparación directa entre PlySs2 y el antibiótico
20 vancomicina (1µg/ml). Se crecen cultivos de aproximadamente 5×10^5 bacterias en medio MHB en tubos cónicos de 50 ml a 37°C con agitación a 225 rpm durante hasta 6 horas en combinación con PlySs2 sola, vancomicina sola, o sin aditivo. A varios puntos de tiempo (15 min, 30 min, 1 hr, 2 hr, 3 hr, 4 hr, 5 hr y 6 hr) se retiraron muestras de partes alicuotas (aprox 300µl). La enzima lítica o antibiótico se inactivan por la adición de una disolución de carbón a todas
25 las muestras de partes alicuotas. Las muestras se diluyen y se siembran en placas de agar para determinar los recuentos de células bacterianas viables. El Log de la reducción de CFU se representa en la Figura 29. PlySs2 proporciona una letalidad rápida y efectiva con una actividad aumentada frente al antibiótico de atención estándar vancomicina en todas las cepas de MRSA ensayadas y representadas.

Discusión

- En la presente memoria se demuestra que la nueva lisina nativa de *S. suis*, PlySs2, presenta una actividad lítica amplia frente a múltiples patógenos Gram-positivos incluyendo *S. pyogenes* y *S. aureus in vivo*. Esta lisina es la
30 primera en presentar dicha actividad promiscua; todas las lisinas caracterizadas previamente presentan actividad frente a un espectro más estrecho de especies [48, 50, 61-64]. Se ha mostrado que ClyS elimina infecciones septicémicas por MRSA [50], sin embargo, hasta la fecha, no se ha mostrado que ninguna lisina elimina más de una infección septicémica, y ninguna ha eliminado una infección mixta de ninguna clase. La capacidad de PlySs2 de
35 eliminar una infección mixta de estafilococos y estreptococos proviene de su actividad lítica amplia. Aunque la actividad *in vitro* de PlySs2 es más robusta frente a MRSA que a *S. pyogenes*, los datos *in vivo* proporcionados en la presente memoria demuestran su eficacia como un agente terapéutico efectivo frente a ambas bacterias. Esto puede deberse a diferencias en la estructura o composición de la pared celular de *S. aureus* comparado con la de *S. pyogenes* lo que afecta la accesibilidad del sustrato. Todos los patógenos Gram-positivos frente a los que PlySs2
40 tiene actividad han desarrollado resistencia frente a los antibióticos convencionales. Ni *S. pyogenes* ni MRSA fueron capaces de establecer resistencia a PlySs2.

- Una fortaleza de muchas lisinas (incluyendo PlySs2) es su especificidad. Los antibióticos actúan inespecíficamente, matando a los microbios comensales junto con el patógeno diana. Esto da como resultado muchos efectos secundarios negativos (p. ej., diarrea) y los antibióticos pueden permitir que los patógenos oportunistas (p. ej.,
45 *Clostridium difficile*) causen infecciones totalmente nuevas. Las lisinas pueden usarse para tratar a un único patógeno sin disrumpir la flora bacteriana completa [18]. La especificidad de muchas de las lisinas descritas previamente también puede ser una limitación ya que serían necesarias múltiples lisinas para tratar a múltiples patógenos. Nuestros descubrimientos proporcionan una única lisina que puede usarse para tratar a muchos patógenos mientras retiene un grado de especificidad. PlySs2 es activa frente a varios patógenos Gram-positivos
50 dejando a los Gram-negativos inalterados.

- PlySs2 puede servir como un tratamiento viable para infecciones causadas por *S. aureus* y/o *S. pyogenes* tales como: fiebre escarlata; erisipelas; celulitis; fascitis necrosante; endocarditis; bacteremia/sepsis; una variedad de SSTI que forman abscesos y que no forman abscesos; e impétigo. El tratamiento frente a septicemia neonatal y enfermedades transportadas por alimentos también es aplicable, porque presenta más actividad *in vitro* frente a *S. agalactiae* y *L. monocytogenes* de lo que lo hace frente a *S. pyogenes* 5005 (Figura 25-27).
55

Como una lisina, PlySs2 mata rápidamente a su diana, mucho más rápido que los antibióticos (Figura 29). PlySs2 solo tiene que ponerse en contacto con las uniones de la pared celular externa para mediar su efecto; los antibióticos convencionales deben permanecer a altas concentraciones durante un periodo prolongado, dando como resultado una multitud de efectos secundarios. Esta característica ha permitido que las lisinas de fagos traten

infecciones sistémicas en el pasado [48, 61]. Como se demuestra en la presente memoria, PlySs2 fue capaz de eliminar infecciones septicémicas por MRSA y *S. pyogenes* de un alto porcentaje de ratones usando una única dosis de PlySs2. Además, las infecciones septicémicas mixtas por MRSA y *S. pyogenes* se eliminaron del ~92% de los ratones con una única dosis de PlySs2 comparado con el ~4% de eliminación para los controles. Una letalidad o eliminación aumentada adicionalmente puede surgir de una dosificación incrementada o repetida.

PlySs2 es más manejable y estable que las lisinas desarrolladas previamente. La preparación de PlySs2 es directa, rindiendo grandes cantidades en pocas etapas. Además, una lisina altamente soluble es esencial, porque permite el uso directo a altas concentraciones. De forma importante, PlySs2 permanece soluble en concentraciones que superan los 20 mg/ml (datos no mostrados) lo que es órdenes de magnitud más concentrado que lo necesario para producir un cambio en la letalidad en forma de log de organismos diana en cuestión de minutos. PlySs2 también se comporta bien en una variedad de ensayos *in vitro* desarrollados para evaluar a las lisinas. Puede someterse a temperaturas altas o bajas durante periodos prolongados con un efecto pequeño en su actividad incluso cuando se congela-descongela repetidamente. La estabilidad de PlySs2 es altamente adecuada para la producción y distribución como un agente terapéutico.

La ausencia de efecto de DTT sobre la actividad de PlySs2 indica tanto que [1] la lisina no se basa en puentes disulfuro, como que [2] se plegó apropiadamente después de la expresión recombinante y la purificación. El último punto es significativo ya que LySMP tuvo que tratarse con agentes reductores antes de su uso [54]. La razón para esta discrepancia entre dos lisinas homólogas no está clara, aunque puede implicar a los numerosos residuos de cisteína variables entre las proteínas. La inhibición inducida por EDTA de PlySs2 sugiere que puede basarse en un catión divalente como un cofactor.

Previamente, se ha mostrado que dos lisinas tienen actividad lítica frente a varias especies, pero ninguna lisina se ensayó frente a más de una especie *in vivo* [65, 66] y cada lisina retuvo más actividad frente a la especie (*Enterococcus* o *B. anthracis*) a partir de la que se clonó, mientras PlySs2 tiene más actividad frente a *S. aureus* que frente a *S. suis*.

Consistente con su nueva actividad lítica amplia, PlySs2 representa una clase divergente de estructura de enzima lítica de profago. Los dominios CHAP están incluidos en varias lisinas de fago estreptococales [59, 67] y estafilococales [50, 68] caracterizadas previamente. A nivel de la secuencia primaria, sin embargo, el dominio CHAP de PlySs2 es bastante divergente de otros dominios CHAP presentes en bases de datos (todos los valores E por pares $> 10^{-15}$). En la Figura 30, el dominio CHAP de PlySs2 se alinea con el de la lisina estreptococal bien caracterizada PlyC, demostrando residuos catalíticos conservados, pero solo un nivel modesto de identidad global (28% de identidad de secuencia, valor E = 10^{-8}) [59].

Los dominios CHAP son catalíticamente diversos y pueden poseer actividad alanina-amidasa [47] o endopeptidasa de puente cruzado [50], dependiendo de la lisina particular. Además, la naturaleza molecular del puente cruzado del peptidoglicano en *S. suis* puede variar entre cepas [69]. El dominio CHAP media la actividad catalítica de PlySs2, pero puede no conferir completamente la especificidad. Se ha pensado que los dominios de unión de la lisina del fago determinan la especificidad de la lisina [70, 71]. La lisostafina contiene un dominio de unión semejante a SH3 que se une presumiblemente a los puentes cruzados en el peptidoglicano de la pared celular bacteriana [71]. Los dominios SH3 se observan comúnmente en proteínas de unión virales y de la pared celular bacteriana, aunque la diana molecular exacta sigue siendo desconocida [72]. Se ha mostrado que SH3b (homólogos bacterianos de los dominios SH3) se une a metales y polipéptidos [73, 74]. Se ha mostrado que un dominio SH3b de una endopeptidasa de *B. cereus* se une al grupo amino libre de la alanina N-terminal en el tallo del peptidoglicano [75] y este grupo amino es un posible sustrato para el dominio SH3b de PlySs2. El puente cruzado varía mucho entre todos los especímenes susceptibles a PlySs2, de manera que es una diana improbable para el dominio de unión SH3 de PlySs2. Estos puentes cruzados pueden adquirir variaciones dando lugar a resistencia a lisostafina, sin embargo, PlySs2 presentó de forma importante actividad frente a cepas de *S. aureus* tanto sensibles a lisostafina como resistentes a lisostafina (LyrA).

PlySs2 tiene actividad frente a dos órdenes filogenéticos distintos: Bacillales (*Staphylococcus*, *Listeria*, et al.) y Lactobacillales (*Streptococcus*, *Enterococcus*, et al.). Los tallos de peptidoglicano son similares entre estos dos órdenes, pero sus puentes cruzados varían ampliamente en composición y longitud [76, 77]. Las lisinas de fagos no han presentado previamente actividad en diferentes familias o géneros (y raramente en diferentes especies) [50]. Las lisinas de fagos nativos muestran habitualmente especificidad de especie frente a las especies que infecta el fago nativo [48, 61]. Todas las cepas de *S. aureus* ensayadas, incluyendo cepas resistentes a meticilina (MRSA), vancomicina (VISA), mupirocina, daptomicina, y lisostafina fueron susceptibles a la lisis inducida por PlySs2. PlySs2 lisó la *S. suis* 7997 patogénica con una eficacia similar. Mediante la lisis de solo 2 de 6 cepas ensayadas, la actividad de PlySs2 frente a *Listeria* fue menos determinante. La actividad de PlySs2 frente a *Staphylococcus simulans*, *Streptococcus equi zooepidemicus*, y *Staphylococcus equi* proporciona una evidencia adicional de que el sustrato para el dominio de unión existe fuera del puente cruzado. La cápsula de polisacárido alrededor de *S. agalactiae* aumenta su virulencia. La *S. agalactiae* de Tipo II tiene una cápsula más gruesa que la mayoría, y tiene un nivel correspondientemente mayor de virulencia [28]. Las cepas de *S. agalactiae* con una cápsula más fina son menos virulentas [29, 78]. PlySs2 tiene una actividad comparable frente a estas con y sin una cápsula: *S. agalactiae*_Tipo II, *S. agalactiae* 090R. Hay más de 200 M tipos para *S. pyogenes* [4]. De forma importante, PlySs2

tiene actividad frente a todos los tipos M frente a los que la ensayamos. La actividad de PlySs2 frente a *S. sanguinis* indica su potencial para tratar la placa dental. Aunque PlySs2 presenta actividad frente a *S. gordonii*, presenta menos actividad frente a los comensales *S. oralis*, y *S. mutans*. Hay una cantidad moderada de actividad frente a *Streptococcus* grupo G, *Streptococcus* grupo E, *E. faecalis*, *S. pneumoniae*, *S. rattus*, y *S. sobrinus*. Otras cepas de *S. pneumoniae* fueron menos susceptibles. La actividad de PlySs2 frente a una matriz de MRSA resistentes a múltiples fármacos, *S. pyogenes* encapsulada considerablemente, y numerosos otros patógenos virulentos la convierte en un candidato terapéutico crítico. De forma importante, PlySs2 fue capaz de reducir las CFU de varias cepas que variaron en resistencia a fármacos, encapsulación, y creación de biopelícula. La actividad de PlySs2 frente a *S. pyogenes* M4 mucoide fue más fuerte que la observada para cualquier otro *S. pyogenes* ensayado. Además, PlySs2 tenía una actividad mayor frente a *S. agalactiae* y *L. monocytogenes* que frente a *S. pyogenes* (de la que fue capaz de proteger a ratones septicémicos). Dada la eficacia de PlySs2 frente a *S. pyogenes*, PlySs2 puede servir como un agente terapéutico frente a cualquiera de estos otros patógenos. Los resultados de MIC confirmaron los descubrimientos de CFU.

En estudios murinos, los animales infectados individualmente demuestran que PlySs2 puede proteger independientemente frente a múltiples especies de infección bacteriana. En la infección mixta, los controles de lisina específica (PlyC y ClyS) muestran que PlySs2 está protegiendo a los ratones de ambos organismos en la infección mixta o doble. Usando bien PlyC o ClyS para tratar a solo uno de los patógenos infecciosos en el modelo mixto dio como resultado la muerte de los animales. Además, los animales mueren en el mismo marco de tiempo que los controles infectados individualmente no tratados. *S. aureus* y *S. pyogenes* causan enfermedades con patologías y sitios de infección similares en el hombre. Los profesionales sanitarios algunas veces no están seguros al principio de qué organismo está causando la enfermedad que podría ser una infección mixta en casos de trauma grave. Las infecciones invasivas graves por *S. pyogenes* no se tratan fácilmente con antibióticos [82]. En algunos casos, requieren procedimientos quirúrgicos [82]. El serotipo M1 usado en nuestro modelo septicémico es uno de los aislados clínicos principales que se ha encontrado que causan faringitis estreptococal y enfermedad invasiva en todo el mundo [83, 84]. *S. pyogenes* es capaz de atravesar las superficies epiteliales produciendo bacteremia invasiva [83]. Esta y otras infecciones internas graves dan como resultado la muerte en menos de una semana en el 19% de los casos [85]. En muchos casos, no se sabe si *S. aureus* o *S. pyogenes* es el patógeno causante que está detrás de SSTI o impétigo.

La incapacidad de las dianas patogénicas (MRSA y *S. pyogenes*) de establecer resistencia a PlySs2 es consistente con los descubrimientos para otras lisinas incluyendo PlyG [61]. Hasta la fecha, no se ha identificado una molécula que pueda degradar las lisinas exógenamente. Es improbable que un patógeno sea capaz de alterar fácilmente el sitio diana dada la naturaleza del peptidoglicano. La probabilidad extremadamente baja de resistencia hace que PlySs2 sea un agente terapéutico convincente. Típicamente, se proporcionan mupirocina y polisporina para tratar a *S. aureus*, pero puede desarrollar resistencia a cada una. Son los únicos anti-infectivos proporcionados para reducir a las bacterias patogénicas colonizadoras en las membranas mucosas [86]. PlySs2 puede usarse para eliminar profilácticamente los reservorios en la membrana mucosa humana de bacterias patogénicas resistentes a antibióticos. La penicilina puede usarse para tratar a *S. pyogenes*, que sigue siendo sumamente sensible; pero si el impétigo está causado por MRSA, la penicilina puede ser ineficaz.

Estudios recientes han indicado que las infecciones secundarias causadas por *S. pneumococcus*, *S. pyogenes*, y MRSA representan > 90% de las muertes de pandemias de influenza [92, 93]. Los mismos patógenos causaron complicaciones en casi el 30% de los casos pandémicos de H1N1 en 2010 [94]. El uso profiláctico podría disminuir la tasa de estas fatalidades. PlySs2 puede tratar infecciones primarias y disminuir profilácticamente la probabilidad de infecciones secundarias.

Antes de la identificación del patógeno, la atención estándar es tratar a los candidatos más probables dada la naturaleza y entorno de la infección [95, 96]. Muchos de estos patógenos, especialmente MRSA, desarrollan fácilmente resistencia a antibióticos tradicionales y nuevos, especialmente beta-lactamas. MRSA también es resistente a los agentes más nuevos, glicopéptidos, oxazolidinonas [97, 98]. PlySs2 tiene especificidad para Gram-positivas, pero podría tratar ampliamente a *S. pyogenes*, MRSA, y otros patógenos prominentes.

Como un tratamiento, PlySs2 estaría dirigida a patógenos, sin perjudicar a las Gram-negativas. Esta nueva capacidad se basa en el dominio CHAP divergente, y dominio de unión SH3 único. Los antibióticos matan a muchas especies además de al patógeno diana. Previamente, las lisinas solo podían usarse frente a una especie patogénica. PlySs2 ocupa un espacio vital en el espectro entre la rígida especificidad de las lisinas, y la actividad no selectiva de los antibióticos. Idealmente, un agente terapéutico tiene actividad frente a todos los patógenos principales sin afectar a los comensales; PlySs2 es la primera en indicar que una lisina puede servir para esa función. PlySs2 es una lisina con amplia actividad lítica frente a MRSA, VISA, *S. suis*, *Listeria*, *S. simulans*, *S. equi zoo*, *S. equi*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *Streptococcus* grupo G, *Streptococcus* grupo E, *E. faecalis*, y *S. pneumoniae*. PlySs2 es fácil de producir, manejable, y muy estable. PlySs2 protege a los ratones septicémicos de una infección mixta de MRSA y *S. pyogenes* y ninguno de estos patógenos fue capaz de desarrollar resistencia a PlySs2.

REFERENCIAS

1. Mandell, G.L., et al. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. [Book review (E-STREAMS)] 2005; 6º: [Disponibile en: e-streams.com/es0806_7/es0867_4196.html].
- 5 2. Carapetis, J.R., et al., *The global burden of group A streptococcal diseases*. The Lancet infectious diseases, 2005. **5**(11): p. 685-694.
3. Cunningham, M.W., *Pathogenesis of group A streptococcal infections*. Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(3): p. 470-511.
4. Bessen, D.E., et al., *Whole Genome Association Study on Tissue Tropism Phenotypes in Group A Streptococcus*. Journal of Bacteriology, 2011 p. JB. 05263- 11v1,
- 10 5. Parker, M.T., A J. Tomlinson, y R.E. Williams, *Impetigo contagiosa; the association of certain types of Staphylococcus aureus and of Streptococcus pyogenes with superficial skin infections*. J Hyg (Lond), 1955. **53**(4): p. 458-73.
6. Bisno, A.L., M.O. Brito, y CM. Collins, *Molecular basis of group A streptococcal virulence*. Lancet Infect Dis, 2003. **3**(4): p. 191-200.
- 15 7. Swedo, S.E., et al., *Identification of children with pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections by a marker associated with rheumatic fever*. Am J Psychiatry, 1997. **154**(1): p. 110-2.
8. Kavey, R. y E.L. Kaplan, *Resurgence of acute rheumatic fever*. Pediatrics, 1989. **84**(3): p. 585.
9. White, A y J. Smith, *Nasal Reservoir as the Source of Extranasal Staphylococci*. Antimicrob Agents Chemother (Bethesda), 1963. **161**: p. 679-83.
- 20 10. Kluytmans, J., A van Belkum, y H. Verbrugh, *Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks*. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(3): p. 505-20.
11. von Eiff, C, et al., *Nasal carriage as a source of Staphylococcus aureus bacteremia*. New England Journal of Medicine, 2001. **344**(1): p. 11-16.
12. Wertheim, H.F.L., et al., *The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections*. Lancet Infectious Diseases, 2005. **5**(12): p. 751-762.
- 25 13. Howden, B.P., et al., *Reduced vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications*. Clin Microbiol Rev, 2010. **23**(1): p. 99-139.
14. Klein, E., D.L. Smith, y R. Laxminarayan, *Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus, United States, 1999-2005*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(12): p. 1840-6.
- 30 15. Coates, T., R. Bax, y A Coates, *Nasal decolonization of Staphylococcus aureus with mupirocin: strengths, weaknesses and future prospects*. J Antimicrob Chemother, 2009. **64**(1): p. 9-15.
16. Tiemersma, E.W., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Europe, 1999n2002*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(9): p. 1627-34.
- 35 17. Laupland, K.B., T. Ross, y D.B. Gregson, *Staphylococcus aureus bloodstream infections: risk factors, outcomes, and the influence of methicillin resistance in Calgary, Canada, 2000n2006*. Journal of Infectious Diseases, 2008. **198**(3): p. 336.
18. Fischetti, V.A, *Bacteriophage lysins as effective antibacterials*. Curr Opin Microbiol, 2008. **11**(5): p. 393-400.
19. *From the Centers for Disease Control and Prevention. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus - - Minnesota and North Dakota, 1997-1999*. JAMA, 1999. **282**(12): p. 1123-5.
- 40 20. Herold, B.C., et al., *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in children with no identified predisposing risk*. JAMA: the journal of the American Medical Association, 1998. **279**(8): p. 593-598.
21. Adem, P.V., et al., *Staphylococcus aureus sepsis and the Waterhouse-Friderichsen syndrome in children*. N Engl J Med, 2005. **353**(12): p. 1245-51.
- 45 22. Miller, L.G., et al., *Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Los Angeles*. N Engl J Med, 2005. **352**(14): p. 1445-53.
23. Li, M., et al., *Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(14): p. 5883-8.

