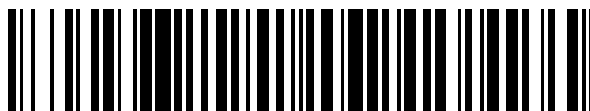


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 123**

51 Int. Cl.:

A61K 39/085 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2013 PCT/US2013/040340**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13170022**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2013 E 13787555 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019 EP 2846827**

54 Título: **Rotura de biopelícula con lisina plyss2**

30 Prioridad:

09.05.2012 US 201261644799 P
13.12.2012 US 201261736813 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.10.2019

73 Titular/es:

CONTRAFECT CORPORATION (100.0%)
28 Wells Avenue, 3rd Floor
Yonkers, NY 10701, US

72 Inventor/es:

SCHUCH, RAYMOND;
NOWINSKI, ROBERT C.;
WITTEKIND, MICHAEL;
KHAN, BABAR y
ROTOLO, JIMMY

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 729 123 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

Rotura de biopelícula con lisina plyss2

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere generalmente a la prevención, el control, la rotura y el tratamiento de biopelículas bacterianas con lisina, particularmente lisina que tiene capacidad para matar bacterias estafilocócicas, incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a fármacos, particularmente la lisina PlySs2. La invención también se refiere a composiciones y procedimientos para la modulación de biopelícula(s) bacterianas y la formación de biopelícula.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El desarrollo de bacterias resistentes a fármacos es un problema importante en la medicina, ya que se usan más antibióticos para una amplia variedad de enfermedades y otras afecciones. El uso de más antibióticos y el número de bacterias que presentan resistencia han dado lugar a tiempos de tratamiento más largos. Asimismo, actualmente se están usando más frecuentemente antibióticos no específicos de amplio espectro, algunos de los cuales tienen efectos nocivos sobre el paciente. Un problema relacionado con este uso aumentado es que muchos antibióticos no penetran fácilmente los revestimientos mucosos.

Las bacterias gram positivas están rodeadas por una pared celular que contiene polipéptidos y polisacárido. Las bacterias gram positivas incluyen, pero no se limitan 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 *Bacillus*, que son formadoras de esporas, provocan ántrax y gastroenteritis. Las especies *Clostridium* formadoras de esporas son responsables del botulismo, el tétanos, la gangrena gaseosa y la colitis pseudomembranosa. Las especies *Corynebacterium* provocan difteria y las especies *Listeria* provocan meningitis.

Las estrategias de terapia antimicrobiana novedosas incluyen antibióticos a base de enzimas («enzibióticos») tales como lisinas de bacteriófago. Los fagos usan estas lisinas para digerir la pared celular de sus huéspedes bacterianos, lo que libera la progenie viral por medio de lisis hipotónica. Un resultado similar se obtiene cuando se añaden lisinas recombinantes purificadas externamente a bacterias Gram positivas. La alta actividad letal de las lisinas contra patógenos gram positivos las hace candidatas atractivas para el desarrollo como agentes terapéuticos (Fischetti, V.A. (2008) Curr Opin Microbiol 11:393-400; Nelson, D.L. y col. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:4107-4112). Las lisinas de bacteriófago se propusieron inicialmente para erradicar el transporte nasofaríngeo de estreptococos patógenos (Loeffler, J. M. y col. (2001) Science 294: 2170-2172; Nelson, D. y col. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:4107-4112). Las lisinas son parte del mecanismo lítico usado por el fago de ADN bicatenario (ADNbc) para coordinar la lisis del huésped con la finalización del ensamblaje viral (Wang, I. N. y col. (2000) Annu Rev Microbiol 54:799-825). Las lisinas son hidrolasas de peptidoglicano que rompen enlaces en la pared bacteriana, hidrolizando rápidamente enlaces covalentes esenciales para la integridad del peptidoglicano, lo que provoca la lisis bacteriana y la liberación concomitante del fago progenie.

Los miembros de la familia lisinas presentan un diseño modular en el que un dominio catalítico está fusionado a un dominio de especificidad o unión (López, R. y col. (1997) Microb Drug Resist 3:199-211). Las lisinas pueden clonarse a partir de secuencias de profago viral dentro de los genomas bacterianos y usarse para tratamiento (Beres, S.B. y col. (2007) PLoS ONE 2(8):1-14). Cuando se añaden externamente, las lisinas son capaces acceder a los enlaces de una pared celular de Gram positiva (Fischetti, V.A. (2008) Curr Opin Microbiol 11:393-400). Las enzimas líticas de bacteriófago se han consolidado como útiles en la evaluación y el tratamiento específico de diversos tipos de infección en sujetos y por medio de diversas vías de administración. Por ejemplo, la patente de EE. UU. 5.604.109 (Fischetti y col.) se refiere a la detección rápida de estreptococos del Grupo A en especímenes clínicos, por medio de la digestión enzimática por una enzima lisina asociada a fago estreptocócico del Grupo C semipurificada. Este trabajo de la enzima se convirtió en la base de investigación adicional, lo que condujo a procedimientos de tratamiento de enfermedades. Las patentes de Fischetti y Loomis (patentes de EE. UU. 5.985.271, 6.017.528 y 6.056.955) describen el uso de una enzima lisina producida por bacterias estreptocócicas del Grupo C infectadas con un bacteriófago C1. La patente de EE. UU. 6.248.324 (Fischetti y Loomis) describe una composición para infecciones dermatológicas mediante el uso de una enzima lítica en un vehículo adecuado para aplicación tópica a tejidos dérmicos. La patente de EE. UU. 6.254.866 (Fischetti y Loomis) describe un procedimiento para el tratamiento de infecciones bacterianas del tracto digestivo que comprende administrar una enzima lítica específica para las bacterias infecciosas. El vehículo para entregar al menos una enzima lítica al tracto digestivo se

selecciona del grupo que consiste en supositorios, enemas, jarabes o píldoras con revestimiento entérico. La patente EE. UU. 6.264.945 (Fischetti y Loomis) describe un procedimiento y una composición para el tratamiento de infecciones bacterianas, mediante 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 entregar la enzima lítica a un paciente.