24. Voyich, J.M., et al., *Insights into mechanisms used by Staphylococcus aureus to avoid destruction by human neutrophils*. J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3907-19.
25. Vandenesch, F., et al., *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(8): p. 978-84.
- 5 26. Tristan, A, et al., *Global distribution of Panton- Valentine leukocidin--positive methicillin-resistant Staphylococcus aureus, 2006*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(4): p. 594-600.
27. Deleo, F.R., et al., *Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Lancet, 2010. **375**(9725): p. 1557-68.
28. Yeung, M. y S. Mattingly, *Biosynthetic capacity for type-specific antigen synthesis determines the virulence of serotype III strains of group B streptococci*. Infection and immunity, 1984. **44**(2): p. 217.
- 10 29. Rubens, C, et al., *Transposon mutagenesis of type III group B Streptococcus: correlation of capsule expression with virulence*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1987. **84**(20): p. 7208.
30. Boyer, K.M., et al., *Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease. II. Predictive value of prenatal cultures*. Journal of Infectious Diseases, 1983. **148**(5): p. 802.
- 15 31. Meyn, L.A., MA. Krohn, y S.L. Hillier, *Rectal colonization by group B Streptococcus as a predictor of vaginal colonization*. American journal of obstetrics and gynecology, 2009. **201**(1): p. 76. e1-76. e7.
32. Lancefield, R.C. y R. Hare, *The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic streptococci from parturient women*. The Journal of experimental medicine, 1935. **61**(3): p. 335.
- 20 33. Fry, R.M., *Prevention and Control of Puerperal Sepsis: Bacteriological Aspects*. Br Med J, 1938. **2**(4049): p. 340-2.
34. Hare, R. y L. Colebrook, *The biochemical reactions of hEmolytic streptococci from the vagina of febeile and afebeile parturient women*. The Journal of Pathology and Bacteriology, 1934. **39**(2): p. 429-442.
35. Zangwill, K., A. Schuchat, y J. Wenger, *Group B streptococcal disease in the United States, 1990: report from a multistate active surveillance system*. MMWR. CDC surveillance summaries: Morbidity and mortality weekly report. CDC surveillance summaries/Centers for Disease Control, 1992. **41**(6): p. 25.
- 25 36. Baertlein, L., *Death toll from listeria outbreak rises to 29*, C. Johnston, Editor 2011, Reuters.
37. Schuppler, M. y M.J. Loessner, *The Opportunistic Pathogen Listeria monocytogenes: Pathogenicity and Interaction with the Mucosal Immune System* Int J Inflam, 2010. **2010**: p. 704321.
38. Hof, H., K. Szabo, y B. Becker, *Epidemiology of listeriosis in Germany: a changing but ignored pattern*. Deutsche medizinische Wochenschrift (1946), 2007. **132**(24): p. 1343.
- 30 39. Ramaswamy, V., et al., *Listeria— review of epidemiology and pathogenesis*. J Microbiol Immunol Infect, 2007. **40**(1): p. 4-13.
40. Dieterich, G., et al., *LEGER: knowledge database and visualization tool for comparative genomics of pathogenic and non-pathogenic Listeria species*. Nucleic Acids Research, 2006. **34**(supl 1): p. D402.
- 35 41. Sriskandan, S. y J.D. Slater, *Invasive disease and toxic shock due to zoonotic Streptococcus suis: an emerging infection in the East?* PLoS Med, 2006. **3**(5): p. e187.
42. Cantin, M., et al., *Antimicrobial resistance patterns and plasmid profiles of Streptococcus suis isolates*. J Vet Diagn Invest, 1992. **4**(2): p. 170-4.
43. O'Flaherty, S., RP. Ross, y A Coffey, *Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria*. FEMS Microbiol Rev, 2009. **33**(4): p. 801-19.
- 40 44. Gonzalez Villa, T. y P. Veiga-Crespo, *Enzybiotics. antibiotic enzymes as drugs and therapeutics* 2010, Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, x, 284 p.
45. Wang, I.N., D.L. Smith, y R. Young, *Holins: the protein clocks of bacteriophage infections*. Annu Rev Mcrobiol, 2000. **54**: p. 799-825.
- 45 46. Beres, S.B. y J.M. Musser, *Contribution of exogenous genetic elements to the group A Streptococcus metagenome*. PLoS One, 2007. **2**(8): p. e800.
47. Nelson, D., L. Loomis, y V.A. Fischetti, *Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by*

- group *A streptococci* by using a bacteriophage lytic enzyme. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(7): p. 4107-12.
48. Loeffler, J.M., D. Nelson, y V.A. Fischetti, *Rapid killing of Streptococcus pneumoniae with a bacteriophage cell wall hydrolase*. Science, 2001. **294**(5549): p. 2170-2.
49. Fischetti, V.A., *Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives*. Trends Microbiol, 2005. **13**(10): p. 491-6.
- 5 50. Daniel, A, et al., *Synergism between a novel chimeric lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(4): p. 1603-12.
51. Cheng, Q., et al., *Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(1): p. 111-7.
- 10 52. Harel, J., et al., *Identification of an inducible bacteriophage in a virulent strain of Streptococcus suis serotype 2*. Infect Immun, 2003. **71**(10): p. 6104-8.
53. Ma, Y.L. y CP. Lu, *Isolation and identification of a bacteriophage capable of infecting Streptococcus suis type 2 strains*. Vet Microbiol, 2008. **132**(3-4): p. 340-7.
54. Wang, Y., J.H. Sun, y CP. Lu, *Purified recombinant phage lysin LySMP: an extensive spectrum of lytic activity for swine streptococci*. Curr Microbiol, 2009. **58**(6): p. 609-15.
- 15 55. Holden, M.T., et al., *Rapid evolution of virulence and drug resistance in the emerging zoonotic pathogen Streptococcus suis*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6072.
56. Chen, C, et al., *A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of S. suis 2 Chinese isolates*. PLoS One, 2007. **2**(3): p. e315.
- 20 57. Wiegand, I., K. Hilpert, y R.E. Hancock, *Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances*. Nat Protoc, 2008. **3**(2): p. 163-75.
58. Rouse, M.S., et al., *In vitro and in vivo evaluations of the activities of lauric acid monoester formulations against Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(8): p. 3187-91.
59. Nelson, D., et al., *PlyC: a multimeric bacteriophage lysin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(28): p. 10765-70.
- 25 60. Lucas, S., A Copeland, A. Lapidus, et al., *Sequencing of the draft genome and assembly of Streptococcus suis 89/1591*, en *Unpublished2004*.
61. Schuch, R., D. Nelson, y V. A Fischetti, *A bacteriolytic agent that detects and kills Bacillus anthracis*. Nature, 2002. **418**(6900): p. 884-9.
62. O'Flaherty, S., et al., *The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 2005. **187**(20): p. 7161-4.
- 30 63. Zimmer, M., et al., *The murein hydrolase of the bacteriophage phi3626 dual lysis system is active against all tested Clostridium perfringens strains*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(11): p. 5311-7.
64. Loessner, M.J., et al., *Three Bacillus cereus bacteriophage endolysins are unrelated but reveal high homology to cell wall hydrolases from different bacilli*. J Bacteriol, 1997. **179**(9): p. 2845-51.
- 35 65. Yoong, P., et al., *Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium*. J Bacteriol, 2004. **186**(14): p. 4808-12.
66. Yoong, P., et al., *PlyPH, a bacteriolytic enzyme with a broad pH range of activity and lytic action against Bacillus anthracis*. J Bacteriol, 2006. **188**(7): p. 2711-4.
- 40 67. Baker, J.R, et al., *Endopeptidase and glycosidase activities of the bacteriophage B30 lysin*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(10): p. 6825-8.
68. Becker, S.C., et al., *LysK CHAP endopeptidase domain is required for lysis of live staphylococcal cells*. FEMS Microbiol Lett, 2009. **294**(1): p. 52-60.
69. Kilpperbalz, R. y K.H. Schleifer, *Streptococcus-Suis Sp-Nov, Nom-Rev*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1987. **37**(2): p. 160-162.
- 45 70. Hermoso, J.A, et al., *Structural basis for selective recognition of pneumococcal cell wall by modular endolysin from phage Cp-1*. Structure, 2003. **11**(10): p. 1239-49.

71. Grundling, A y O. Schneewind, *Cross-linked peptidoglycan mediates lysostaphin binding to the cell wall envelope of Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 2006. **188**(7): p. 2463-72.
72. Xu, Q., et al., *Structural basis of murein peptide specificity of a gamma-D-glutamyl-L-diamino acid endopeptidase*. Structure, 2009. **17**(2): p. 303-13.
- 5 73. Pohl, E., R.K. Holmes, y W.G. Hoi, *Crystal structure of a cobalt-activated diphtheria toxin repressor-DNA complex reveals a metal-binding SH3-like domain*. J Mol Biol, 1999. **292**(3): p. 653-67.
74. Wylie, G.P., et al., *Prolylpeptide binding by the prokaryotic SH3-like domain of the diphtheria toxin repressor: a regulatory switch*. Biochemistry, 2005. **44**(1): p. 40-51.
- 10 75. Xu, Q., et al., *Structure of the gamma-D-glutamyl-L-diamino acid endopeptidase YkfC from Bacillus cereus in complex with L-Ala-gamma-D-Glu: insights into substrate recognition by NlpC/P60 cysteine peptidases*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2010. **66**(Pt 10): p. 1354-64.
76. Vollmer, W., D. Blanot, y M.A de Pedro, *Peptidoglycan structure and architecture*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(2): p. 149-67.
- 15 77. Schleifer, K.H. y O. Kandler, *Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications*. Bacteriol Rev, 1972. **36**(4): p. 407-77.
78. Wessels, M.R., et al., *Definition of a bacterial virulence factor: sialylation of the group B streptococcal capsule*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(22): p. 8983-7.
79. Robinson, J.M, J.K. Hardman, y G.L. Sloan, *Relationship between lysostaphin endopeptidase production and cell wall composition in Staphylococcus staphylolyticus*. J Bacteriol, 1979. **137**(3): p. 1158-64.
- 20 80. Gargis, S.R., et al., *Inhibition of the activity of both domains of lysostaphin through peptidoglycan modification by the lysostaphin immunity protein*. Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(20): p. 6944-6.
81. Rashel, M., et al., *Efficient elimination of multidrug-resistant Staphylococcus aureus by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11* J Infect Dis, 2007. **196**(8): p. 1237-47.
- 25 82. Young, M.H., D.M. Aronoff, y N.C. Engleberg, *Necrotizing fasciitis: pathogenesis and treatment*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2005. **3**(2): p. 279-94.
83. Cole, J.N., et al., *Molecular insight into invasive group A streptococcal disease*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(10): p. 724-36.
84. Steer, AC, et al., *Global emm type distribution of group A streptococci, systematic review and implications for vaccine development*. Lancet Infect Dis, 2009. **9**(10): p. 611-6.
- 30 85. Lamagni, T.L., et al., *Epidemiology of severe Streptococcus pyogenes disease in Europe*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(7): p. 2359-67.
86. Hudson, I.R., *The efficacy of intranasal mupirocin in the prevention of staphylococcal infections: a review of recent experience*. J Hosp Infect, 1994. **27**(2): p. 81-98.
- 35 87. Loeffler, J.M., S. Djurkovic, y V.A Fischetti, *Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia*. Infect Immun, 2003. **71**(11): p. 6199-204.
88. Loessner, M.J., et al., *C-terminal domains of Listeria monocytogenes bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates*. Mol Microbiol, 2002. **44**(2): p. 335-49.
- 40 89. Jado, I., et al., *Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant Streptococcus pneumoniae infection in a murine sepsis model*. J Antimicrob Chemother, 2003. **52**(6): p. 967-73.
90. Grandgirard, D., et al., *Phage lytic enzyme Cpl-1 for antibacterial therapy in experimental pneumococcal meningitis*. J Infect Dis, 2008. **197**(11): p. 1519-22.
91. Witzentrath, M., et al., *Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia*. Crit Care Med, 2009. **37**(2): p. 642-9.
- 45 92. Morens, D.M., J.K. Taubenberger, y AS. Fauci, *The persistent legacy of the 1918 influenza virus*. N Engl J Med, 2009. **361**(3): p. 225-9.
93. Brundage, J.F. y G.D. Shanks, *What really happened during the 1918 influenza pandemic? The importance of bacterial secondary infections*. J Infect Dis, 2007. **196**(11): p. 1717-8; réplica del autor 1718-9.

94. *Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) - United States, May-August 2009*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2009. **58**(38): p. 1071-4.
95. Cunha, B.A, *Sepsis and septic shock: selection of empiric antimicrobial therapy*. Crit Care Clin, 2008. **24**(2): p. 313-34, ix.
- 5 96. Dellinger, R.P., et al., *Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock*. Crit Care Med, 2004. **32**(3): p. 858-73.
97. Wilson, P., et al., *Linezolid resistance in clinical isolates of Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother, 2003. **51**(1): p. 186-8.
- 10 98. Huang, Y.T., et al., *Bacteremia and infective endocarditis caused by a non-daptomycin-susceptible, vancomycin-intermediate, and methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain in Taiwan*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(3): p. 1132-6.
99. Zhang,A., Yang,M., Hu,P., Wu,J., Chen,B., Hua,Y., Yu,J., Chen,H.,Xiao,J. y Jin,M. Comparative genomic analysis of Streptococcus suis reveals significant genomic diversity among different serotype BMC Genomics 12, 523 (2011).

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso para matar bacterias gram-positivas seleccionadas de cepas de *Staphylococcus*, cepas de *Streptococcus*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis* en un método para tratar una infección por bacterias gram-positivas causada por dichas bacterias en un ser humano, que comprende un polipéptido de lisina aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 o variantes de esta que tienen al menos una identidad del 80% con el polipéptido de SEQ ID NO:3 y que es efectivo para matar a dichas bacterias gram-positivas.
2. Una composición para uso según la reivindicación 1 que comprende además un polipéptido de lisina aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; una lisina truncada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con una modificación mediante la cual la lisina truncada solo comprende un dominio catalítico seleccionado del grupo que consiste en un dominio de endopeptidasa y un dominio de glucosaminidasa; comprendiendo el polipéptido de lisina aislado la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2; o variantes de este que tienen al menos una identidad del 80% con el polipéptido de SEQ ID NO:1 o de SEQ ID NO:2 y que es efectivo para matar a bacterias gram-positivas seleccionadas de cepas de *Staphylococcus*, cepas de *Streptococcus*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis*.
3. Una composición para uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2 que comprende además un vehículo, aditivo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
4. Una composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además uno o más de:
- un transportador;
- un vehículo adecuado para la administración del polipéptido a un sitio de infección;
- uno o más antibióticos.
5. Una composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 adecuada para administración tópica, oral o parenteral.
6. Un artículo de fabricación que comprende:
- i. un recipiente que contiene una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; e
- ii. instrucciones para el uso de la composición en el tratamiento de un paciente expuesto a o que presenta síntomas consistentes con la exposición a bacterias *Staphylococcus*, bacterias *Streptococcus* o bacterias *Listeria monocytogenes*, en el que las instrucciones para el uso de la composición indican un método para usar la composición, comprendiendo el método las etapas de:
- a) identificar al paciente que se sospecha que ha estado expuesto a bacterias *Staphylococcus*, bacterias *Streptococcus* o bacterias *Listeria monocytogenes*; y
- b) administrar una cantidad efectiva de la composición al paciente.
7. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso en:
- la reducción de una población de bacterias gram-positivas seleccionadas de cepas de *Staphylococcus*, cepas de *Streptococcus*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis*; o
- el tratamiento de un sujeto humano expuesto a o que presenta riesgo de exposición a una bacteria patógena gram-positiva seleccionada de cepas de *Staphylococcus*, cepas de *Streptococcus*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis*.
8. Una composición para uso según la reivindicación 7 en la que la bacteria se selecciona de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus agalactiae* (GBS), *Streptococcus pyogenes* (GAS), *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus* GES, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus pneumoniae*.
9. Un método in vitro o ex vivo para reducir o controlar una infección o contaminación por bacterias gram-positivas causada por una o más bacterias *Staphylococcus*, bacterias *Streptococcus*, bacterias *Listeria monocytogenes* y bacterias *Enterococcus faecalis* en una disolución, material o dispositivo que comprende la etapa de poner en contacto la disolución, material o dispositivo con una cantidad efectiva de una composición que comprende un polipéptido de lisina aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 o variantes de esta que tienen una identidad de al menos el 80% con el polipéptido de SEQ ID NO:3 y que es efectivo para matar a dichas bacterias gram-positivas seleccionadas de bacterias *Staphylococcus*, bacterias *Streptococcus*, bacterias *Listeria*

monocytogenes y bacterias *Enterococcus faecalis*.

10. Una composición para uso según la reivindicación 7 o reivindicación 8 o un método según la reivindicación 9 en el que la bacteria es una bacteria resistente a antibiótico, por ejemplo, *Staphylococcus aureus* resistente a antibiótico.
- 5 11. Una composición para uso o un método según la reivindicación 10 en el que la bacteria es *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia a vancomicina (VISA), o *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (VRSA).
- 10 12. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de lisina aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 o variantes de este que tienen una identidad de al menos el 80% con el polipéptido de SEQ ID NO:3 y que es efectivo para matar a las bacterias gram-positivas seleccionadas de cepas de *Staphylococcus*, cepas de *Streptococcus*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis* y que comprende además un vehículo, aditivo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 15 13. Una composición según la reivindicación 12 que comprende además un polipéptido de lisina aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; una lisina truncada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con una modificación mediante la cual la lisina truncada solo comprende un dominio catalítico seleccionado del grupo que consiste en un dominio de endopeptidasa y un dominio de glucosaminidasa; comprendiendo el polipéptido de lisina aislado la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2; o variantes de este que tienen al menos una identidad del 80% con el polipéptido de SEQ ID NO:1 o de SEQ ID NO:2 y que es efectivo para matar a bacterias gram-positivas seleccionadas de cepas de *Staphylococcus*, cepas de *Streptococcus*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis*.
- 20 14. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 en el que la composición comprende además un polipéptido de lisina aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; una lisina truncada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con una modificación mediante la cual la lisina truncada solo comprende un dominio catalítico seleccionado del grupo que consiste en un dominio de endopeptidasa y un dominio de glucosaminidasa; comprendiendo el polipéptido de lisina aislado la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2; o variantes de este que tienen al menos una identidad del 80% con el polipéptido de SEQ ID NO:1 o de SEQ ID NO:2 y que es efectivo para matar a bacterias gram-positivas seleccionadas de cepas de *Staphylococcus*, cepas de *Streptococcus*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis*.
- 25 15. Una composición, artículo de fabricación o método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en el que el polipéptido de lisina aislado comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.
- 30

FIGURA 1

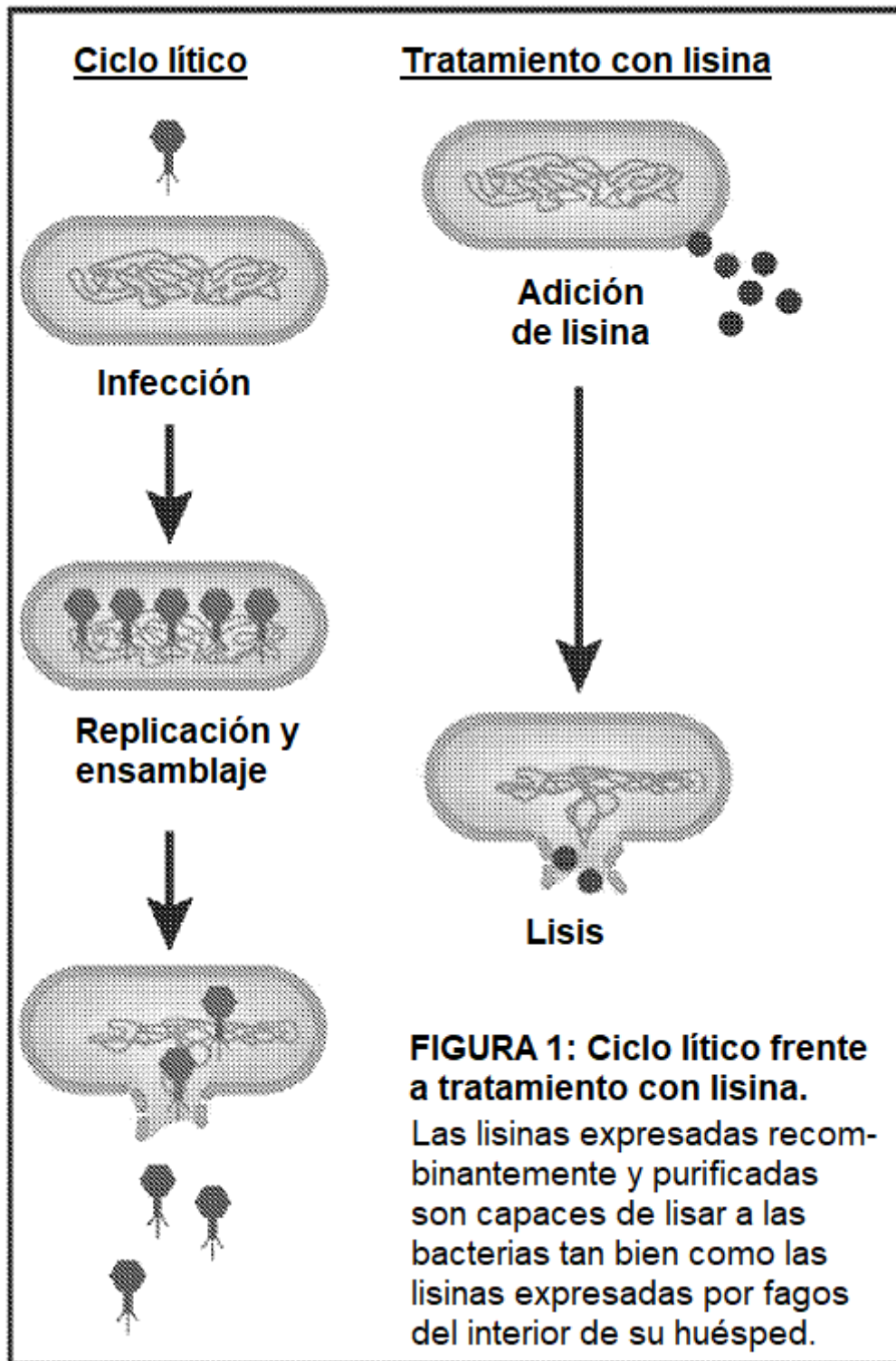


FIGURA 2

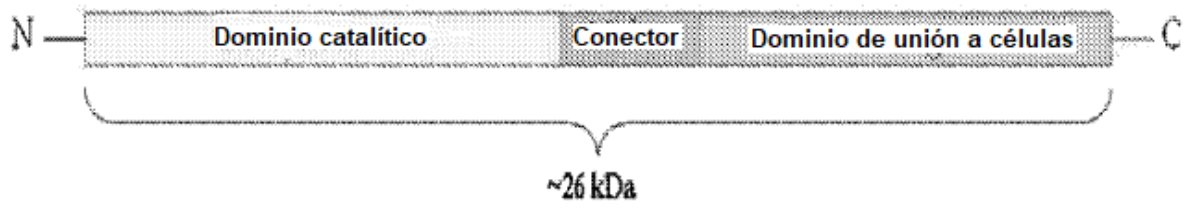


FIGURA 3

PlySs1

- Construcción de longitud completa (que se clonó originariamente de la cepa 7711): 1.359 pb; 452 aminoácidos; 49,67 kDa; pl teórico = 6,87
- Construcción truncada (que se expresó, purificó y caracterizó): 765 pb; 254 aminoácidos; 28,09 kDa; pl teórico = 7,7
- Extremo N: Se mostró experimentalmente que posee actividad γ -D-glutaminil-L-lisina endopeptidasa
- Dominio de unión doble CPL-7 (acceso Pfam no. PF08230)
- Extremo C: Dominio enzimático de endo-beta-N-acetilglucosaminidasa (PF01832)

```

ATGACAATCA ATCTTGAAAC ATCCATTCGT TGGATGAGCG ACCGTGTCCG
CAAAGTCTCT TACTCAATGG ACTATCGTAA CGGTCCGAAT AGTTATGACT
GCTCTAGTGC TGTATATTAT GCGCTAATGG CGGGTGGTGC AATTTCTGCA
GGTTGGGCGG TTAACACTGA GTATATGCAT GACTGGTTGA TACGTAACGG
ATATGTTTTG GTAGCTGAAA ATAAACCATT TAACGCTCAA AGACATGACG
TTTGTATTTT GGGTAAACGT GGCTATTCGA GCGGAGCAGG TGGTCACGTC
GTTATCTTTG TGGATAATGT TAATGTGATA CATTGTAACT ATGCACGTAA
CGGAATTTCC ATTGATAATT ATAATCAAGT GCATCGTGGT ATGTATTACT
ATCTATATCG CCCAGCAAAT CAACCCAGCA TCAGCAACAA ATCACTGGAT
CAGCTTGTTA AGGAGACTTT GGCTGGGGTA CATGGCAACG GGGACACCCG
TAAGGCAAGT CTTGGCAGTC AATACGAGGC TGTCATGGCG GTTATCAATG
GCAAAGCTTC GGCAAGCGAG AAATCTGATG AGGAACTTGC TAGGGAAAGTC
TTAGCAGGTA AGCACGGGGC TGGAGAGGAC CGAAAACGGT CATTAGGACC
ACGCTATGAG CCTGTTCAAG CCAAGGTCAA CGAATTGCTC AAGGCTAAGG
AAAAACCGTC TGAGACGGCC AAAAATGAAC CACAGACGGT GCAATTCAAG
GAGGACGGGG ACTTGTCTTT CAATGGTGCC ATTCTTAAGA AGTCTGTCCCT
CGAAATTATC CTGAAAAAGT GTAAAGAACA TGACATCTTA CCAAGCTATG
CCCTAACTAT CCTACACTAT GAAGGGCTTT GGGGCACCTC TGCTGTCCGT
AAGGCCGACA ACAACTGGGG CGGTATGACC TGGACTGGCC AAGGCAACCG
TCCGAGCGGA GTAATTGTGA CTCAAGGTTT GGCTCGGCCA TCGAACGAGG
GAGGCCACTA CATGCACTAT GCCACCGTGG ATGATTTCCCT GACGGACTGG
TTCTACCTGC TTCGCAAGGA CGGGTCTTAC AAGGTATCTG GTGCATTGAC
CTTCAGCGAG TCCATTAAGG GCATGTTCCA GGTTGGCGGA GCTAAATACG
ACTATGCAGC CGCCGGCTAC GATAGTTACC TGGTCGGCGC CACTAGCAGG
CTAAAAGCTA TCGAGTCCGA AAATGGCAGT CTGACACGGT TTGATGCCAC
ATCAAATAAT GTCCATTCGG TTGACCCTGA TAAAATCTCT GTTGATATTG
ACGGCATTGA AGTTACGATC AATGGTGTG TCTACAAGCT GGAAAAGAAA
CCAGTCTAA
    
```

```

MTINLETSIR WMSDRVGKVS YSM DYRNGPN SYDCSSAVYY ALMAGGAI SA
GWAVNTEYMH DWLIRNGYVL VAENKPFNAQ RHDVCILGKR GYSSGAGGHV
VIFVDNVNVI HCN YARNGIS IDNYNQVHRG MYYYLYR PAN QPSISNKSLD
QLVKETLAGV HGNGDTRKAS LGSQYEAVMA VINGKASASE KSDEELAREV
LAGKHGAGED RRRSLGPRYE PVQAKVNELL KAKEKPSETA KNEPQTVQFK
EDGDLSENGA ILKKS VLEII LKKCKEHDIL PSYALTILHY EGLWGTSAVG
KADNNWGGMT WTGQGNRPSG VIVTQGLARP SNEG GHYMHY ATVDDFLTDW
FYLLRKDGSY KVSGALTFSE SIKGMFQVGG AKYDYAAAGY DSYLVGATSR
LKAIESENGS LTRFDATSNN VHSVDPDKIS VDIDGIEVTI NGVVYKLEKK PV
    
```

**NOTA: el gen/proteína de longitud completa mostrado aquí es el que se clonó durante el cribado funcional inicial del genoma de *S. suis* 7711. Para la expresión, purificación y análisis funcional a gran escala, se subclonó una construcción truncada que omitía el dominio enzimático C-terminal. Los residuos incluidos en esta construcción están subrayados en lo anterior.

↓ PUNTO DE TRUNCAMIENTO

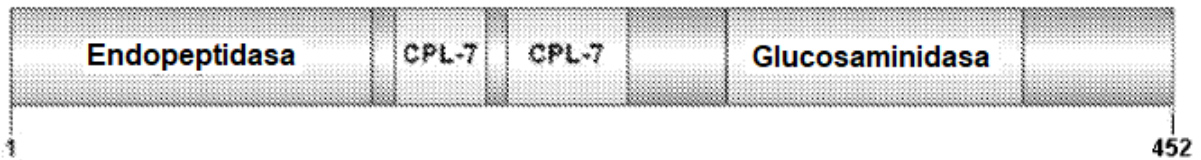


FIGURA 4

PlySS2

- Número de Acceso Genbank: ZP_03625529 (de la cepa de *S. suis* 89/1591)
- 738 pares de bases; 245 aminoácidos; 26,06 kDa; pl teórico = 9,0
- Dominio enzimático CHAP (PF05257)
- Dominio de unión SH3 Tipo 5 (PF08460)

```

ATGACAACAG TAAATGAAGC ATTAAATAAT GTAAGAGCTC AGGTTGGGTC
CGGTGTGTCT GTTGGCAACG GCGAATGCTA CGCTTTGGCT AGTTGGTACG
AGCGCATGAT TAGTCCGGAT GCAACTGTCT GACTTGGCGC TGGTGTGGGC
TGGGTCAGCG GTGCAATCGG CGATAACAATC TCTGCCAAAA ACATCGGCTC
ATCATACAAC TGGCAAGCTA ACGGCTGGAC AGTTTCCACA TCTGGTCCAT
TTAAAGCAGG TCAGATTGTG ACGCTTGGGG CAACACCAGG AAACCCTTAC
GGACATGTGG TAATCGTCGA AGCAGTGGAC GGCATAGAT TGACTATTTT
GGAGCAAAAC TACGGCGGGA AACGTTATCC CGTCCGTAAT TATTACAGCG
CTGCAAGCTA TCGTCAACAG GTCGTGCATT ACATCACACC GCCTGGCAGC
GTCGCACAGT CAGCACCCAA CCTTGCAGGC TCTCGTTCCT ATCGCGAGAC
GGGCACTATG ACTGTCACGG TCGATGCTCT CAATGTTCGC AGGGCGCCAA
ATACTTCAGG CGAGATTGTA GCAGTATACA AGCGTGGTGA ATCATTGAC
TATGATACTG TCATCATCGA TGCAATGGC TATGTCTGGG TGTCTTACAT
AGGCGGCAGC GGCAAACGTA ACTACGTTGC GACGGGCGCT ACCAAAGACG
GTAAGCGTTT CGGCAATGCT TGGGGTACAT TTAAATAA
    
```

```

MTTVNEALNN VRAQVGSGVS VGNGECYALA SWYERMISPD ATVGLGAGVG
WVSGAIGDTI SAKNIGSSYN WQANGWTVST SGPFKAGQIV TLGATPGNPY
GHVVIVEAVD GDRLTILEQN YGGKRYPVRN YSAASYRQQ VVHYITFPGT
VAQSAPNLAG SRSYRETGTM TVTVDALNVR RAPNTSGEIV AVYKRGESEF
YDTVIIDVNG YVWVSYIGGS GKRNYVATGA TKDGKRFGNA WGTFK
    
```