Las enzimas líticas asociadas a fago se han identificado y clonado a partir de diversos bacteriófagos, cada uno mostró ser eficaz para matar cepas bacterianas específicas. Las patentes de EE. UU. 7.402.309, 7.638.600 y la solicitud PCT publicada WO2008/018854 proporcionan diferentes enzimas líticas asociadas a fago útiles como agentes antibacterianos para el tratamiento o la reducción de infecciones por *Bacillus anthracis*. La patente de EE. UU. 7.569.223 describe enzimas líticas para *Streptococcus pneumoniae*. Lisina útil para *Enterococcus* (*E. faecalis* y *E. faecium*), incluyendo cepas resistentes a vancomicina se describe en la patente de EE. UU. 7.582.291. La patente de EE. UU. 2008/0221035 describe lisinas Ply GBS mutantes altamente eficaces para matar estreptococos del Grupo B. Una lisina quimérica simbolizada ClyS, con actividad contra bacterias estafilocócicas, incluyendo *Staphylococcus aureus*, se detalla en WO 2010/002959. ClyS es específica para bacterias estafilocócicas y es inactiva contra estreptococos y otras bacterias gram positivas.

Con base en su rápida, potente y específica degradación de la pared celular y a sus propiedades bactericidas, las lisinas se han sugerido como agentes terapéuticos antimicrobianos para combatir patógenos Gram positivos atacando las paredes celulares de peptidoglicano expuestas desde el exterior de la célula (Fenton, M y col. (2010) Bioengineered Bugs 1:9-16; Nelson, D y col. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:4107-4112). Las eficacias de diversas lisinas como agentes únicos se han demostrado en modelos de roedor de faringitis (Nelson, D y col. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:4107-4112), neumonía (Witzenrath, M y col. (2009) Crit Care Med 37:642-649), otitis media (McCullers, J.A. y col. (2007) PLOS pathogens 3:0001-0003), abscesos (Pastagia, M y col. Antimicrobial agents and chemotherapy 55:738-744) bacteriemia (Loeffler, J.M. y col. (2003) Infection and Immunity 71:6199-6204), endocarditis (Entenza, J.M. y col. (2005) Antimicrobial agents and chemotherapy 49:4789-4792), y meningitis (Grandgirard, D y col. (2008) J Infect Dis 197:1519-1522). Además, las lisinas son generalmente específicas para sus especies huésped bacterianas y no lisan organismos no diana, incluyendo bacterias comensales humanas que pueden ser beneficiosas para la homeostasis gastrointestinal (Blaser, M. (2011) Nature 476:393-394; Willing, B.P. y col. (2011) Nature reviews. Microbiology 9:233-243).

Los microorganismos tienden a formar comunidades de biopelícula fijadas en la superficie como una estrategia de supervivencia importante en diferentes ambientes. Las biopelículas consisten en células microbianas y un amplio abanico de sustancias poliméricas extracelulares autogeneradas, incluyendo polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas (Flemming HC y col. (2007) J Bacteriol 189:7945-7947). Las biopelículas se encuentran en ambientes acuáticos naturales e industriales, tejidos, y materiales y dispositivos médicos (Costerton JW y col. (1994) J Bacteriol 176:2137-2142). Las biopelículas pueden estar formadas por una única cepa bacteriana, aunque la mayoría de biopelículas naturales están formadas por múltiples especies bacterianas (Yang L y col. (2011) Int J Oral Sci 3:74-81). Las aplicaciones de antibióticos con frecuencia son ineficaces para poblaciones de biopelícula debido a su exclusiva fisiología y barrera de matriz física.

Los estafilococos con frecuencia forman biopelículas, comunidades sésiles encerradas en una matriz extracelular que se adhiere a implantes biomédicos o tejido dañado y sano. Las infecciones asociadas a biopelículas son difíciles de tratar, y se estima que las bacterias sésiles en biopelículas son de 1000 a 1500 veces más resistentes a antibióticos que sus equivalentes planctónicas. Esta resistencia a antibióticos de las biopelículas con frecuencia conduce al fallo de la terapia antibiótica convencional y necesita la retirada de los dispositivos infectados. La lisostafina ha demostrado matar *S. aureus* en biopelículas y también ha roto la matriz extracelular de biopelículas de *S. aureus in vitro* sobre superficies de plástico y vidrio (Wu, JA y col. (2003) Antimicrob Agents and Chemoth 47(11):3407-3414). Esta rotura de biopelículas de *S. aureus* fue específica para *S. aureus* sensible a lisostafina y las biopelículas de *S. aureus* resistente a lisostafina no se vieron afectadas. Altas concentraciones de oxacilina (400 µg/ml), vancomicina (800 µg/ml) y clindamicina (800 µg/ml) no tuvieron efecto sobre las biopelículas de *S. aureus* consolidadas, incluso después de 24 h. La lisostafina también rompió biopelículas de *S. epidermidis*, sin embargo, se necesitaron concentraciones más altas. Se ha notificado la aplicación de lisinas de fago para la retirada de biopelículas estafilocócicas, con resultados mixtos. Se notificó que la lisina de bacteriófago SAL-2 retiraba biopelículas de *S. aureus* (Son JS y col. (2010) Appl Microbiol Biotechnol 86(5):1439-1449), mientras que en el caso de dos lisinas de fago similares, phi11 y phi12, mientras que phi11 hidrolizaba biopelículas estafilocócicas, phi12 era inactiva (Sass P y Bierbaum G (2007) Appl Environ Microbiol 73(1):347-352). Se han estudiado diversas combinaciones de enzimas para la retirada y desinfección de biopelículas bacterianas en diversos sistemas (Johansen C y col. (1997) Appl Environ Microbiol 63:3724-3728). Este procedimiento, sin embargo, necesita un mínimo de dos enzimas o agentes, una enzima o agente para la retirada de las bacterias adherentes de las

biopelículas y una segunda enzima o agente con actividad bactericida.