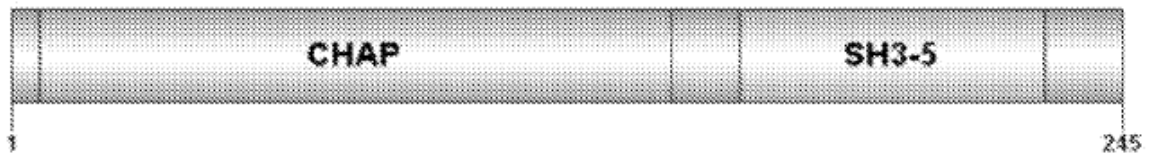


FIGURA 5

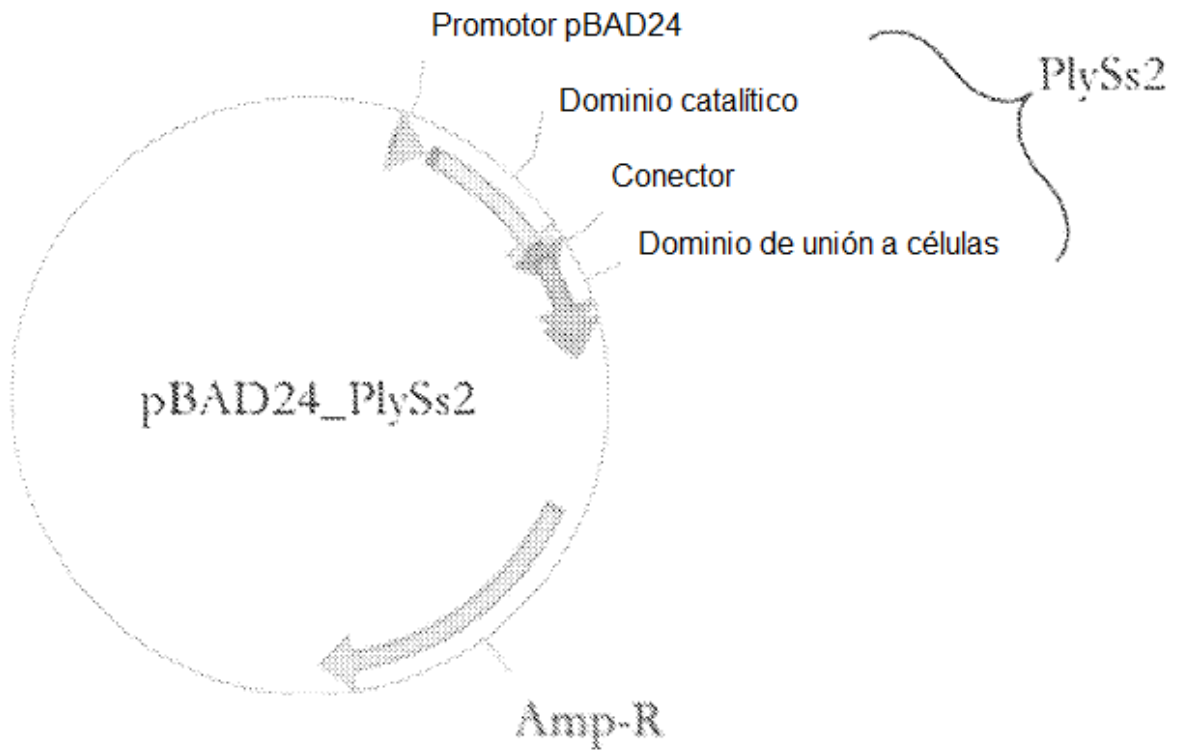


FIGURA 6

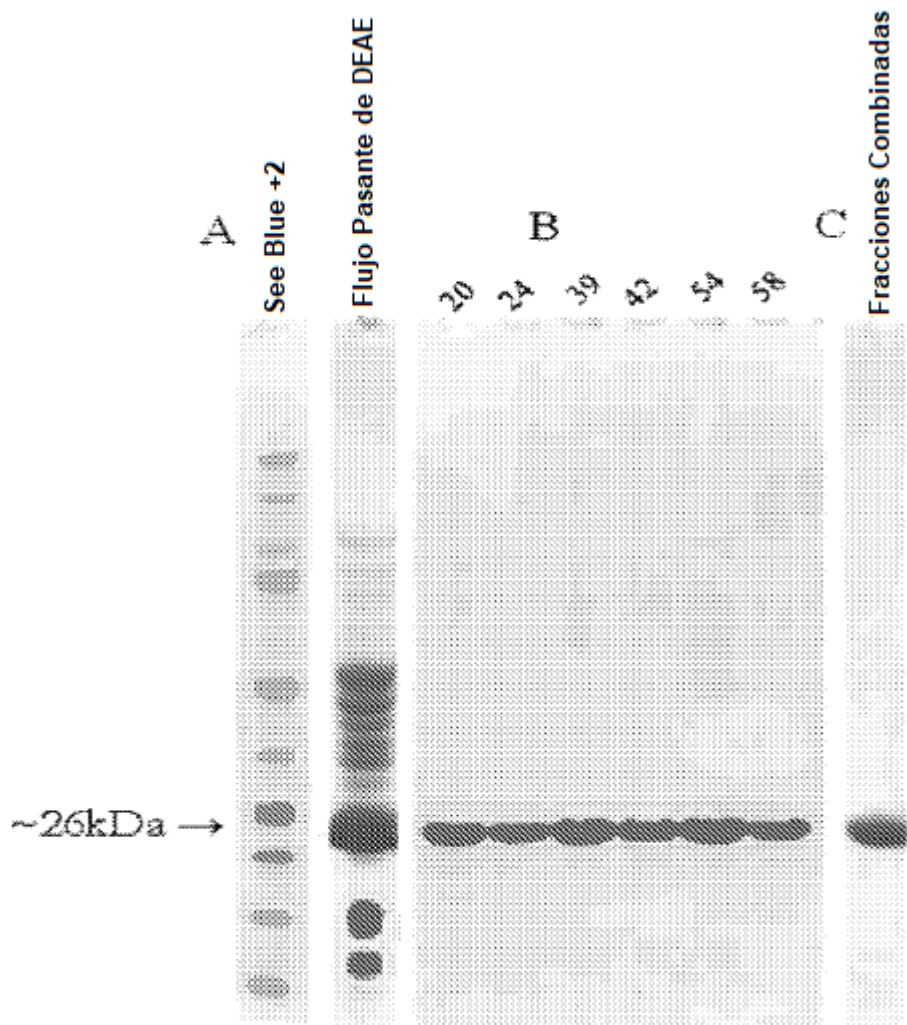


FIGURA 7A

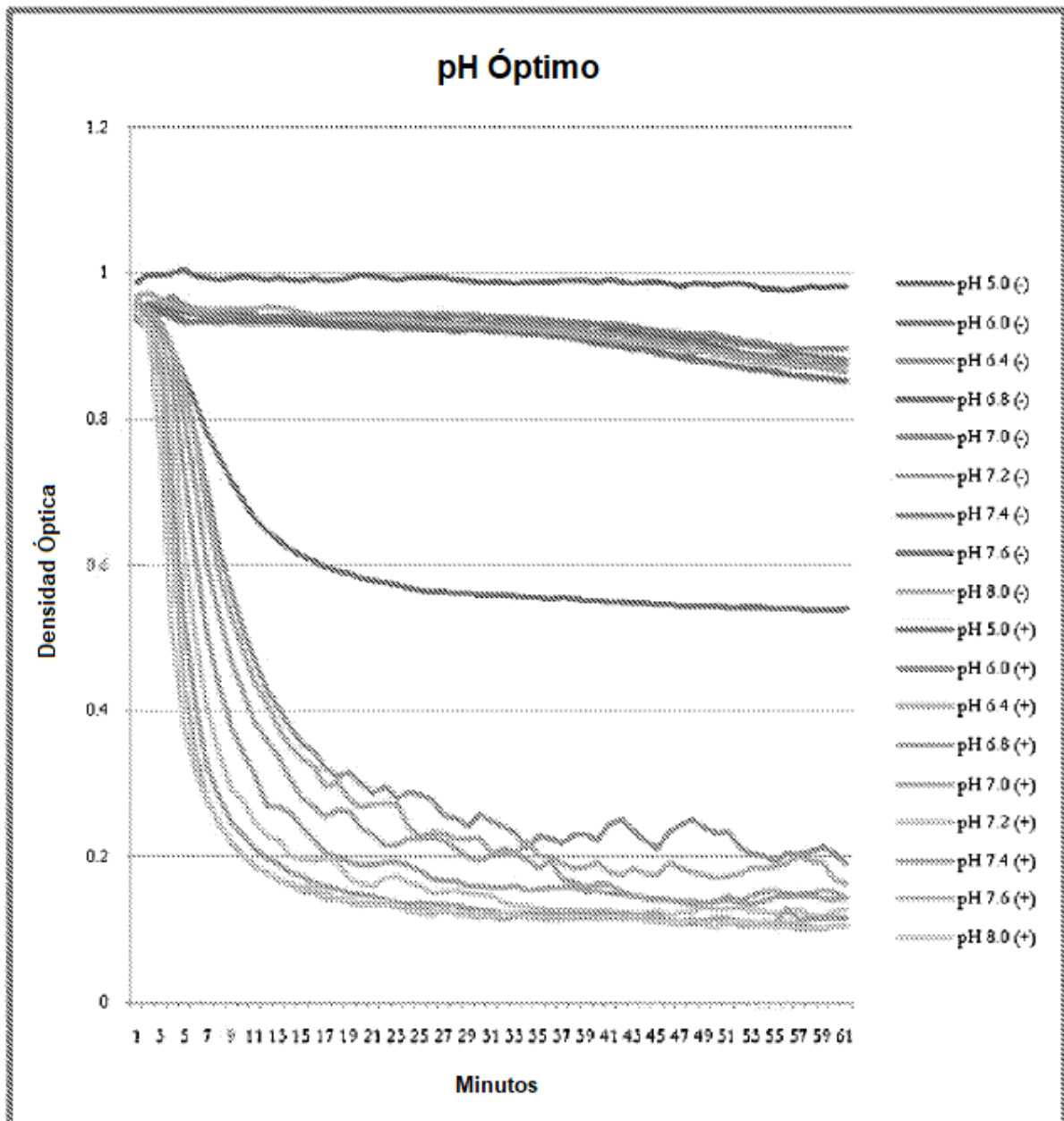


FIGURA 7B

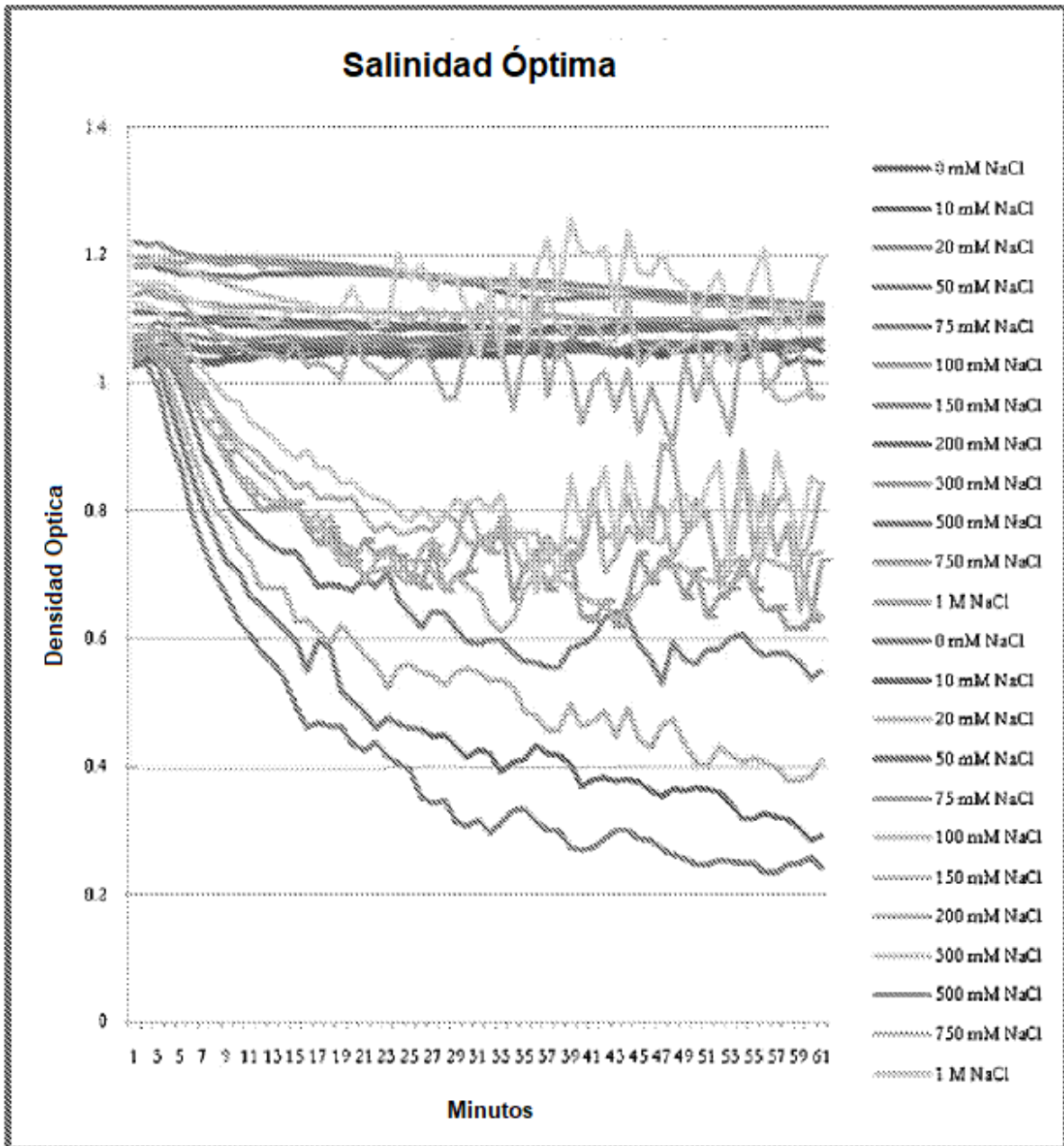


FIGURA 7C

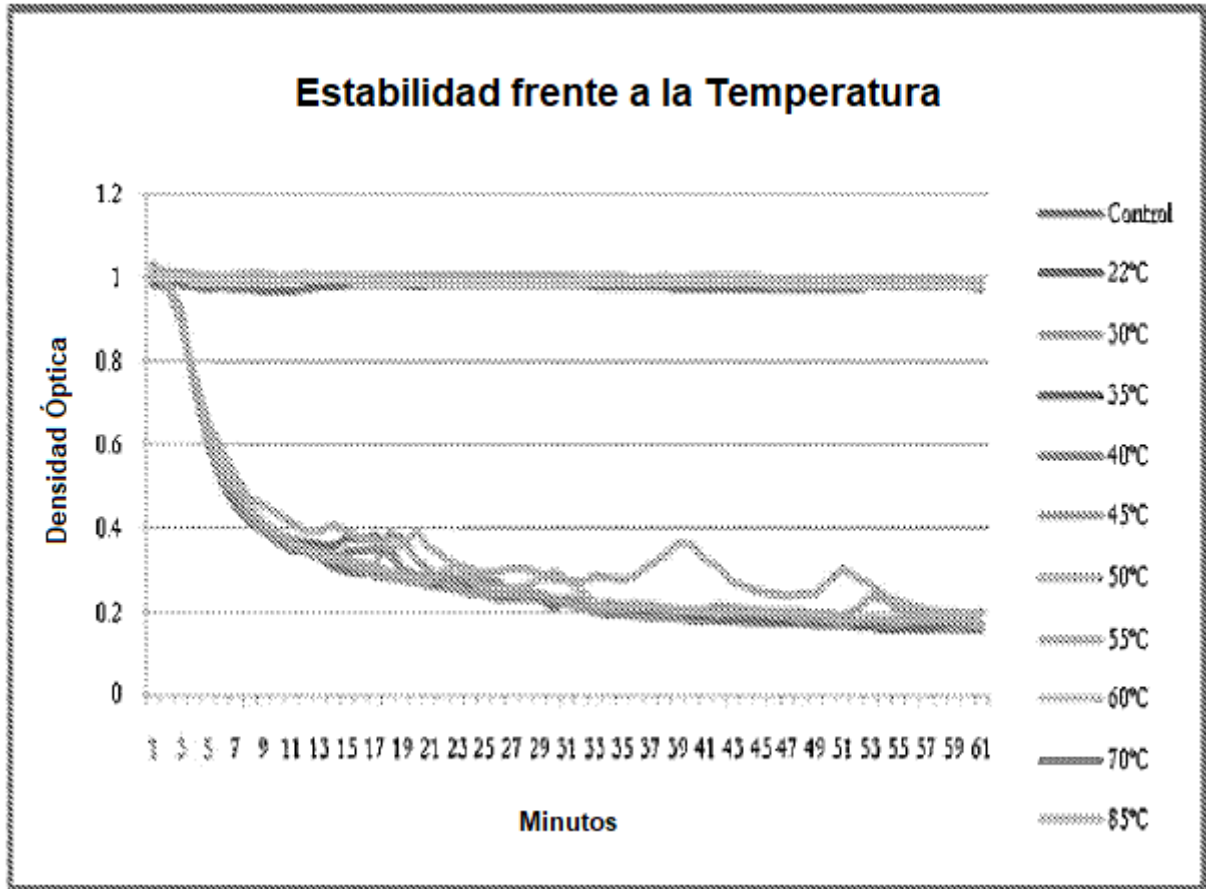


FIGURA 7D

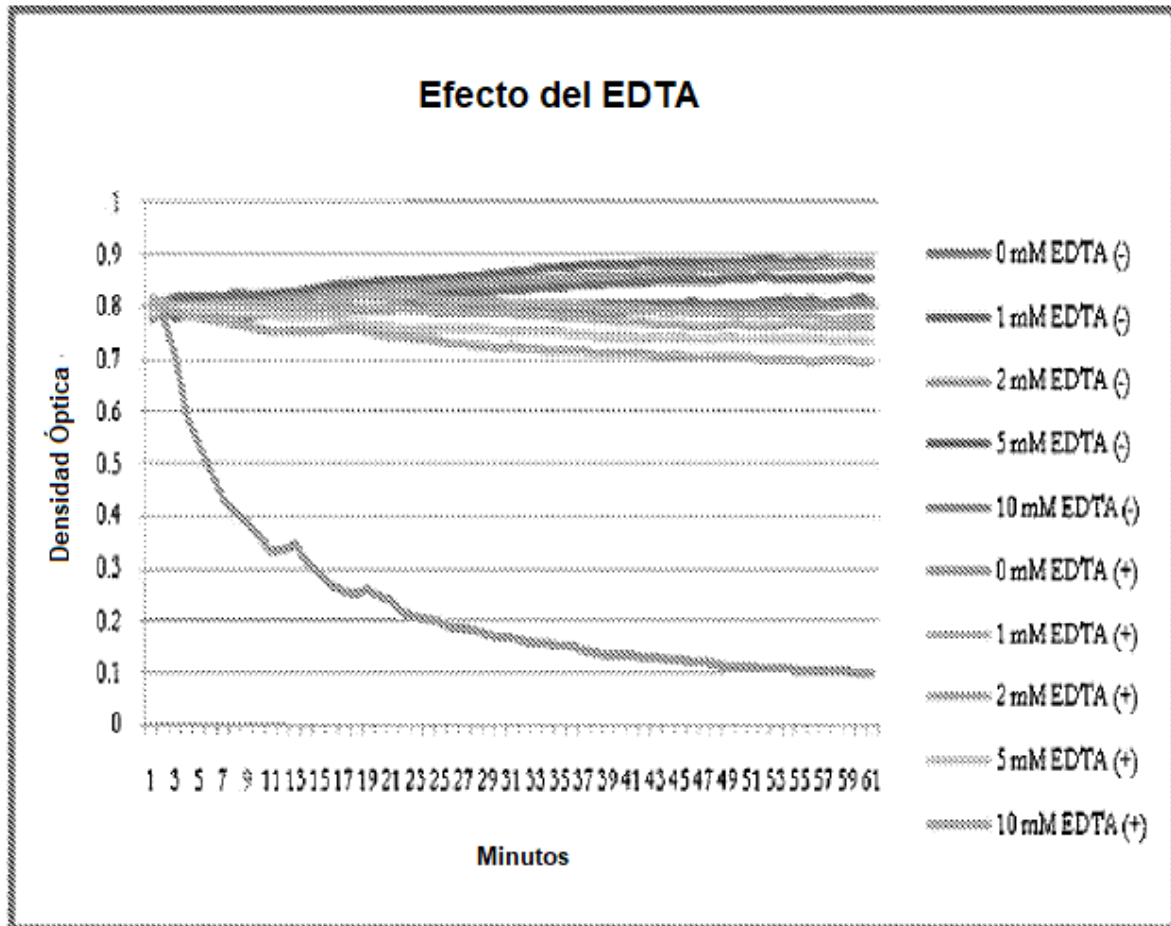


FIGURA 8

pH Óptimo (Bis-tris propano)

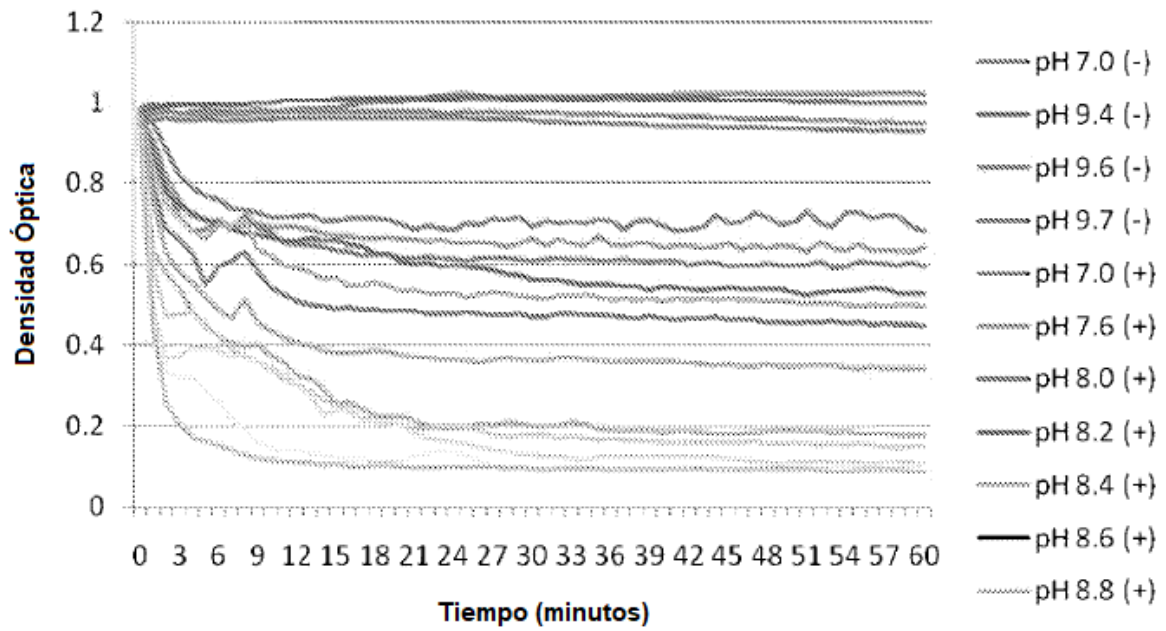


FIGURA 9

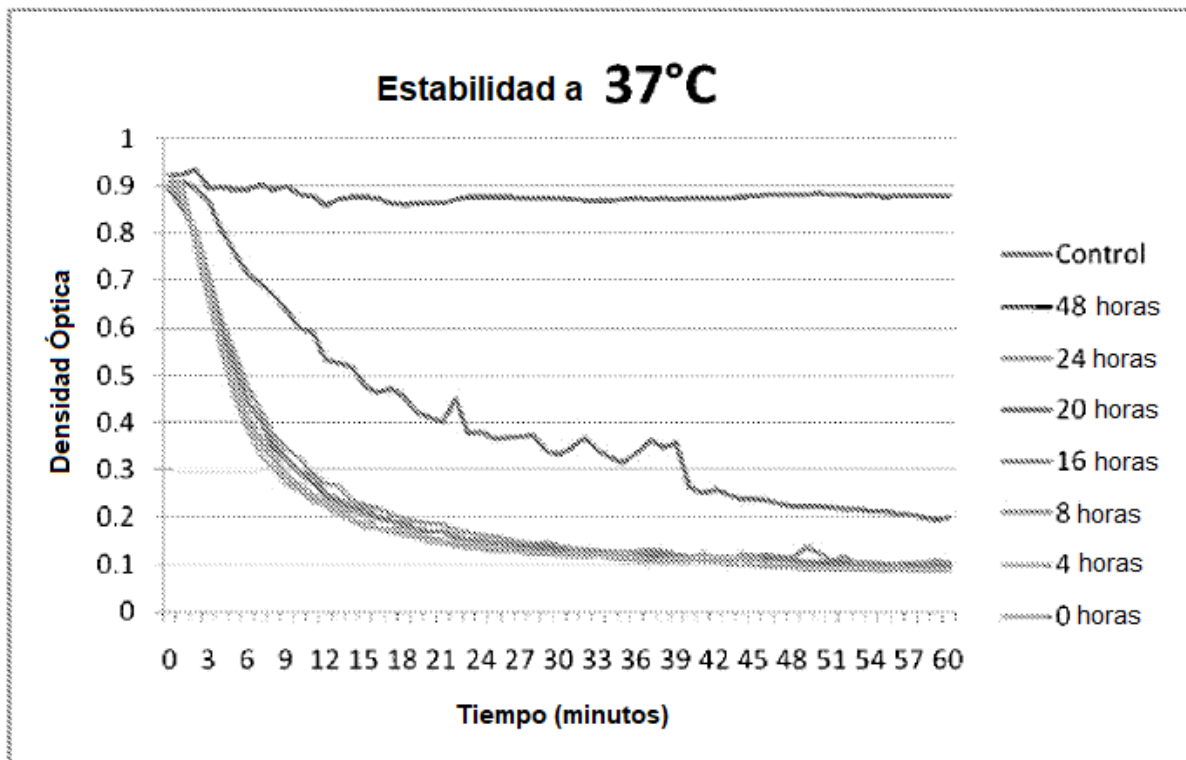


FIGURA 10

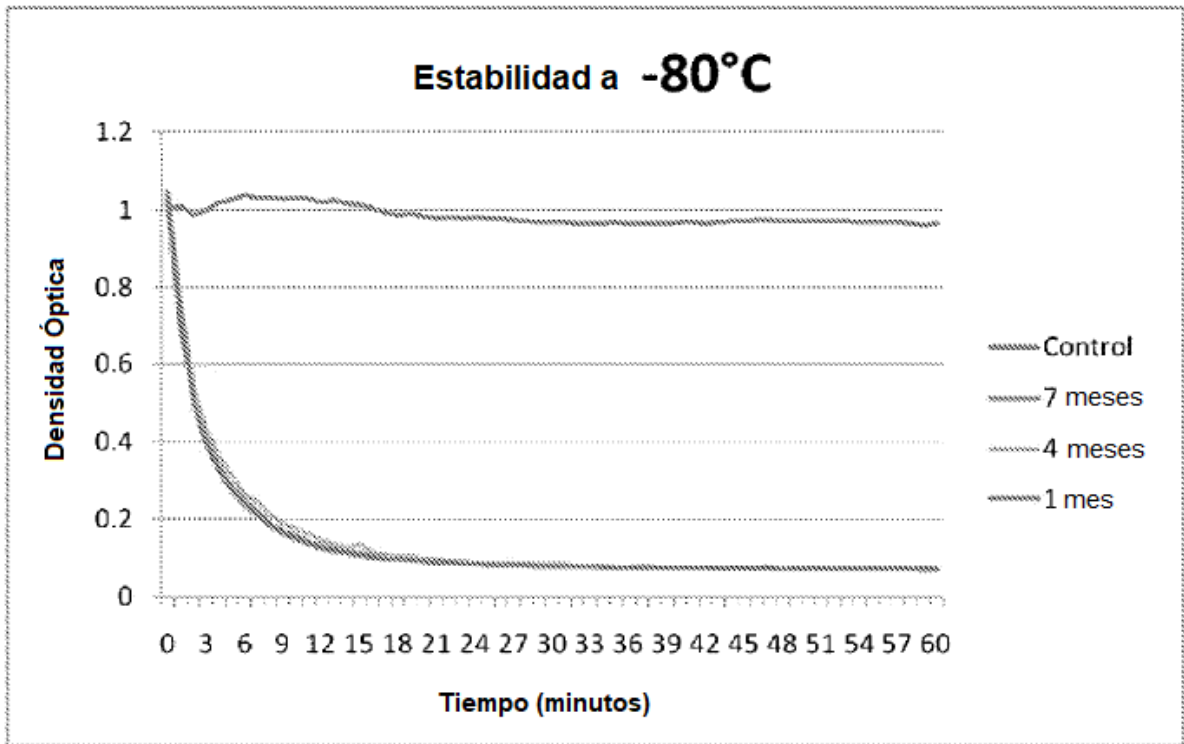
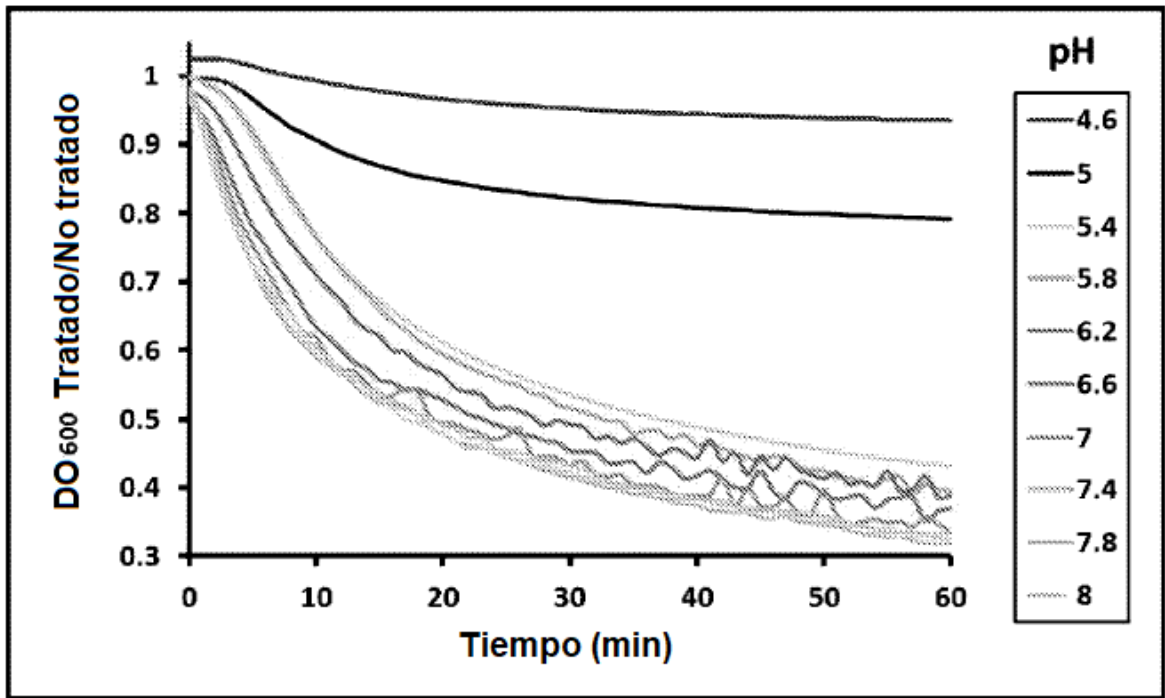