Es evidente a partir de las deficiencias y los problemas asociados a los agentes antibacterianos tradicionales actuales que todavía existe una necesidad en la técnica de agentes bacterianos específicos adicionales y modalidades terapéuticas y también de agentes de espectro más amplio, particularmente sin riesgos de resistencia adquirida, para el tratamiento, el control y la prevención eficaces y eficientes de biopelículas bacterianas. Cabe destacar que, hasta la fecha, ninguna lisina que demuestra actividad lítica contra múltiples especies diferentes de bacterias gram positivas patógenas y clínicamente relevantes, que es fácilmente fabricable y estable, y no tiene riesgo o tiene un riesgo limitado de resistencia, ha demostrado ser eficaz sobre biopelículas. Por consiguiente, existe una necesidad comercial de nuevas estrategias antibacterianas, especialmente de las que funcionan a través de modalidades nuevas o proporcionan medios nuevos para matar bacterias patógenas en biopelículas.

La mención de referencias en el presente documento no se debe interpretar como una admisión de que tal es técnica anterior a la presente invención.

RESUMEN DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan composiciones para la prevención, la rotura y el tratamiento de biopelículas bacterianas. En su aspecto más amplio, la presente invención proporciona el uso y la aplicación de una lisina que tiene amplia actividad letal contra bacterias *Staphylococcus* y *Streptococcus*, particularmente cepas bacterianas de *Streptococcus pyogenes* (estrep. del Grupo A) y *Streptococcus agalactiae* (estrep. del Grupo B), en la prevención, la rotura y el tratamiento de biopelículas. La invención proporciona una composición que comprende un polipéptido de lisina capaz de matar bacterias *Staphylococcus* y *Streptococcus* para uso en un procedimiento para tratar o prevenir infecciones bacterianas gram positivas por bacterias *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* donde las bacterias *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* están en una biopelícula y donde el polipéptido de lisina comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o variantes de la misma que tienen al menos identidad de 80 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1 y es eficaz para matar las bacterias *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* en la biopelícula y donde la biopelícula se dispersa o trata eficazmente. La invención contempla por tanto el tratamiento, la descolonización y/o la descontaminación de biopelículas bacterianas y la prevención de infecciones después de la dispersión de la(s) biopelícula(s) donde se sospecha o está presente una o más de bacterias *Staphylococcus* y *Streptococcus*.

De acuerdo con la presente invención, la lisina de bacteriófago procedente de bacterias *Streptococcus suis* se utiliza en los procedimientos y las aplicaciones de la invención. El(los) polipéptido(s) de uso en la presente invención, particularmente lisina PlySs2 como se proporciona en el presente documento y en la figura 5 (SEQ ID NO: 1), son exclusivos en demostrar amplia actividad letal contra cepas bacterianas de *Staphylococcus* y *Streptococcus*. En tal aspecto, la lisina PlySs2 es capaz de matar cepas y bacterias de *Staphylococcus aureus* en biopelículas, como se demuestra en el presente documento. PlySs2 es eficaz contra bacterias resistentes a antibióticos, incluyendo *Staphylococcus aureus* tales como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (SARV), *Staphylococcus aureus* resistente a daptomicina (SARD) y *Staphylococcus aureus* resistente a linezolid (SARL). PlySs2 es eficaz contra bacterias con sensibilidad a antibióticos alterada tales como *Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia a vancomicina (SAIV).

En un aspecto de la invención, se proporciona el uso *ex vivo* o *in vitro* de una composición que comprende un polipéptido de lisina capaz de matar estafilococos y estreptococos para prevenir o reducir la formación de biopelícula bacteriana de *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* sobre un dispositivo médico, catéter o implante o la fijación y el crecimiento de bacterias *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* sobre el dispositivo médico, catéter o implante donde el polipéptido de lisina comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o variantes de la misma que tienen al menos identidad de 80 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1 y es eficaz para prevenir o reducir la formación de biopelícula bacteriana de *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* o la fijación y el crecimiento de bacterias *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* sobre el dispositivo médico, catéter o implante y donde el dispositivo médico, catéter o implante se pone en contacto con dicha composición.

En un aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido de lisina capaz de matar bacterias *Staphylococcus* y *Streptococcus* para uso en un procedimiento para tratar o prevenir infecciones bacterianas por *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* donde las bacterias *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* están en una biopelícula y donde el polipéptido de lisina comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o variantes de la misma que tienen al menos identidad de 80 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1 y es eficaz para matar las bacterias *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* en la biopelícula y donde la biopelícula se rompe o trata eficazmente.

En un aspecto de la invención, se proporciona el uso de un polipéptido de lisina capaz de matar bacterias *Staphylococcus* y *Streptococcus* para romper o tratar una biopelícula bacteriana gram positiva de bacterias *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* donde el polipéptido de lisina comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o variantes de la misma que tienen al menos identidad de 80 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1 y es eficaz para matar las bacterias *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* en la biopelícula, donde el uso es *in vitro* o *ex vivo* y donde la biopelícula se dispersa o trata eficazmente.

La invención proporciona una composición que comprende un polipéptido de lisina capaz de matar bacterias *Staphylococcus* y *Streptococcus* para uso en un procedimiento para tratar una infección por *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos que implica o incluye una biopelícula en un humano donde el polipéptido de lisina comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o variantes de la misma que tienen al menos identidad de 80 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1 y es eficaz para matar las bacterias *Staphylococcus* en la biopelícula, que comprende la etapa de administrar a un humano con una infección por biopelícula de *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos, una cantidad eficaz de la composición mediante la cual el número de *Staphylococcus aureus* en el humano se reduce y la biopelícula y la infección consiguiente se controlan.

En un aspecto particular de la invención, un sujeto se expone a, o está en riesgo de, una o más de bacterias *Staphylococcus* (tal como *Staphylococcus aureus*), *Streptococcus* (particularmente estrept. del Grupo A o estrept. del Grupo B tales como *Streptococcus pyogenes* o *Streptococcus agalactiae*, respectivamente). El sujeto puede ser un ser humano. El sujeto puede ser un adulto, niño, lactante o feto humano.

En cualquiera de los aspectos expuestos anteriormente, las bacterias de biopelícula susceptibles, muertas, dispersadas o tratadas se pueden seleccionar entre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus equi zoo*, *Streptococcus agalactiae* (GBS), *Streptococcus pyogenes* (GAS), *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus* del Grupo G, *Streptococcus* del grupo E, y *Streptococcus pneumoniae*.

De acuerdo con cualquiera de los procedimientos de la invención, la bacteria o bacteria de biopelícula susceptible puede ser una bacteria resistente a antibiótico. La bacteria puede ser resistente a antibióticos, incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (SARV), *Staphylococcus aureus* resistente a daptomicina (SARD) o *Staphylococcus aureus* resistente a linezolid (SARL). La bacteria puede tener sensibilidad a antibióticos alterada, tal como, por ejemplo, *Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia a vancomicina (SAIV). La bacteria susceptible puede ser una bacteria clínicamente relevante o patógena, particularmente para humanos. En un aspecto del procedimiento(s), el(los) polipéptido(s) de lisina son eficaces para matar cepas bacterianas de *Staphylococcus* y *Streptococcus*.

Se ha demostrado que el revestimiento de implantes médicos con antimicrobianos puede prevenir eficazmente la adherencia inicial de biopelículas estafilocócicas a los implantes. El revestimiento de materiales biomédicos con lisina también puede resultar exitoso para prevenir la adherencia temprana de bacterias, incluyendo estafilococos, a los implantes, lo que evita, por tanto, la formación de biopelícula. La presente invención, por tanto, también proporciona procedimientos para reducir o prevenir el crecimiento de biopelícula sobre la superficie de dispositivos, implantes,

membranas de separación (por ejemplo, membranas de pervaporación, diálisis, ósmosis inversa, ultrafiltración y microfiltración) administrando o revistiendo con la lisina de la invención, incluyendo lisina PlySs2.

Se puede(n) utilizar lisina(s) activa(s) y adecuada(s) alternativa(s) de acuerdo con los procedimientos y las composiciones de la presente invención, incluyendo como la(s) lisina(s) de uso y/o como una o más lisinas eficaces y útiles adicionales. En un aspecto o realización adicional de los procedimientos y usos proporcionados en el presente documento, la lisina ClyS estafilocócica específica se usa en el presente documento sola o en combinación con la lisina PlySs2 como se proporciona y describe en el presente documento.

Otros objetivos y ventajas resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de un repaso de la siguiente descripción, que procede con referencia a los siguientes dibujos ilustrativos.

55 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La figura 1 representa biopelículas de SARM BAA-42 tratadas con daptomicina, vancomicina, lisina PlySs2 o linezolid en las cantidades y durante los tiempos indicados hasta 4 horas. Los antibióticos daptomicina, vancomicina y linezolid se añadieron a 1000XCMI para cada antibiótico. PlySs2 se añadió a 1XCMI. Después del tratamiento, las biopelículas se visualizaron con violeta cristal.

La figura 2 representa biopelículas de SARM BAA-42 tratadas con daptomicina, vancomicina, lisina PlySs2 o linezolid en las cantidades y durante los tiempos indicados hasta 6 horas. Después del tratamiento, las biopelículas se visualizaron con violeta cristal.

La figura 3 representa biopelículas de SARM BAA-42 tratadas con daptomicina, vancomicina, lisina PlySs2 o linezolid en las cantidades y durante los tiempos indicados hasta 24 horas. Después del tratamiento, las biopelículas se visualizaron con violeta cristal.

La figura 4 representa biopelículas de SARM BAA-42 en placas de 24 pocillos tratadas con lisina PlySs2 o daptomicina durante 0,5 h, 1 h, 4 h y 24 h en las cantidades de dosificación indicadas. Después del tratamiento, las biopelículas se visualizaron con violeta cristal.

10 La figura 5 proporciona la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de ácido nucleico codificador (SEQ ID NO: 2) de la lisina PlySs2. El dominio CHAP N-terminal y el dominio SH-3 C-terminal de la lisina PlySs2 están sombreados, con el dominio CHAP empezando con LNN... Y terminando con ...YIT (SEQ ID NO: 3) y el dominio SH-3 empezando con RSY... y terminando con ...VAT (SEQ ID NO: 4). Los residuos del sitio activo del dominio CHAP (Cys₂₆, His₁₀₂, Glu₁₁₈ y Asn₁₂₀) identificados mediante homología a PDB 2K3A (Rossi P y col. (2009) Proteins 74:515-519) están subrayados.

La figura 6 proporciona un análisis temporal de veinticuatro horas de la actividad de PlySs2 y antibiótico sobre biopelículas de SARM como se evalúa mediante tinción con violeta cristal. Los antibióticos daptomicina (DAP), vancomicina (VAN) y linezolid (LZD) se añadieron a 1000X CMI para cada antibiótico. PlySs2 se añadió a 1X CMI.

La figura 7 representa la cuantificación del tinte retenido como indicador de biopelícula retenida en un análisis temporal de veinticuatro horas de la actividad de PlySs2 y antibiótico sobre películas de SARM. Los antibióticos daptomicina (DAP), vancomicina (VAN) y linezolid (LZD) se añadieron a 1000X CMI para cada antibiótico. La lisina PlySs2 se añadió a 1X CMI.

La figura 8 presenta un periodo de tiempo de 24 horas de concentraciones sub-CMI de PlySs2 frente a medio solo sobre biopelículas de SARM como se evalúa mediante tinción con violeta cristal. PlySs2 se añadió a biopelícula de cepa de SARM BAA-42 a niveles de 0,1X CMI y 0,01X CMI.

La figura 9A y 9B representa estudios de erradicación de biopelícula contra el crecimiento de SARM sobre catéteres de DEPC. A: Las biopelículas del catéter se trataron con medio solo, 1X CMI de daptomicina, 1000X CMI de daptomicina y 1X CMI de PlySs2 durante 24 horas antes de purgar, teñir con azul de metileno y fotografiar. B: Después de 24 horas de tratamiento, las muestras de catéter por duplicado se trataron con tampón de lisis para retirar las biopelículas residuales y las UFC bacterianas se estimaron con base en unidades relativas de luz usando un reactivo de luciferasa calibrado frente a concentraciones conocidas de bacteria.

La figura 10 representa análisis de titulación de la tinción de biopelícula de SARM sobre catéter de DEPC con azul de metileno después de tratamiento de 4 horas con tampón o CMI tituladas de PlySs2 de 1X CMI, 0,1X CMI, 0,01X CMI, 0,001X CMI, 0,0001X CMI y 0,00001X CMI de PlySs2.