FIGURA 11A y B

A



B

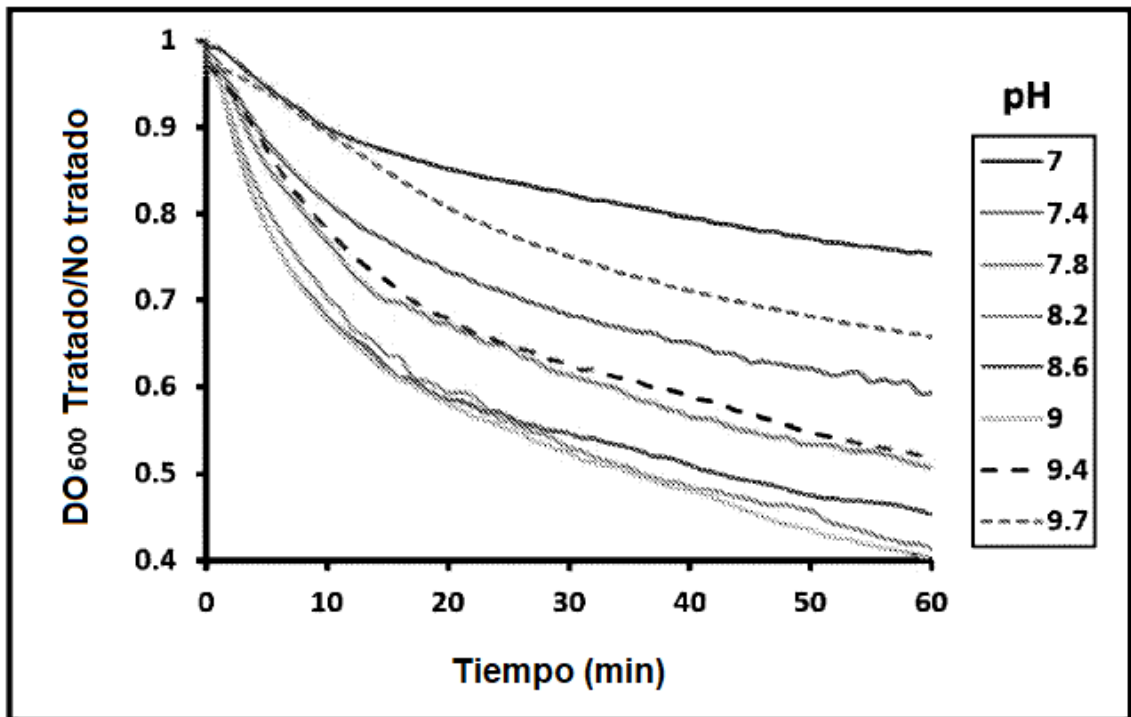


FIGURA 12

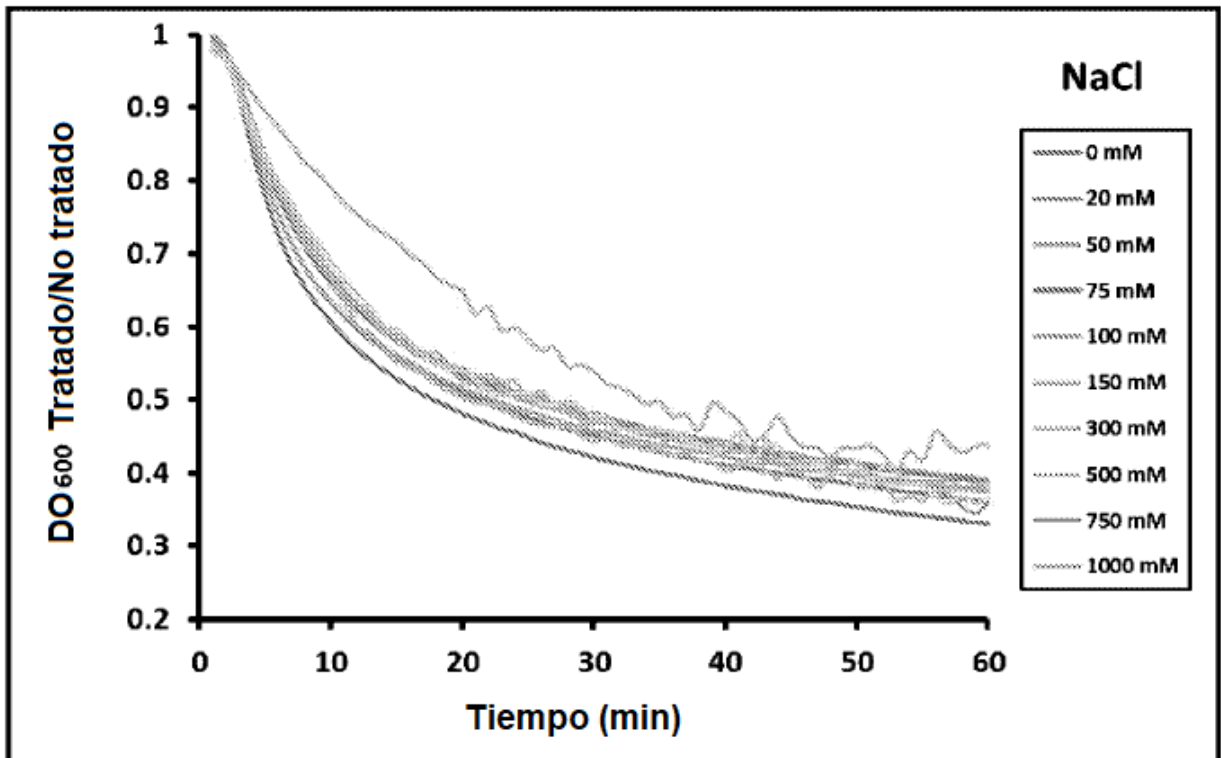


FIGURA 13A y B

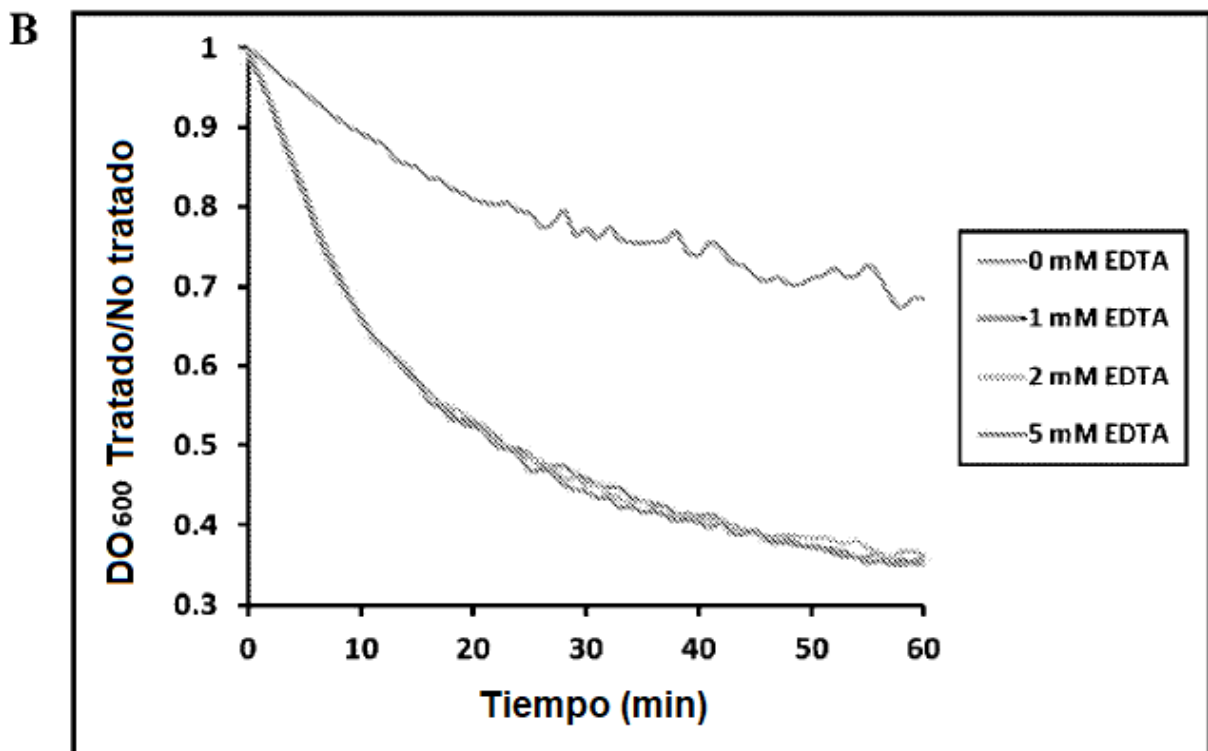
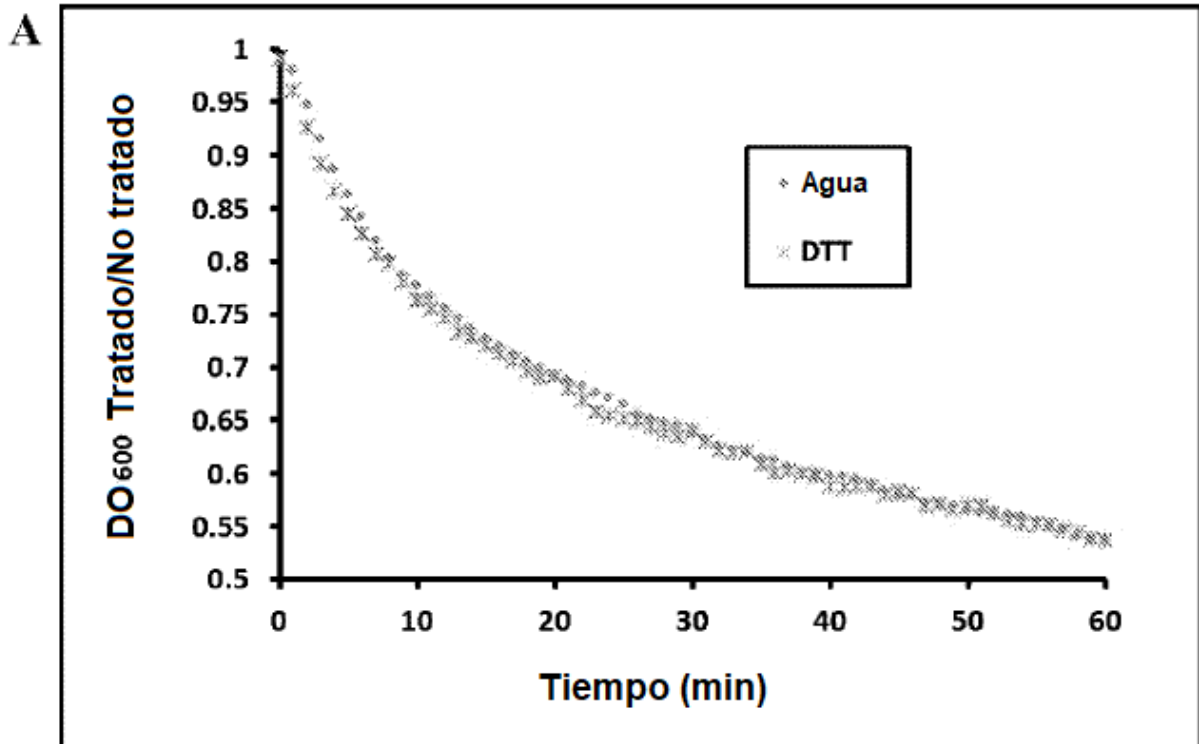


FIGURA 14A y B

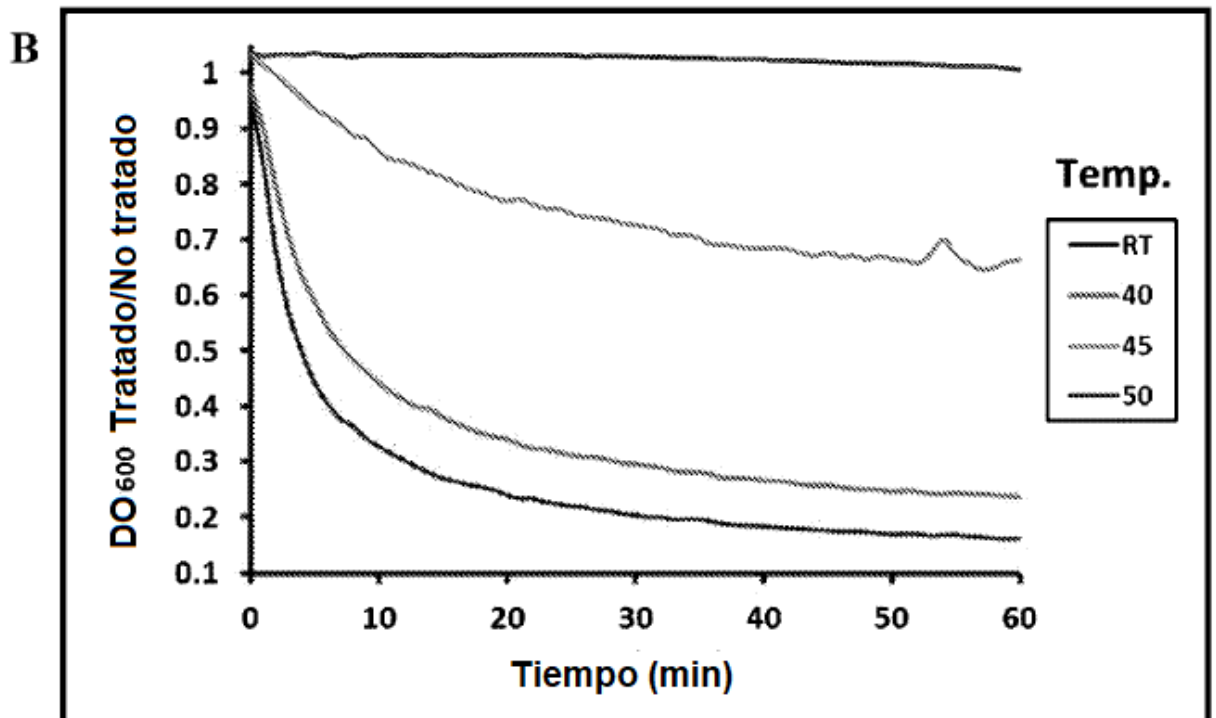
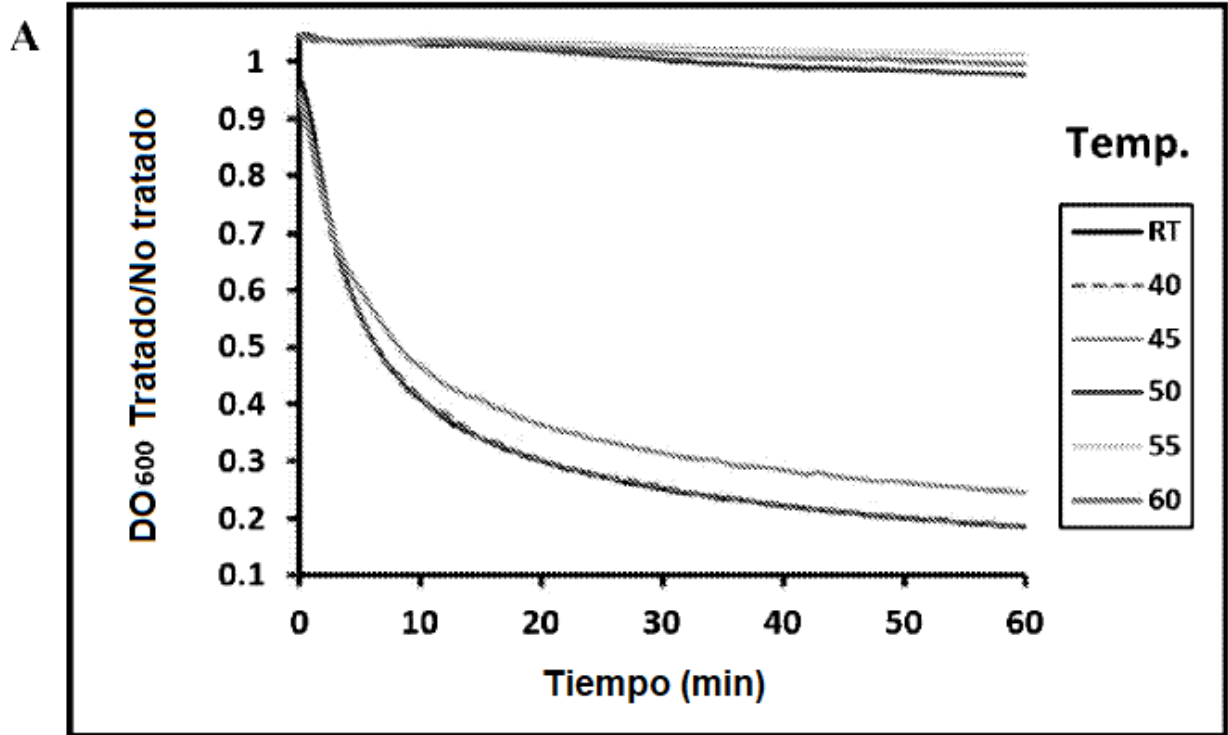
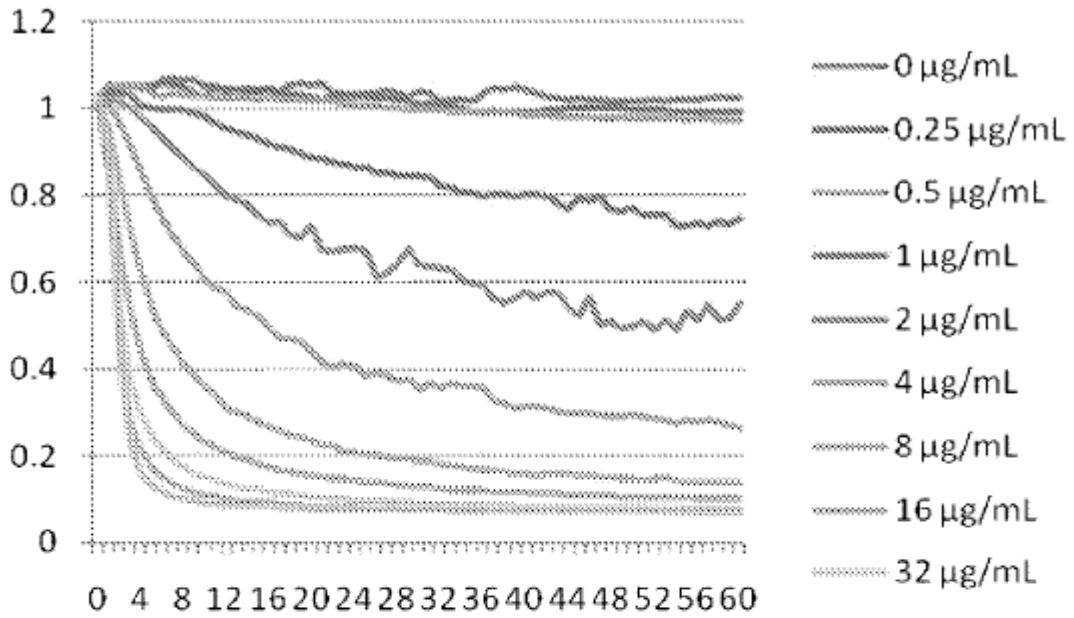