35 La figura 11 representa análisis de titulación de la tinción de biopelícula de SARM sobre catéter de DEPC con azul de metileno después de tratamiento de 4 horas con tampón o daptomicina (DAP) titulada a 5000X CMI, 1000X CMI, 100X CMI, 10X CMI, y 1X CMI.

La figura 12A y B muestra un análisis temporal de la actividad de PlySs2 contra biopelículas de SARM en catéteres de DEPC. A: los catéteres se trataron con 1X CMI de PlySs2 (32 µg/ml) durante 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 3 h, 4 h y 5 h antes de purgar, teñir con azul de metileno y fotografiar. B: Después de cada tratamiento cronometrado, las muestras de catéter por duplicado se trataron con tampón de lisis para retirar las biopelículas residuales y las UFC bacterianas se estimaron con base en unidades relativas de luz usando un reactivo de luciferasa calibrado frente a concentraciones conocidas de bacteria.

La figura 13 representa un análisis de titulación de recuentos de UFC de biopelícula de SARM sobre catéter de DEPC después de tratamientos de 4 horas de biopelículas sobre el catéter con las concentraciones de fármaco indicadas de acuerdo con los estudios presentados en las figuras 11 y 12. Las UFC bacterianas restantes después de los tratamientos con fármaco se estimaron con base en unidades relativas de luz usando un reactivo de luciferasa calibrado frente a concentraciones conocidas de bacteria. Las biopelículas formadas por cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-42 sobre los lúmenes de catéteres de di(2-etilhexil)ftalato (DEHP) se trataron durante 4 horas con las concentraciones indicadas de PlySs2 o daptomicina (DAP). Se incluyó solución de Ringer lactada sola como control. Después del tratamiento, los catéteres se drenaron y lavaron, y las unidades formadoras de colonias (UFC) se midieron usando un procedimiento basado en la liberación de trifosfato de adenosina (ATP) (kit de ensayo de viabilidad microbiana BacTiter-Glo™). La línea roja indica las concentraciones de DAP a 5000X la concentración mínima inhibitoria (CMI) y PlySs2 a 0,01X CMI que dieron como resultado reducciones prácticamente equivalentes en las biopelículas en los tubos de catéter tratados. Leyenda: * = Por debajo del umbral de detección.

La figura 14 representa la actividad de la lisina ClyS contra biopelícula de *S. aureus*. Las biopelículas de SARM BAA-42 se trataron con las concentraciones indicadas de lisina ClyS (1X CMI 32 µg/ml, 0,1X CMI 3,2 µg/ml, 0,01X CMI 0,32 µg/ml y 0,001X CMI 0,032 µg/ml) o medio solo durante 24 horas. Cada pocillo se lavó y teñió con 2 % de violeta cristal.

60 La figura 15 proporciona los resultados de estudios de biopelícula *in vivo* en ratones con implantes de catéter

subcutáneos tratados con lisina PlySs2 mediante diversos modos de administración. Las biopelículas se hicieron crecer sobre catéteres, el catéter se implantó en ratones y se trataron los ratones. Los catéteres se retiraron, tiñeron con azul de metileno y la tinción se cuantificó mediante absorbancia a 600 nm. La DO a 600 nm/g de catéter se representó gráficamente para cada control negativo (sin bacterias), control de PlySs2 (sin bacterias sometidas a tratamiento simulado), tratado con vehículo, PlySs2 administrada intraperitonealmente (IP), PlySs2 administrada por intravenosamente (IV) y PlySs2 administrada subcutáneamente (SC).

La figura 16 representa estudios temporales que evalúan el contenido luminal de biopelículas de catéter de SARM tratadas con lisina PlySs2 o daptomicina y que evalúan la viabilidad bacteriana y esterilización luminal a lo largo del tiempo con tratamiento de PlySs2 o antibiótico daptomicina.

- 10 La figura 17 representa análisis de titulación de un estudio de catéter con biopelícula bacteriana de cepa de *Staphylococcal epidermidis* CFS 313 (NRS34, una cepa de SEVI). La tinción de biopelícula con azul de metileno se presenta después de tratamiento de 4 horas con tampón o CMI tituladas de PlySs2 de 10X CMI, 1X CMI (8 µg/ml), 0,1X CMI, 0,01X CMI, 0,001X CMI y 0,0001X CMI de PlySs2.

- 15 La figura 18 representa un ensayo de prevención de biopelícula de bacterias SARM BAA-42 inoculadas en placas de 24 pocillos y combinadas inmediatamente con tampón o PlySs2 a 1X CMI (32 µg/ml), o diluciones señaladas hasta 0,0001X CMI. Las placas se incubaron durante 6 horas, se lavaron con PBS, se tiñeron con violeta cristal para evaluar la generación de biopelícula y se fotografiaron.

- La figura 19 representa análisis de titulación de tinción de biopelícula de cepa de SARM CFS 553 (ATCC 43300) con azul de metileno después de tratamiento de 4 horas con tampón o CMI tituladas de PlySs2 de 10X CMI, 1X CMI (16 µg/ml), 0,1X CMI, 0,01X CMI y 0,001X CMI de PlySs2.

- 20 La figura 20 representa análisis de titulación de tinción de biopelícula de cepa de SARM CFS 992 (JMI 5381) con azul de metileno después de tratamiento de 4 horas con tampón o CMI tituladas de PlySs2 de 10X CMI, 1X CMI (32 µg/ml), 0,1X CMI, 0,01X CMI y 0,001X CMI de PlySs2.