FIGURA 15A y B

A

Actividad Bacteriolítica - 7997



B

***S. suis* S735**

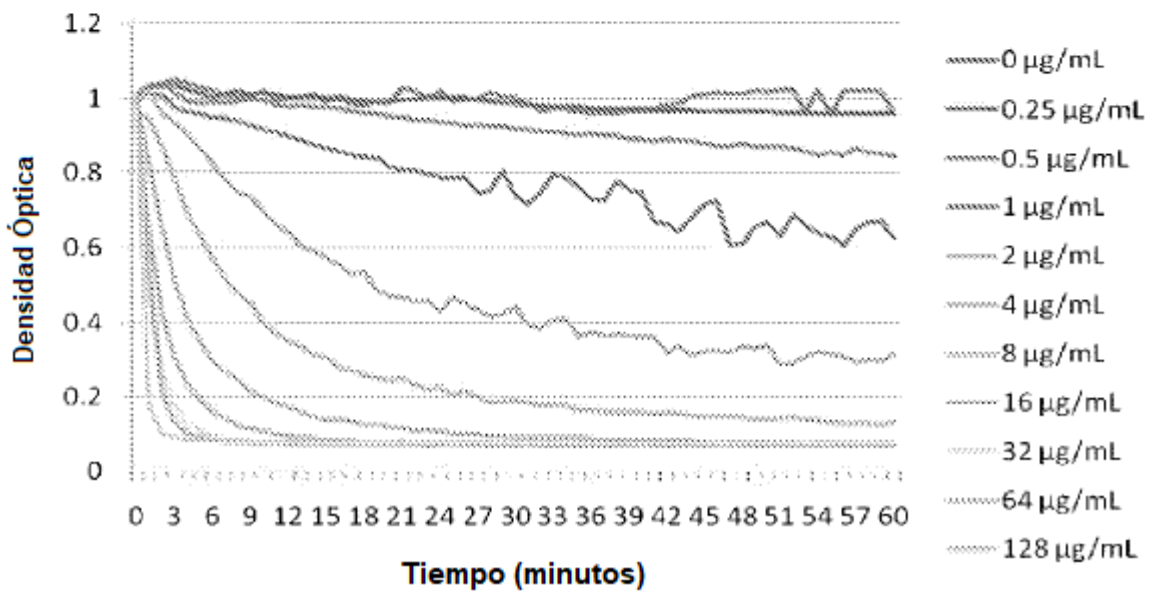


FIGURA 16A

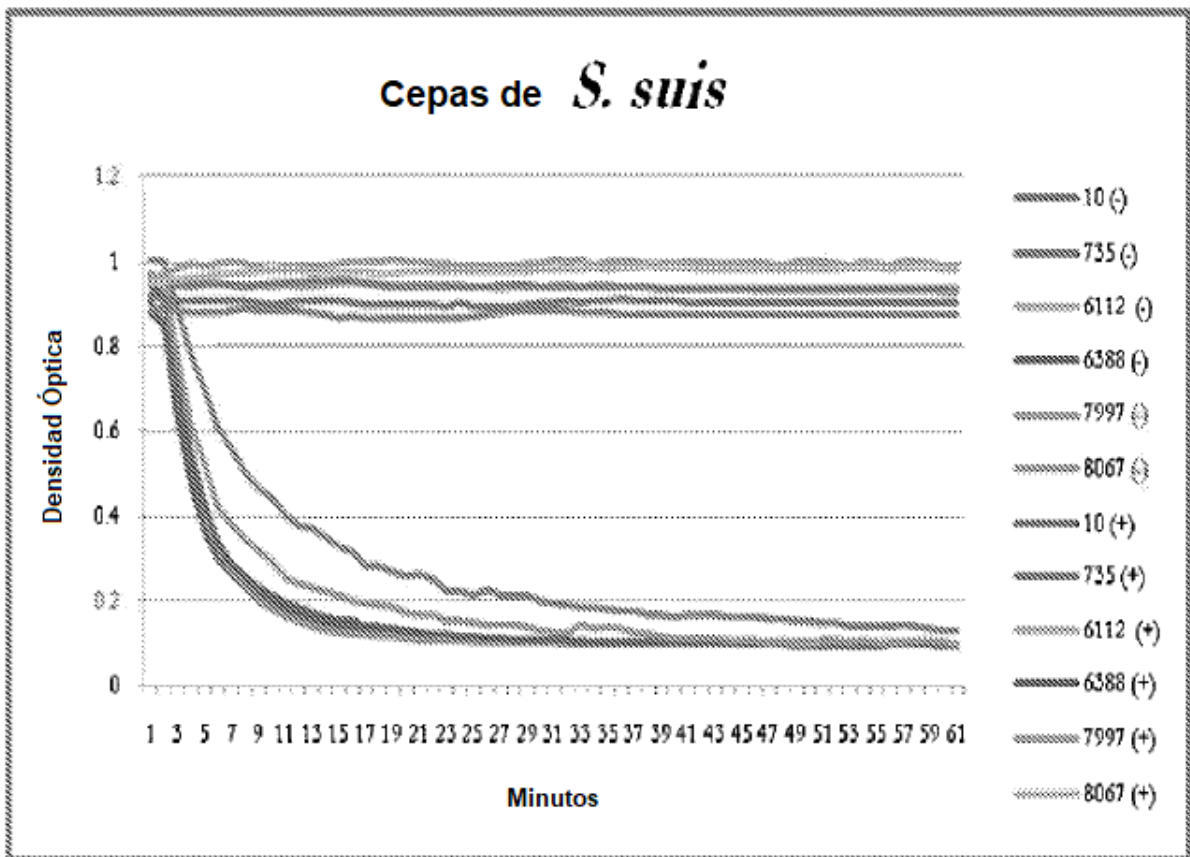


FIGURA 16B

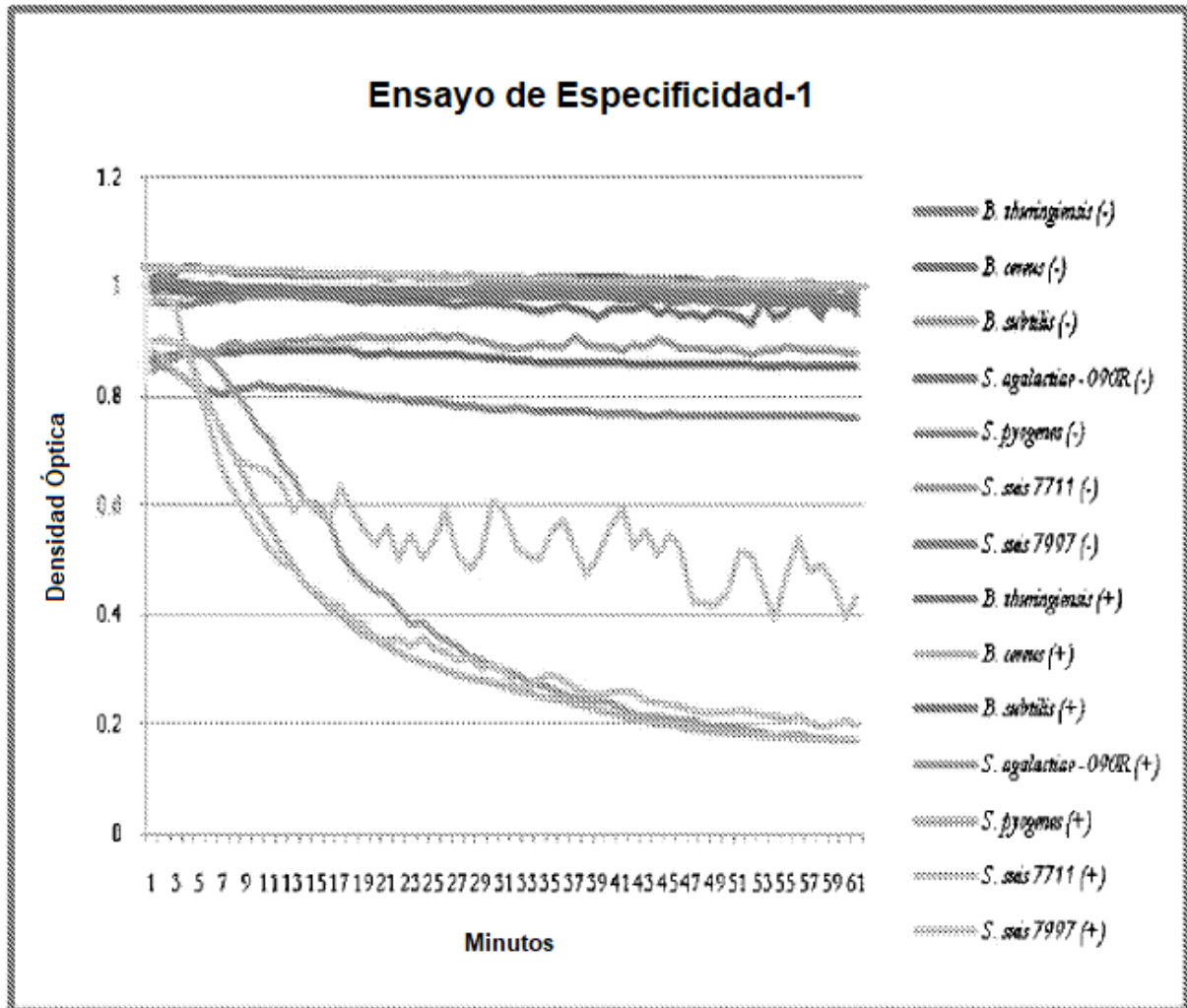


FIGURA 16C

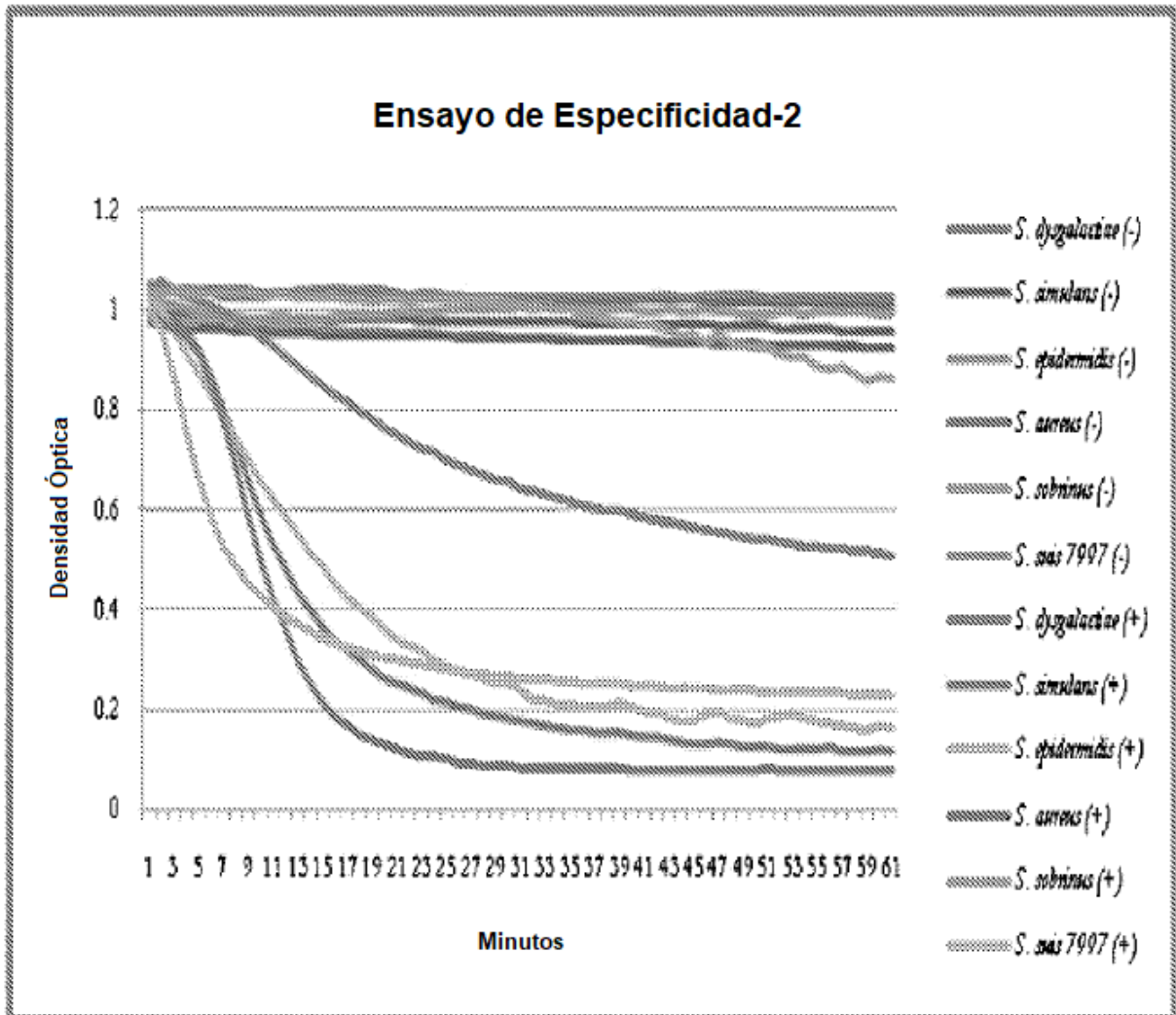


FIGURA 16D

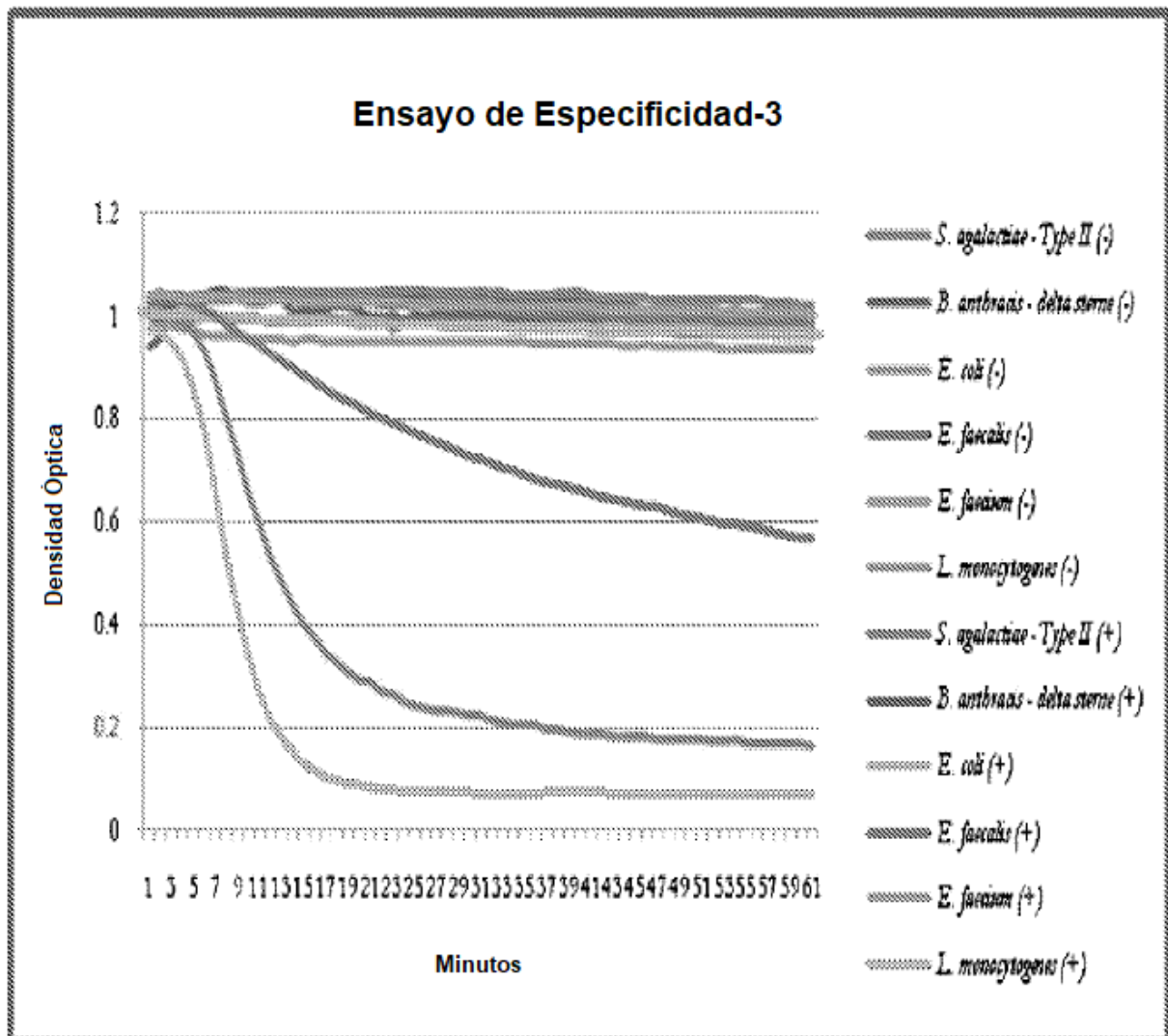


FIGURA 17A

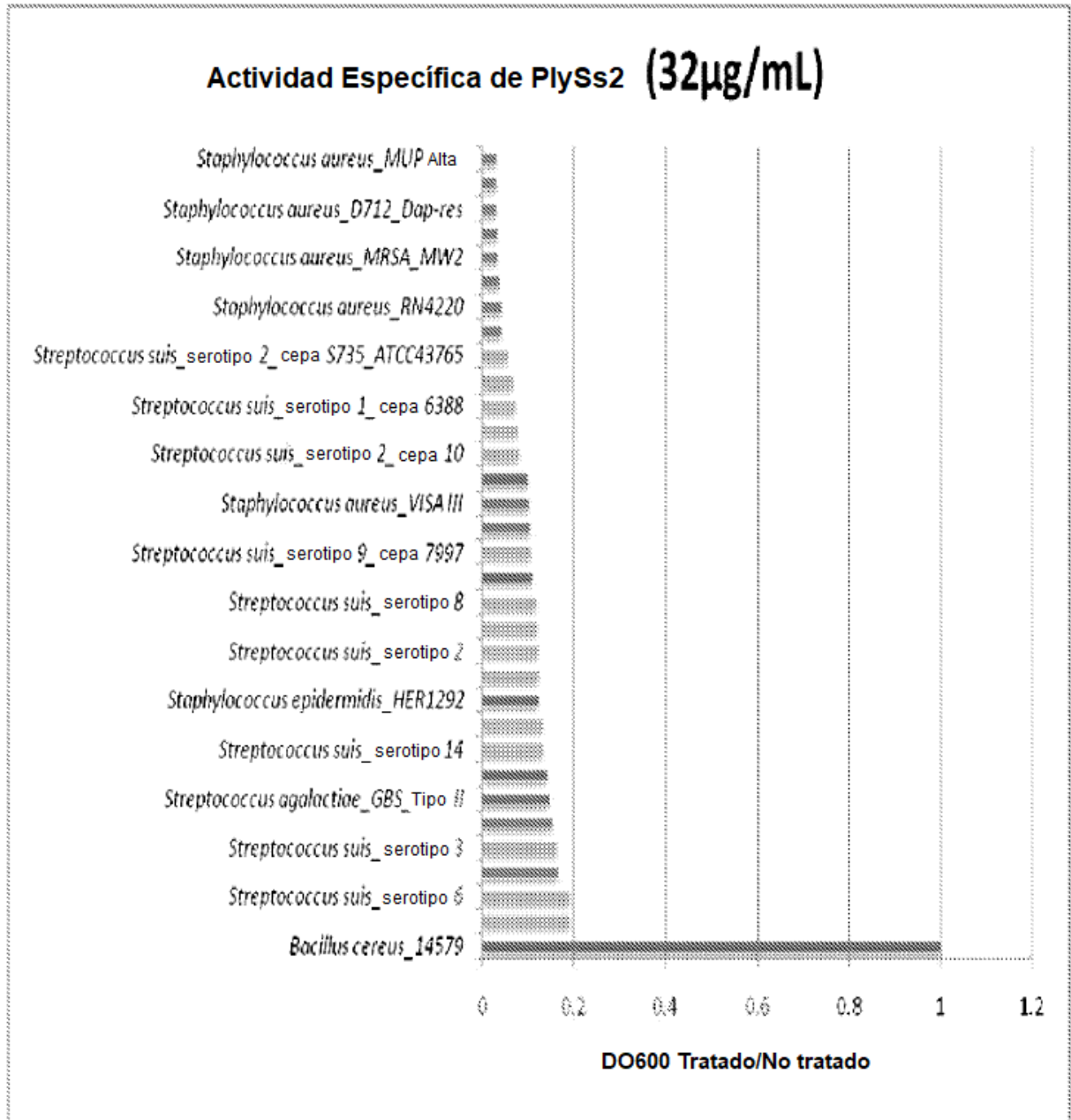


FIGURA 17B

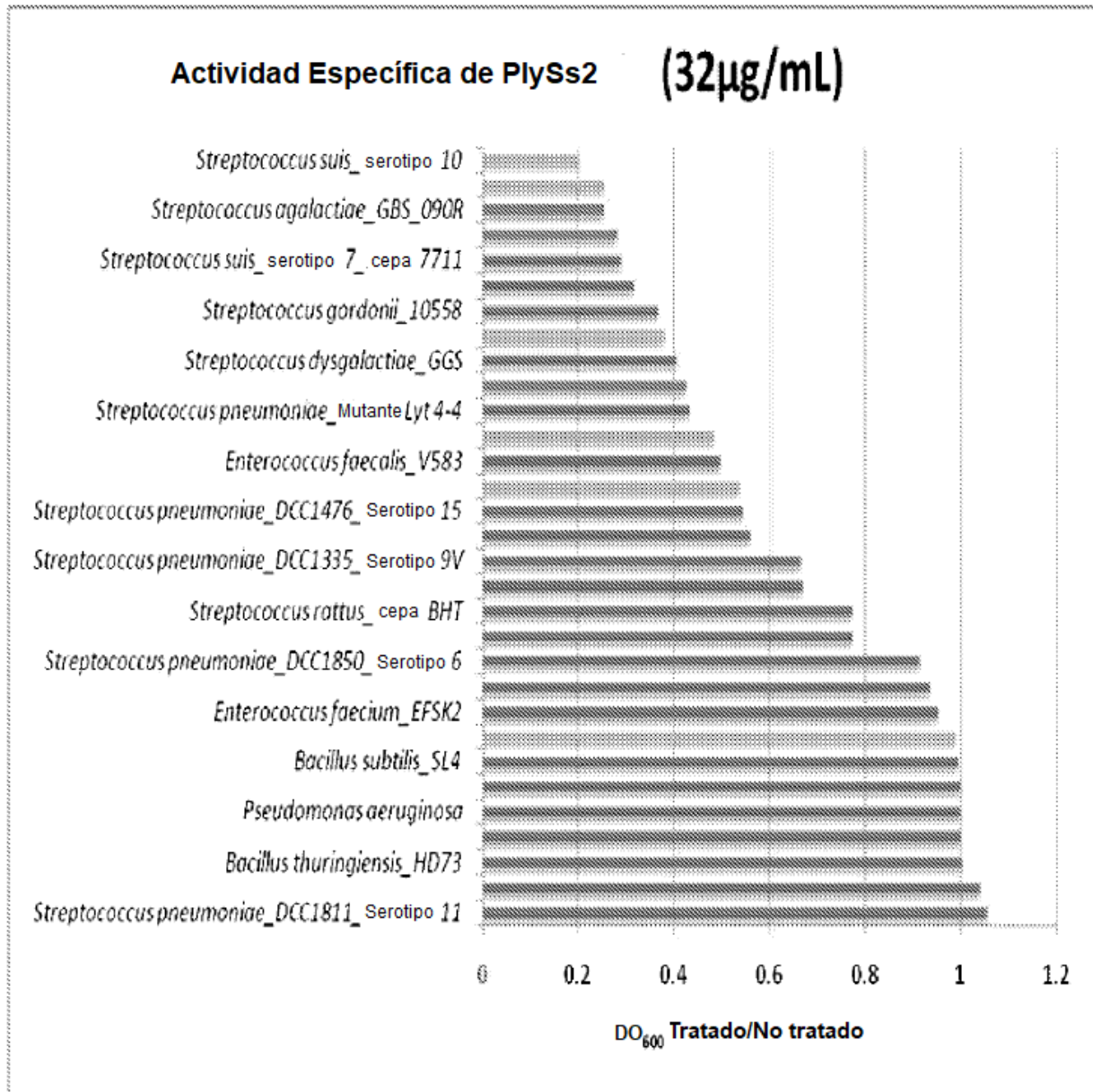


FIGURA 18

Efecto de PlySS2 frente a Cepas Estafilococales

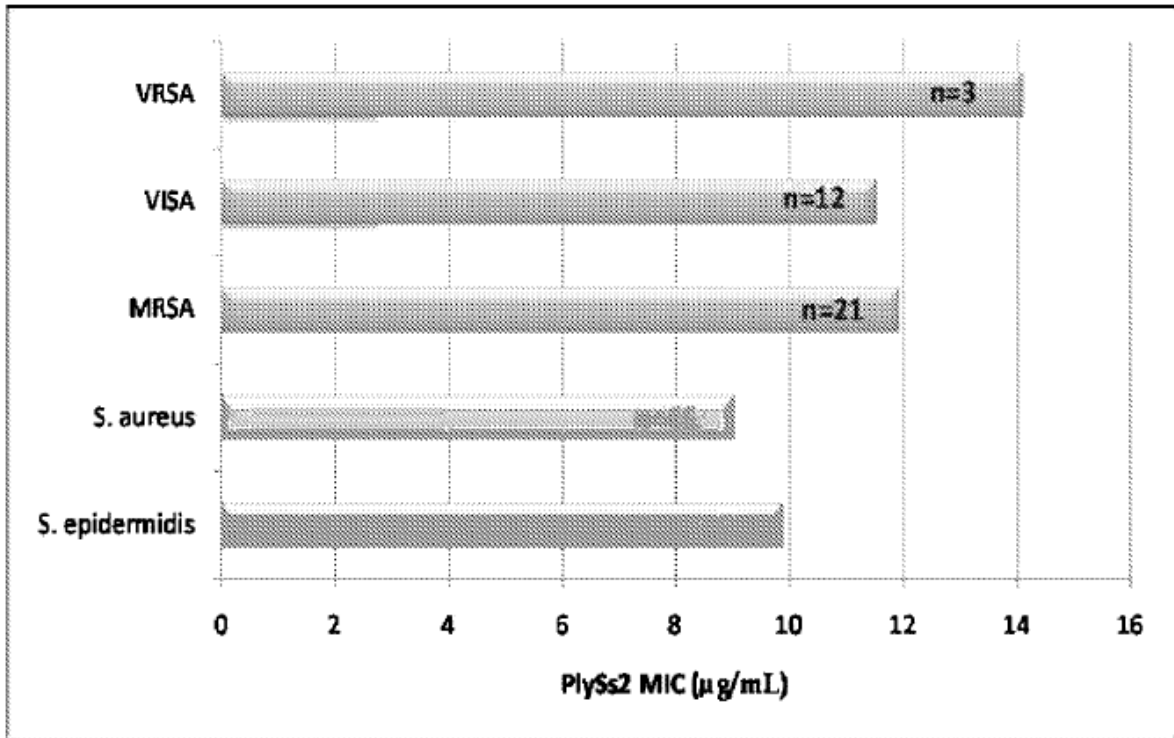
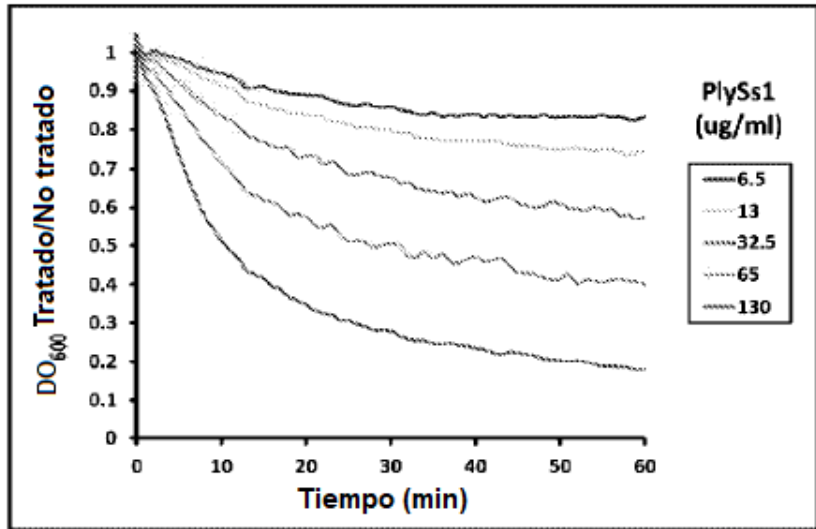
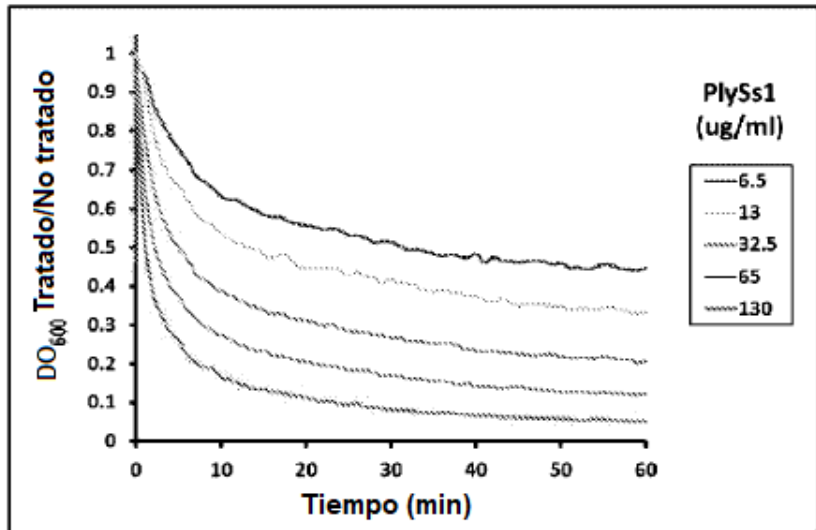


FIGURA 19

7711:
Serotipo 7
(cepa codificante)



S735
Serotipo 2
(cepa tipo)



7997
Serotipo 9

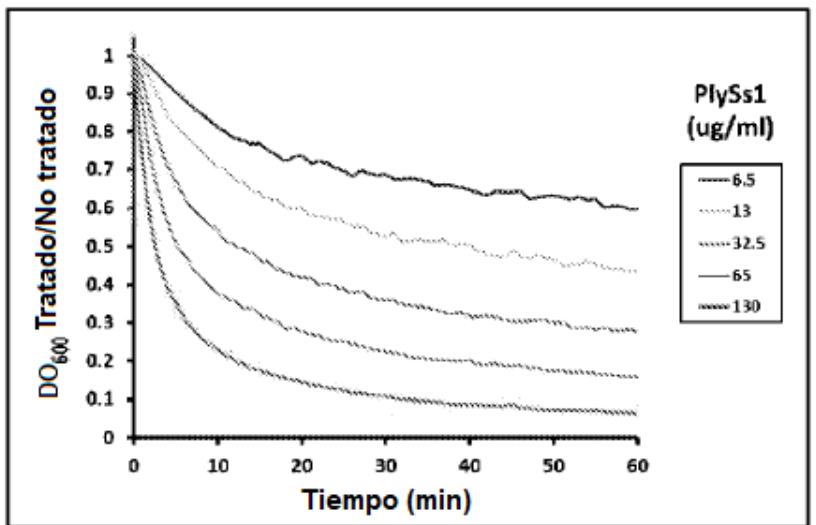


FIGURA 20

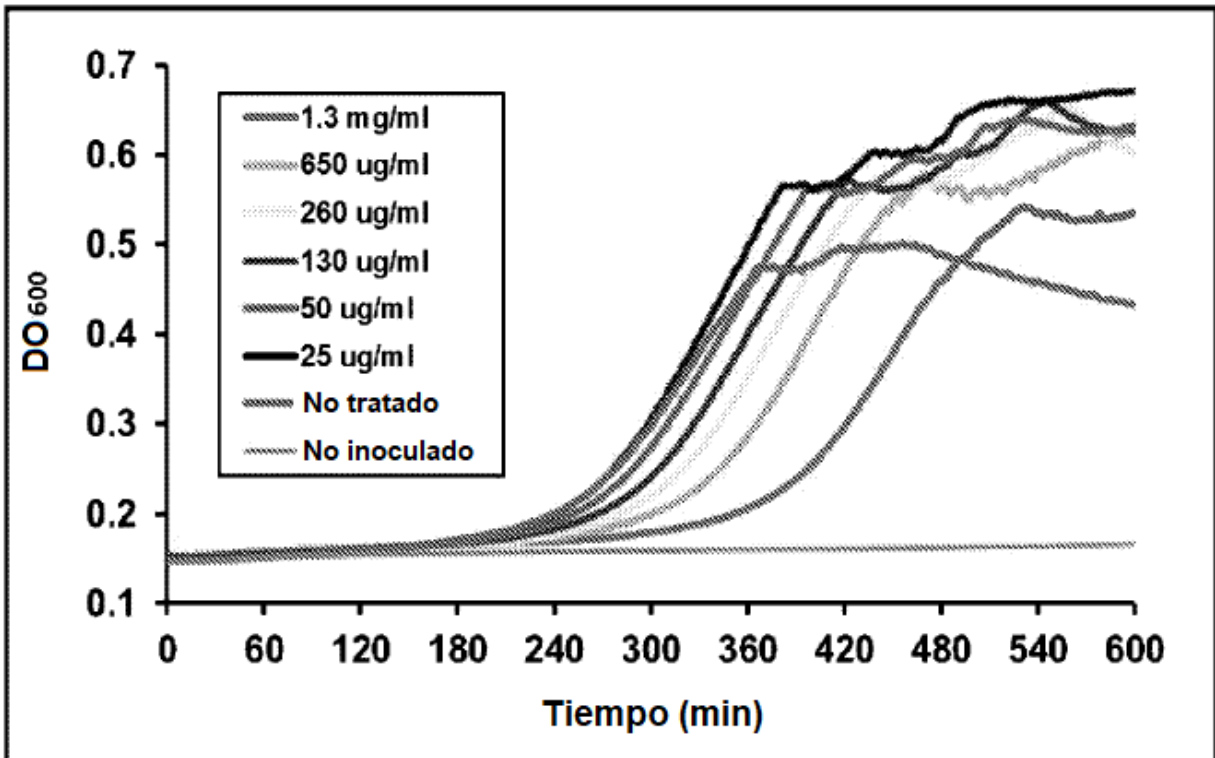


FIGURA 21

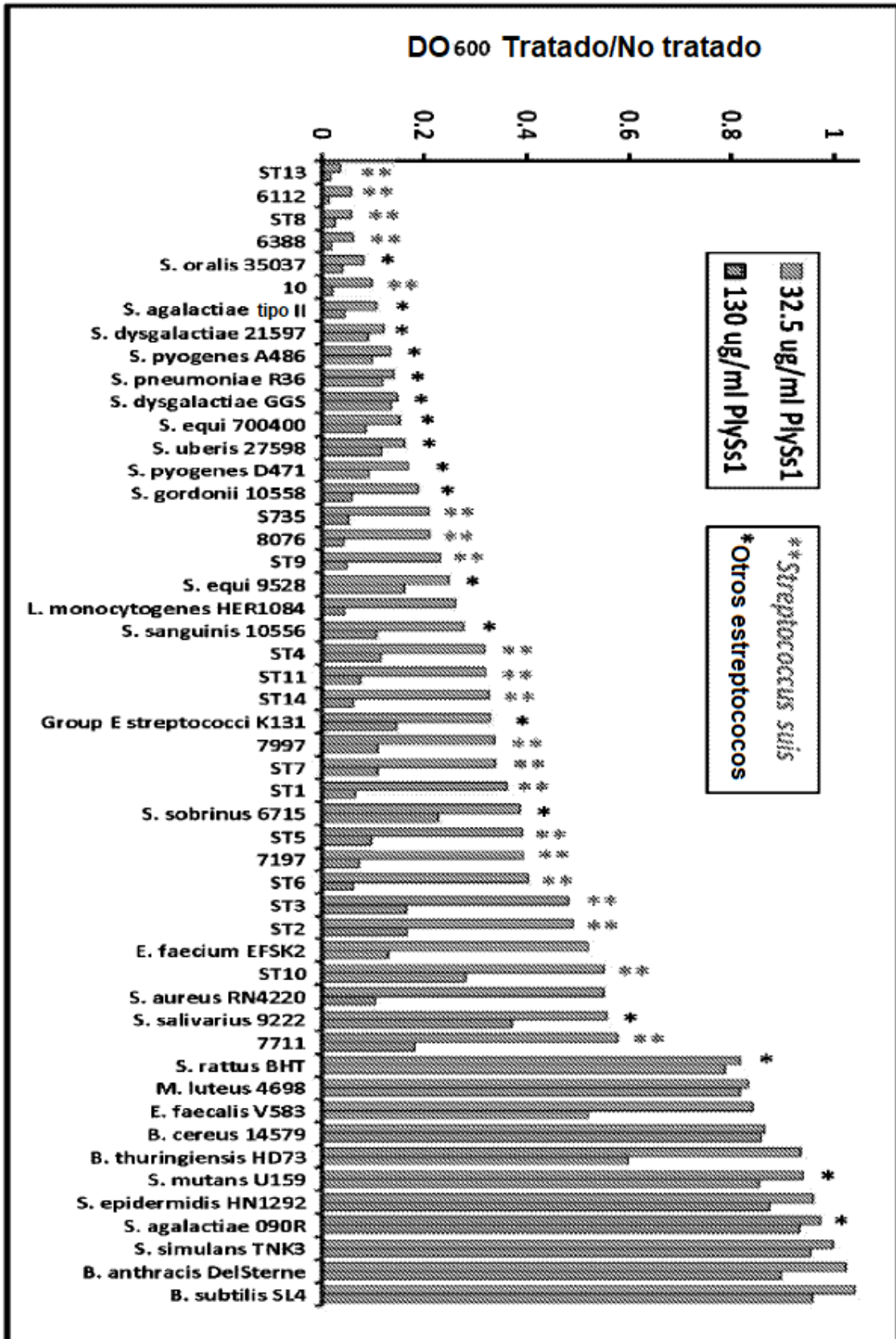


FIGURA 22

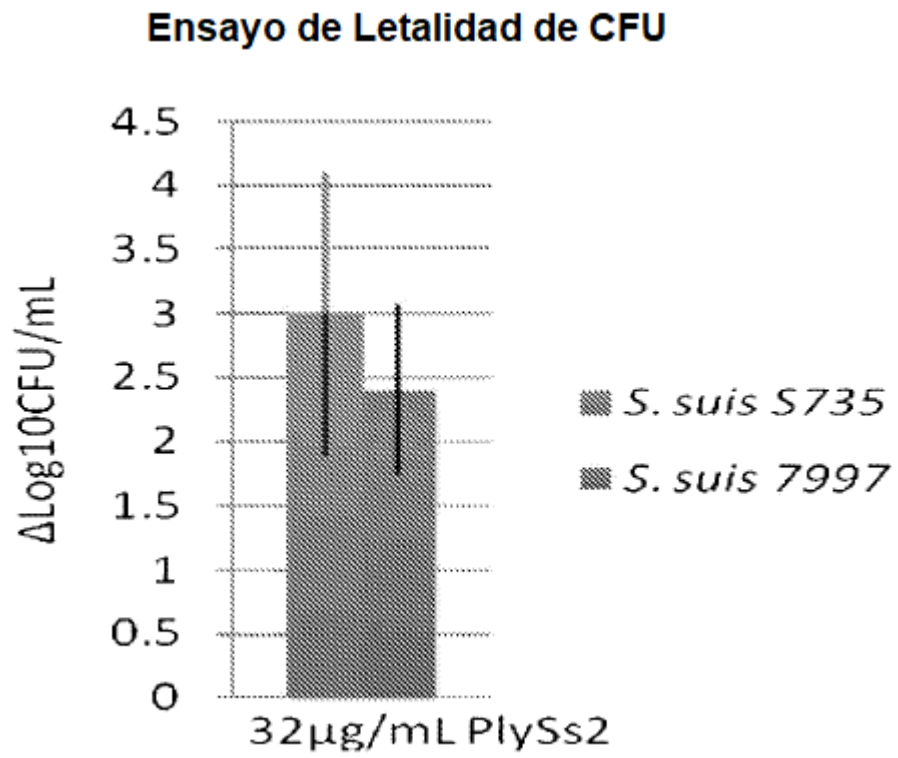


FIGURA 23

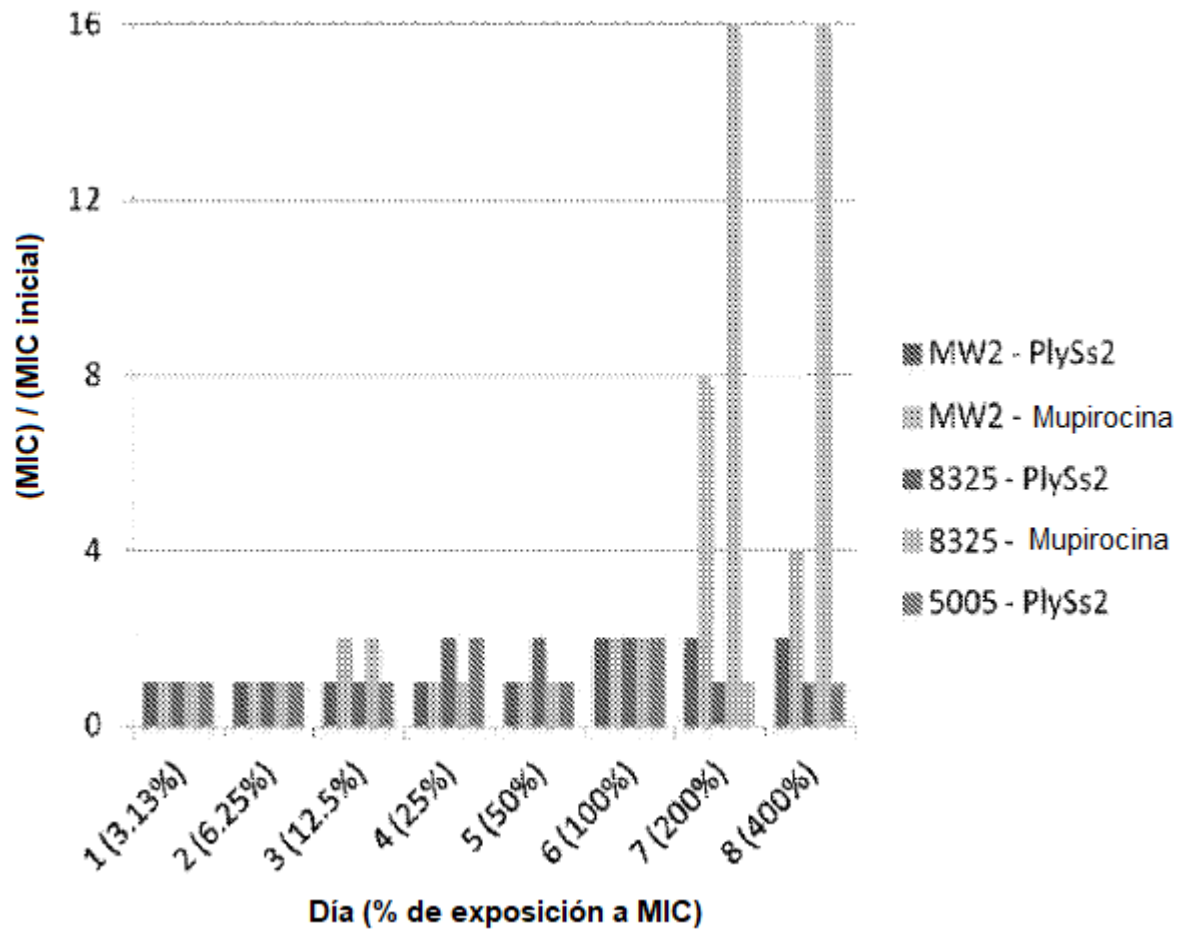
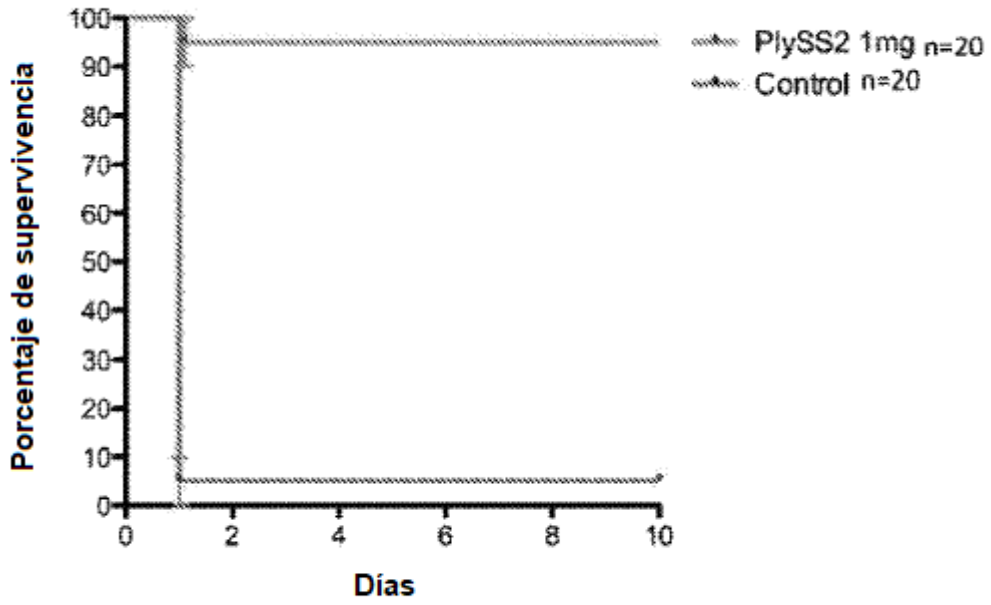