- 25 La figura 21 representa la microscopía electrónica de barrido (MEB) de biopelículas de *S. aureus* sobre catéter de 3 días tratadas con PlySs2, lavadas, fijadas y sometidas a barrido. Se muestran 0 minutos, 30 segundos y 15 minutos de tratamiento con PlySs2. Magnificación de 5000X.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 30 De acuerdo con la presente invención, pueden emplearse técnicas de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro del ámbito de la técnica. Tales técnicas se explican enteramente en la bibliografía. Véase, p. ej., Sambrook et al, «Molecular Cloning: A Laboratory Manual» (1989); «Current Protocols in Molecular Biology» Volumes I-III [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; «Cell Biology: A Laboratory Handbook» Volumes I-III [J. E. Celis, ed. (1994)]; «Current Protocols in Immunology» Volumes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; «Oligonucleotide Synthesis» (M.J. Gait ed. 1984); «Nucleic Acid Hybridization» [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; «Transcription And Translation» [B.D. Hames & 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 el presente documento, los términos siguientes tendrán las definiciones expuestas a continuación.

- Los términos «lisina(s) PlySs», «lisina PlySs2», «PlySs2» y cualquier variante no mencionada específicamente, se pueden usar indistintamente a lo largo del presente documento, y como se usan a lo largo de la presente solicitud y en las reivindicaciones se refieren a material proteínico que incluye proteínas únicas o múltiples, y se extiende a las proteínas que tienen los datos de secuencia de aminoácidos descritos en el presente documento y presentados en la figura 5 y en SEQ ID NO: 1, y el perfil de actividades expuesto en el presente documento y en las reivindicaciones. Por consiguiente, se contemplan asimismo proteínas que exhiben actividad sustancialmente equivalente o alterada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, tal como modificaciones obtenidas por medio de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como las obtenidas por medio de mutaciones en huéspedes que son productores del complejo o sus subunidades mencionadas. Asimismo, los términos «lisina(s) PlySs», «lisina PlySs2», «PlySs2» pretenden incluir dentro de su alcance proteínas mencionadas específicamente en el presente documento, así como todos los análogos, fragmentos o formas truncadas sustancialmente homólogos, y variaciones alélicas. La lisina PlySs2 se describe en la solicitud de patente de EE. UU. 61/477,836 y en la solicitud PCT/US2012/34456. En un documento más reciente, Gilmer y col. describen la lisina PlySs2 (Gilmer DB y col. (2013) Antimicrob Agents Chemother Epub 9 de abril de 2013 [PMID 23571534]).

- El término «ClyS», «lisina ClyS» se refiere a una lisina quimérica ClyS, con actividad contra bacterias estafilocócicas, incluyendo *Staphylococcus aureus*, se detalla en el documento WO 2010/002959 y también se describe en Daniel y col. (Daniel, A y col. (2010) Antimicrobial Agents and Chemother 54(4):1603-1612). Tal secuencia de aminoácidos ejemplar de ClyS se proporciona en SEQ ID NO: 5.

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

5

Una «enzima lítica de bacteriófago» se refiere a una enzima lítica extraída o aislada a partir de un bacteriófago, o una enzima lítica sintetizada con una estructura de proteína similar que mantiene una funcionalidad de enzima lítica.

Una enzima lítica es capaz de escindir específicamente enlaces que están presentes en el peptidoglicano de células bacterianas para romper la pared celular bacteriana. Actualmente también se postula que el peptidoglicano de la pared celular bacteriana está altamente conservado entre la mayoría de las bacterias y la escisión de solo unos pocos enlaces puede romper la pared celular bacteriana. La enzima lítica de bacteriófago puede ser una amidasa, aunque son posibles otros tipos de enzimas. Los ejemplos de enzimas líticas que escinden estos enlaces son muramidasa, glucosaminidasas, endopeptidasas, o N-acetil-muramoil-L-alanina amidasas. Fischetti y col. (1974) notificaron que la enzima lisina del fago estreptocócico C1 era una amidasa. García y col. (1987, 1990) notificaron que la lisina Cpl de *S. pneumoniae* de un fago Cp-1 era una lisozima. Caldentey y Bamford (1992) notificaron que una enzima lítica del fago phi 6 de *Pseudomonas* era una endopeptidasa, que separaba el puente peptídico formado por ácido melo-diaminopimílico y D-alanina. Las enzimas líticas de fago T1 y T6 de *E. coli* son amidasas como lo es la enzima lítica de fago de *Listeria* (ply) (Loessner y col., 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 una bacteria huésped, por ejemplo teniendo al menos algo de actividad lítica de pared celular contra la bacteria huésped. El polipéptido puede tener una secuencia que abarca la enzima lítica de secuencia nativa y variantes de la misma. El polipéptido se puede aislar a partir de una variedad de fuentes, tal como de un bacteriófago («fago»), o preparar mediante procedimientos recombinantes o sintéticos. El polipéptido puede comprender una porción de unión de colina en el lado terminal carboxilo y puede caracterizarse por una actividad enzimática capaz de escindir el peptidoglicano de pared celular (tal como actividad amidasa para actuar sobre enlaces amida en el peptidoglicano) en el lado terminal amino. Se han descrito enzimas líticas que incluyen múltiples actividades enzimáticas, por ejemplo, dos dominios enzimáticos, tales como lisina PlyGBS.

«Una enzima lítica asociada a fago de secuencia nativa» incluye un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que una enzima procedente de una bacteria. Tal enzima de secuencia nativa se puede aislar o se puede producir por medios recombinantes o sintéticos.

35

El término «enzima de secuencia nativa» abarca formas presentes en la naturaleza (p. ej., formas de empalme alternativo o alteradas) y variantes presentes en la naturaleza 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 López y col., Microbial Drug Resistance 3: 199-211 (1997); García y col., Gene 86: 81-88 (1990); García y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 85: 914-918 (1988); García y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 85: 914-918 (1988); García y col., Streptococcal Genetics (J. J. Ferretti and Curtis eds., 1987); López y col., FEMS Microbiol. Lett. 100: 439-448 (1992); Romero y col., J. Bacteriol. 172: 5064-5070 (1990); Ronda y col., Eur. J. Biochem. 164: 621-624 (1987) y Sánchez y col., Gene 61: 13-19 (1987). El contenido de cada una de estas referencias, particularmente los listados de secuencias y el texto asociado que compara las secuencias, incluyendo las declaraciones sobre homologías de secuencia, se incorporan específicamente en su totalidad por referencia.