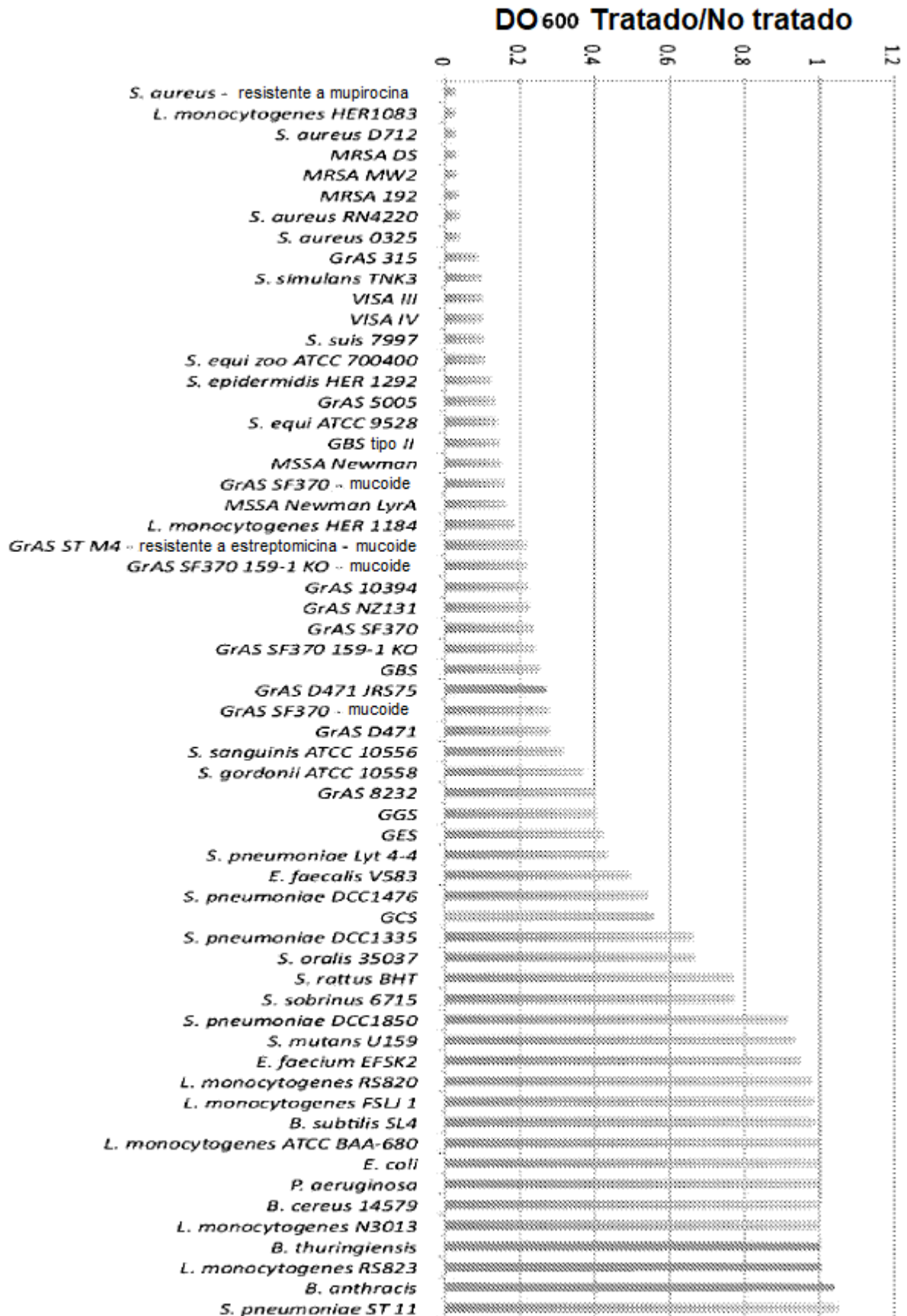
FIGURA 24

Supervivencia de Ratones con Bacteremia de MRSA



Ensayo de rango logarítmico (Mantel-Cox) val. P = 0,0001

FIGURA 25



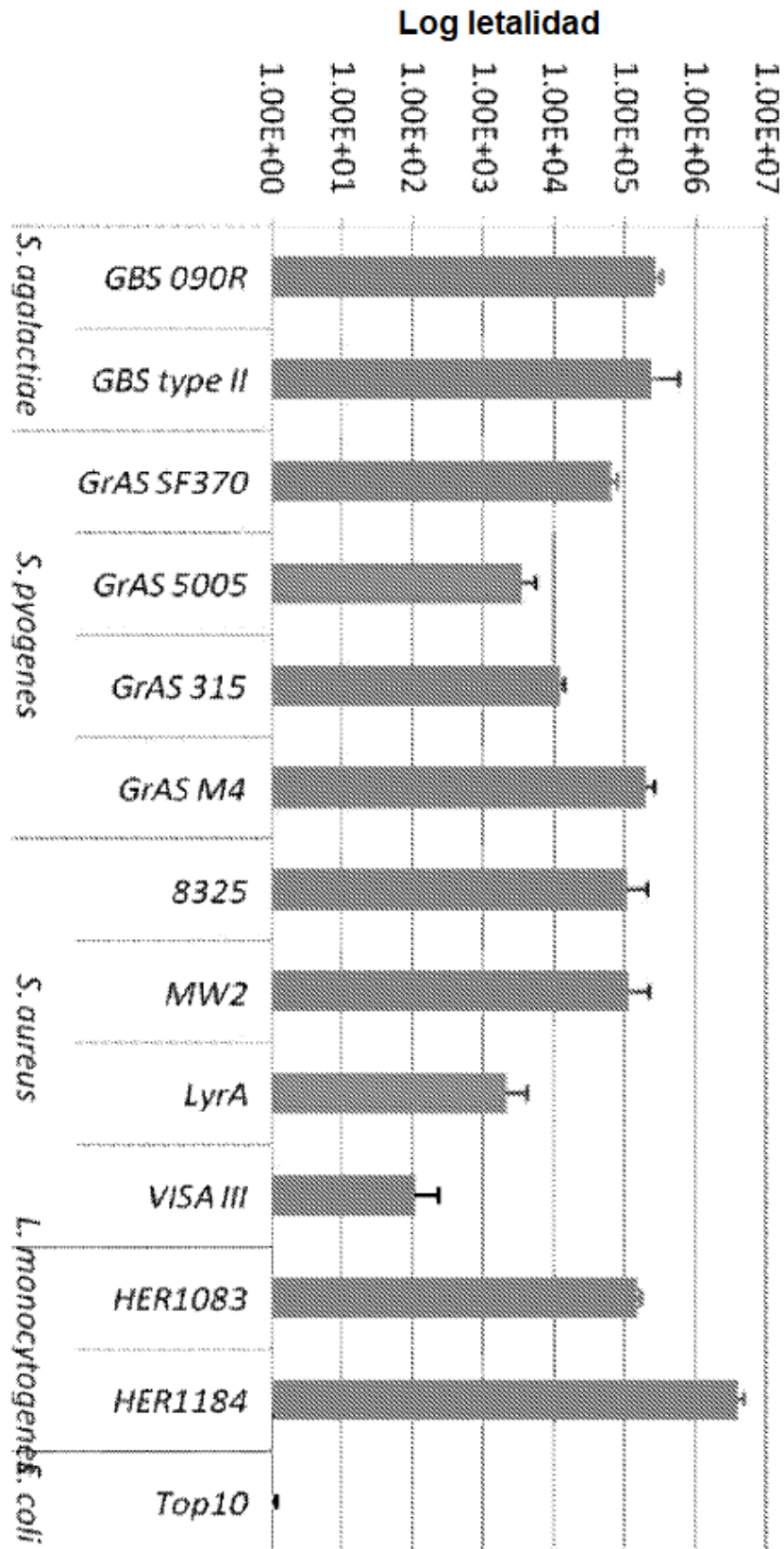


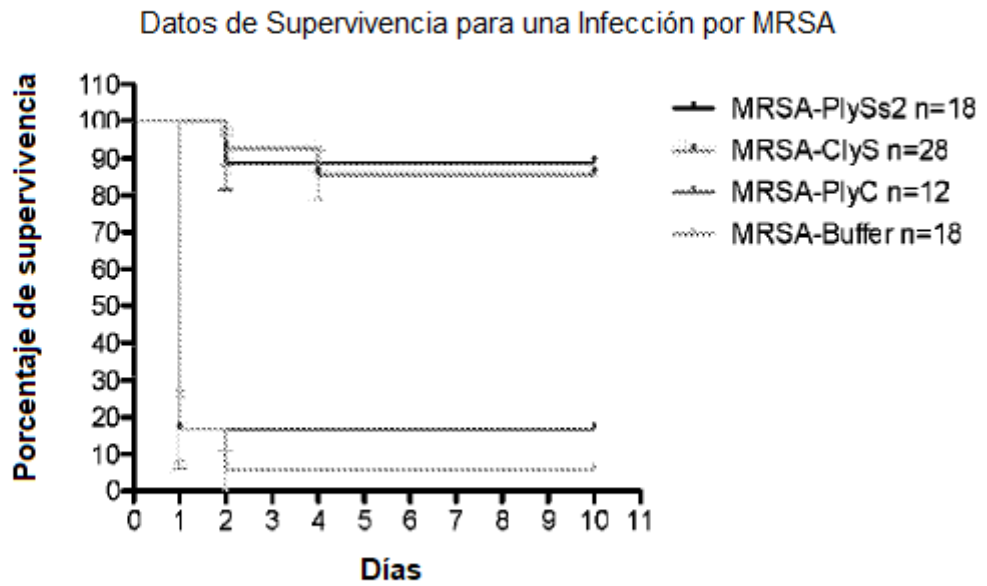
FIGURA 26

FIGURA 27

Especie	Cepa	MIC (visual) ug/ml	MIC (colorimétrico (ug/ml)
<i>S. agalactiae</i>	GBS 090R	256-128	256-128
	GBS tipo II	512	512
<i>S. pyogenes</i>	GrAS SF370	256-128	256-128
	GrAS 5005	256-128	256-128
<i>S. aureus</i>	8325	16	16
	MW2	16	32-16
	LyrA	64-32	64-32
	VISA III	32	>1,024
<i>L. monocytogenes</i>	HER1083	8	16-8
	HER1184	8	16-8
<i>E. coli</i>	Top10	>1,024	>1,024

FIGURA 28A y 28B

A



B

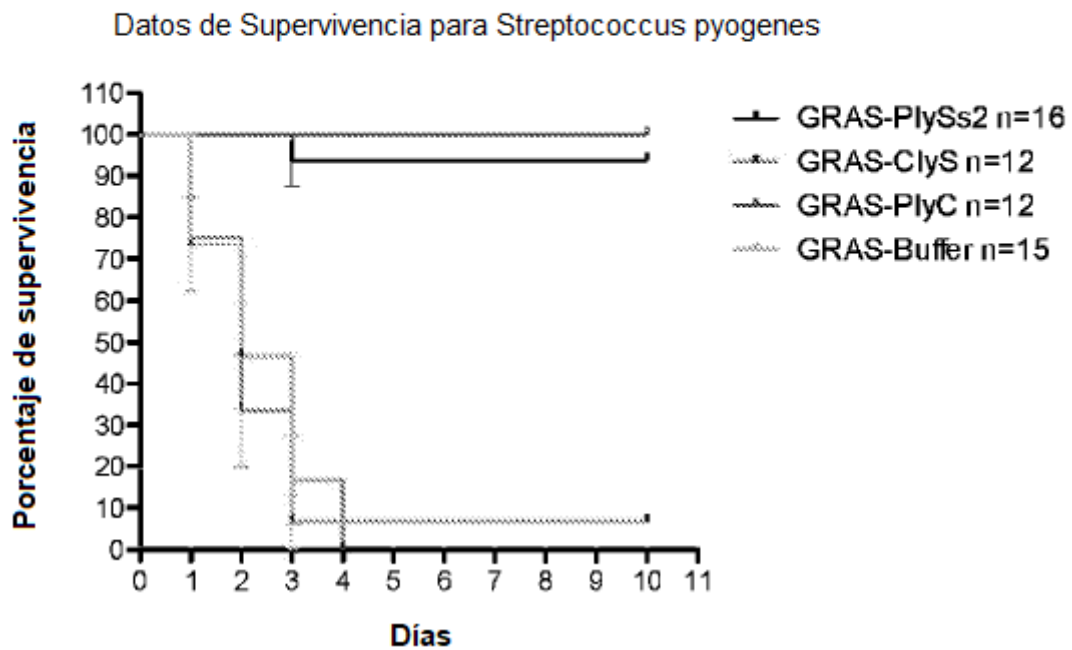


FIGURA 28C

C

Datos de Supervivencia para una Infección Mixta

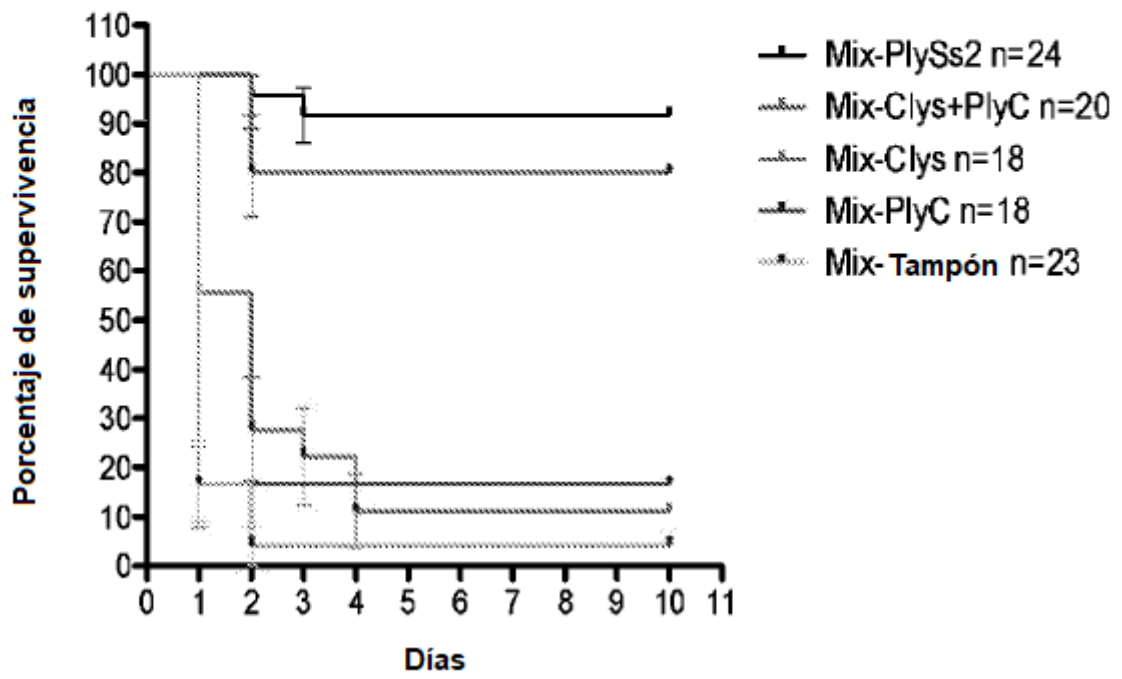
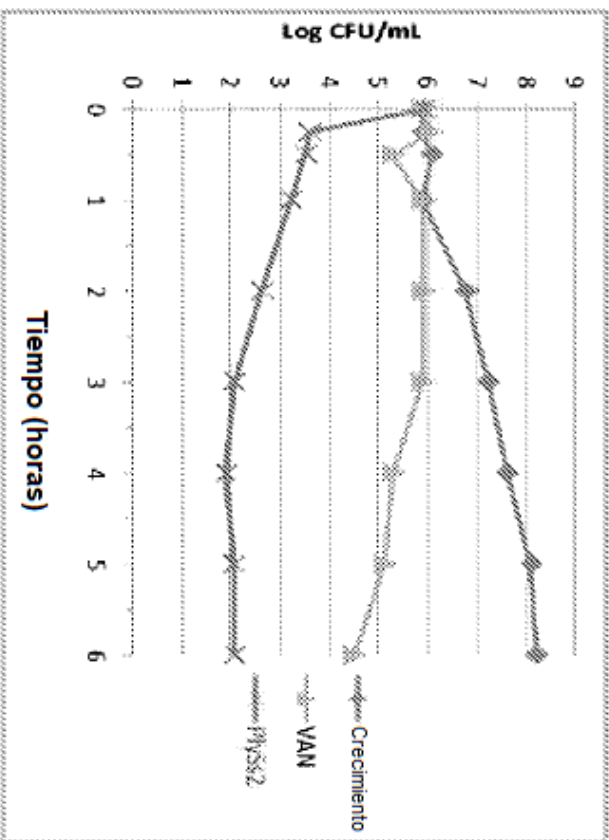
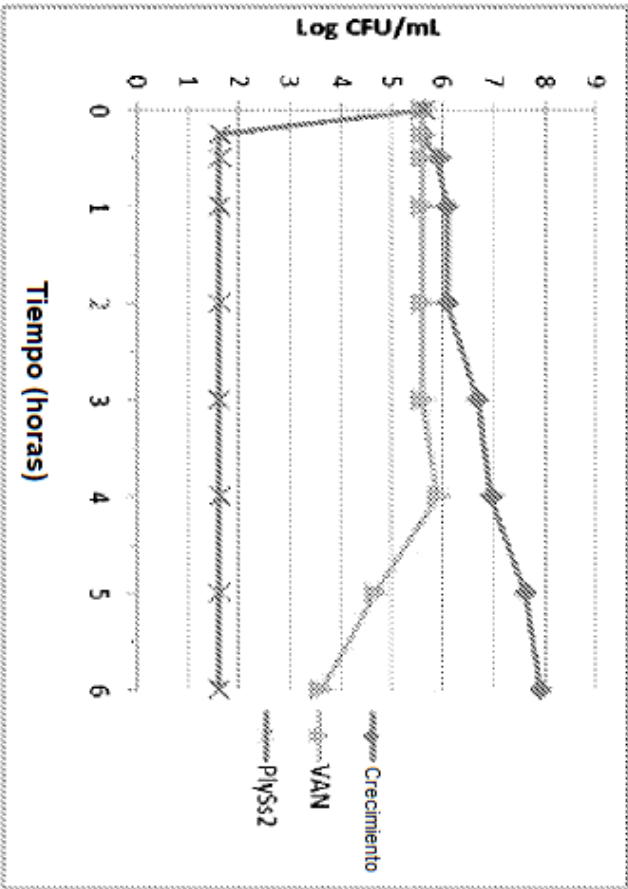


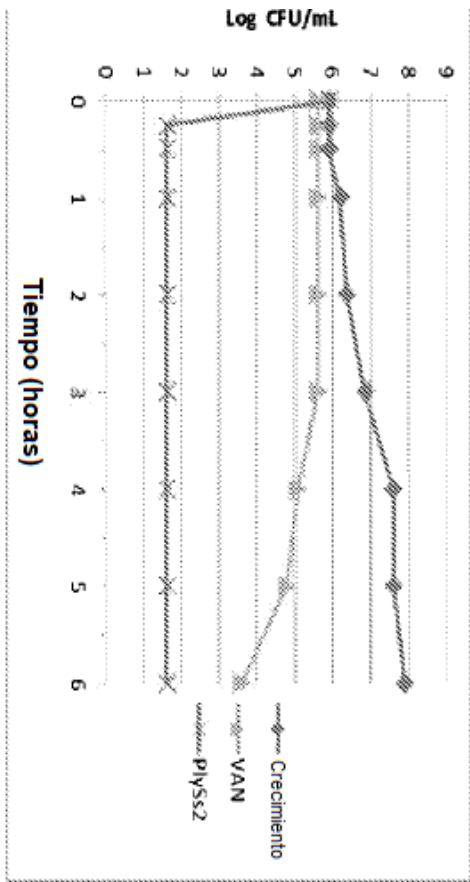
FIGURA 29

Cepa 245

Cepa 223



Cepa 926



Cepa 932

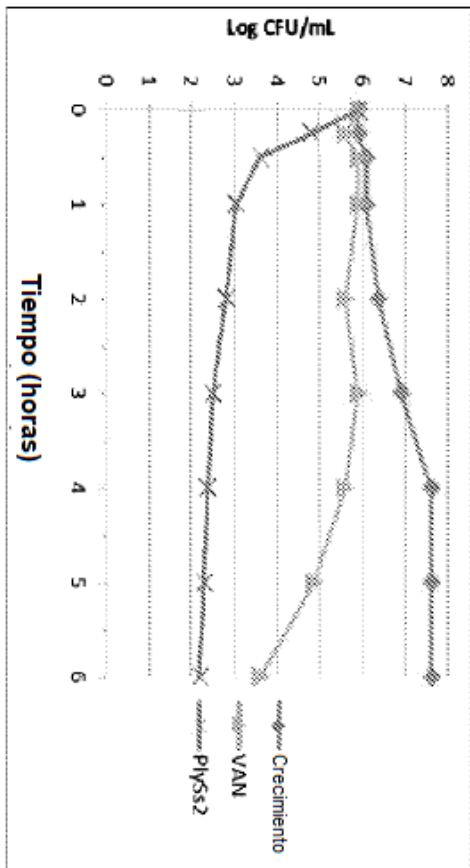


FIGURA 30

```

PIySS2 TVNEALNNVRAQVGSGVSVNGECIALASWTERMI SPDATVGLGAGVGWVSGAIGDTISA
PIyC   ----NLANAQAVG--KYIGDGQCIAWTGMTSARVCG-YSISYSTGDPMLP-LIGDQMA
      * * : : * * * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
      * * : : * * * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
      * * : : * * * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
          ↑
PIySS2 KNIGSSYNWQAN-----GWTYSTSG---PEKAGQIVLGA1PGNP-----YGHVVIWEAV
PIyC   HSIHLGMDWSIANTGIWNYPVSTVGRKEDLRVGA1WCATA1FSGAPFYTGQYGH1I1ESW
      : : * * : : : * * : : * * * : : * * * : : * * * : : * * * : : * * : : * :
          ↑
PIySS2 DGDRLLILEQNYGGKRYPVRNYSASAS1RQV1VHYI----
PIyC   SD1TVTVLEQNL1G-SPV1KRSTYD1LNTFL1STL1GL1TFK
      : : : * : * * * * * * : * * * * : : * : * : * : * : * : * : *
  
```