Una «enzima lítica de secuencia variante» incluye una enzima lítica caracterizada por una secuencia de polipéptido que es diferente de la de una enzima lítica, pero retiene actividad funcional. En algunas realizaciones, la enzima lítica puede ser codificada genéticamente por un bacteriófago específico para *Streptococcus suis* como en el caso de PlySs2 que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos particular con la(s) secuencia(s) de enzima lítica del presente documento, como se proporciona en la figura 5 y en SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una enzima lítica funcionalmente activa puede matar bacterias *Streptococcus suis*, y otras bacterias susceptibles como se proporciona en el presente documento, incluyendo como se muestra en la TABLA 1, 2 y 3, rompiendo la pared celular de las bacterias. Una enzima lítica activa puede tener una identidad de secuencia de aminoácidos de 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 o 99,5 % con la(s) secuencia(s) de enzima lítica del presente documento, como se proporciona en la figura 5 y en SEQ ID NO: 1. Tales variantes de enzima lítica asociadas a fago incluyen, por ejemplo, polipéptidos de enzima lítica donde se añaden o suprimen uno o más residuos de aminoácido en el N- o C-terminal de la secuencia de la(s) secuencias de enzima lítica del presente documento, como se proporciona en la

figura 5 y en SEQ ID NO.: 1.

En un aspecto particular, una enzima lítica asociada a fago tendrá al menos aproximadamente 80 % u 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias de enzima lítica asociada a fago nativas, particularmente al menos aproximadamente 90 % (p. ej., 90%) de identidad de secuencia de aminoácidos. Más particularmente, una variante de enzima lítica asociada a fago tendrá al menos aproximadamente 95 % (p. ej., 95 %) de identidad de secuencia de aminoácidos con la(s) secuencia(s) de enzima lítica asociada a fago nativas del presente documento, como se proporciona en la figura 5 y en SEQ ID NO: 1 para lisina PlySs2, o como se describe valiosamente para ClyS, incluyendo en WO 2010/002959 y también se describe en Daniel y col. (Daniel, A y col. (2010) Antimicrobial Agents and Chemother 54(4):1603-1612).

El «porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos» con respecto a las secuencias de enzima lítica asociada a fago identificadas se define en el presente documento como el porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácido en la secuencia de enzima lítica asociada a fago, después de alinear las secuencias en el mismo marco de lectura e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia.

El «porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico» con respecto a las secuencias de enzima lítica asociada a fago identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en la secuencia de enzima lítica asociada a fago, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (p. ej., se pueden introducir espacios en la secuencia de una primera secuencia de nucleótidos). A continuación, se comparan los nucleótidos o aminoácidos en las posiciones de nucleótido o aminoácido correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo nucleótido o aminoácido que en la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = $n.^{\circ}$ de posiciones idénticas/ $n.^{\circ}$ total de posiciones) x 100).

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede obtener usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877 (1993), que se incorpora en el programa NBLAST, que se puede usar para identificar secuencias que tienen la identidad deseada con las secuencias de nucleótidos de la invención. Para obtener alineaciones con espacios con fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul y col., Nucleic Acids Res, 25:3389-3402 (1997). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (p. ej., NBLAST). Véanse los programas proporcionados por el National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health.

«Polipéptido» incluye una molécula de polímero comprendida por múltiples aminoácidos unidos de una manera lineal. En algunas realizaciones, un polipéptido puede corresponder a moléculas codificadas por una secuencia de polinucleótido presente en la naturaleza. El polipéptido puede incluir sustituciones conservadoras en las que el aminoácido presente en la naturaleza se sustituye por uno que tiene propiedades similares, donde tales sustituciones conservadoras no alteran la función del polipéptido.

El término «enzimas líticas alteradas» incluye enzimas líticas barajadas y/o quiméricas.

Las enzimas líticas de fago específicas para bacterias infectadas con un fago específico se ha encontrado que descomponen eficaz y eficientemente la pared celular de la bacteria en cuestión. La enzima lítica se cree que carece de actividad enzimática proteolítica y, por lo tanto, no es destructiva para proteínas y tejidos de mamífero cuando está presente durante la digestión de la pared celular bacteriana. Además, como se ha encontrado que la acción de enzimas líticas de fago, a diferencia de los antibióticos, era más bien específica para el(los) patógeno(s) diana, es probable que la flora normal permanezca esencialmente intacta. (M. J. Loessner, G. Wendlinger, S. Scherer, Mol Microbiol 16, 1231-41. (1995) incorporado en el presente documento por referencia). De hecho, la lisina PlySs2, a pesar de que demuestra la muerte de especies y cepas bacterianas de un espectro excepcionalmente amplio, es comparativa y particularmente inactiva contra bacterias que comprenden la flora normal, incluyendo *E. coli*, como se

describe en el presente documento.

- Una enzima lítica o polipéptido de uso en la invención puede ser producido por el organismo bacteriano después de ser infectado con un bacteriófago particular o puede ser producido o preparado recombinante o sintéticamente ya sea como tratamiento profiláctico para prevenir que enfermen quienes han estado expuestos a otros que tienen los síntomas de una infección, o como tratamiento terapéutico para quienes ya están enfermos de la infección. En la medida en que las secuencias de polipéptido de lisina y los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de lisina se describen y citan como referencia en el presente documento, la(s) enzima(s)/el(los) polipéptido(s) lítico(s) se pueden producir preferentemente a través del gen aislado para la enzima lítica del genoma de fago, poniendo el gen en un vector de transferencia, y clonando dicho vector de transferencia en un sistema de expresión, usando procedimientos clásicos de la técnica, incluyendo los ejemplificados en el presente documento. La(s) enzima(s) o el(los) polipéptido(s) lítico(s) pueden ser truncados, quiméricos, barajados o «naturales» y pueden estar en combinación. Patente de EE. UU. relevante n.º 5.604.109. Una enzima lítica «alterada» se puede producir de varias maneras. En una realización preferida, un gen para la enzima lítica alterada del genoma de fago se pone en un vector de transferencia o móvil, preferentemente 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 de lisina de la invención puede ser adecuado para *E. coli*, *Bacillus*, u otras bacterias adecuadas. El sistema de vector también puede ser un sistema de expresión libre de células. Todos estos procedimientos de expresar un gen o grupo de genes son conocidos en la técnica. La enzima lítica también puede ser creada infectando *Streptococcus suis* con un bacteriófago específico para *Streptococcus suis*, donde dicha al menos una enzima lítica lisa exclusivamente la pared celular de dicha *Streptococcus suis* que tiene a lo sumo efectos mínimos sobre otra flora bacteriana, por ejemplo, natural o comensal, presente (véase la TABLA 5, que proporciona los resultados de estudios de actividad lítica contra diversas bacterias comensales del intestino humano).
- Una «proteína quimérica» o «proteína de fusión» comprende todo o parte (preferentemente una biológicamente activa) de un polipéptido de uso en la invención enlazado operativamente 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. Las proteínas y péptidos quiméricos pueden actuar independientemente sobre las mismas o diferentes moléculas y, por tanto, tienen potencial para tratar dos o más infecciones bacterianas diferentes al mismo tiempo. Las proteínas y péptidos quiméricos también se pueden usar para tratar una infección bacteriana escindiendo la pared celular en más de una posición, lo que proporciona potencialmente, por tanto, una muerte más rápida o eficaz (o sinérgica) de una única molécula de lisina o péptido quimérico.

- Una región «heteróloga» de un constructo de ADN o constructo de péptido es un segmento de ADN identificable dentro de una molécula de ADN más grande, o de un péptido dentro de una molécula de péptido más grande, que no se encuentra en asociación con la molécula más grande en la naturaleza. Por tanto, cuando la región heteróloga codifica un gen de mamífero, el gen normalmente estará flanqueado por ADN que no flanquea el ADN genómico de mamífero en el genoma del organismo fuente. Otro ejemplo de una secuencia codificadora heteróloga es un constructo en el que la propia secuencia codificadora no se encuentra en la naturaleza (p. ej., un ADNc en el que la secuencia genómica codificadora contiene intrones, o secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del gen nativo). Las variaciones alélicas o eventos mutacionales presentes en la naturaleza no dan lugar a una región heteróloga de ADN o péptido como se define en el presente documento.

- El término «enlazado operativamente» significa que el polipéptido de la descripción y el polipéptido heterólogo están fusionados en marco. El polipéptido heterólogo puede estar fusionado al N-terminal o C-terminal del polipéptido de la descripción. Las proteínas quiméricas se producen enzimáticamente mediante síntesis química, o mediante tecnología de ADN recombinante. Se han producido y estudiado varias enzimas líticas quiméricas. Un ejemplo de una proteína de fusión útil es una proteína de fusión GST, en la que el polipéptido de la descripción se fusiona al C-terminal de una secuencia de GST. Tal proteína quimérica puede facilitar la purificación de un polipéptido recombinante de la descripción.

- En otra realización, la proteína o péptido quimérico contiene una secuencia de señal heteróloga en su N-terminal. Por ejemplo, la secuencia de señal nativa de un polipéptido de la descripción se puede retirar y sustituir con una secuencia de señal de otra proteína conocida.

- La proteína de fusión puede combinar un polipéptido de lisina con una proteína o polipéptido de que tiene una capacidad diferente, 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 una parte de un polipéptido de la descripción está fusionado a secuencias procedentes de un miembro de la familia de proteínas inmunoglobulinas. La inmunoglobulina puede ser un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo dirigido a una proteína

de superficie o un epítipo de una bacteria susceptible o diana. La proteína de fusión de inmunoglobulina puede alterar la biodisponibilidad de un ligando semejante de un polipéptido de la descripción. La inhibición de la interacción ligando/receptor puede ser útil terapéuticamente, tanto para tratar enfermedades y trastornos asociados a bacterias como para modular (es decir, promover o inhibir) la supervivencia celular. La proteína de fusión puede

5 incluir un medio para dirigir o guiar la lisina, incluyendo a tejidos u órganos particulares o a superficies tales como dispositivos, plástico, membranas. Las proteínas y péptidos quiméricos y de fusión de la descripción se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante clásicas.

- Una forma modificada o alterada de la proteína o los péptido y fragmentos de péptido, como se describe en el
- 10 presente documento, incluye proteínas o péptidos y fragmentos de péptido que se sintetizan químicamente o se preparan mediante técnicas de ADN recombinante, o ambas. Estas técnicas incluyen, por ejemplo, quimerización y barajado. Como se usa en el presente documento, las proteínas o péptidos barajados, los productos génicos, o los péptidos para más de una proteína de fago o fragmentos de péptido de proteína relacionados se han escindido aleatoriamente y reensamblado en una proteína más activa o específica. Los oligonucleótidos, péptidos o moléculas
- 15 de fragmento de péptido barajados se seleccionan o criban para identificar una molécula que tiene una propiedad funcional deseada. El barajado se puede usar para crear una proteína que es más activa, por ejemplo hasta de 10 a 100 veces más activa que la proteína molde. La proteína molde se selecciona de entre diferentes variedades de proteínas lisinas. La proteína o los péptidos barajados constituyen, por ejemplo, uno o más dominios de unión y uno o más dominios catalíticos. Cuando la proteína o el péptido se produce mediante síntesis química, preferentemente
- 20 está sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos, es decir, está separada de los precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. Por consiguiente, tales preparaciones de la proteína tienen menos de aproximadamente 30 %, 20 %, 10 %, 5 % (en peso seco) de precursores o compuestos químicos diferentes del polipéptido de interés.
- 25 La presente invención también atañe a otras variantes de los polipéptidos útiles en la invención. Tales variantes pueden tener una secuencia de aminoácidos alterada que puede funcionar como agonistas (miméticos) o como antagonistas. Las variantes pueden generarse mediante mutagénesis, es decir, mutación o truncamiento puntual discreto. Un agonista puede retener sustancialmente las mismas, o un subgrupo, de las actividades biológicas de la forma presente en la naturaleza de la proteína. Un antagonista de una proteína puede inhibir una o más de las
- 30 actividades de la forma presente en la naturaleza de la proteína, por ejemplo, uniéndose competitivamente a un miembro aguas arriba o abajo de una cascada de señalización celular que incluye la proteína de interés. Por tanto, se pueden producir efectos biológicos específicos mediante tratamiento con una variante de función limitada. El tratamiento de un sujeto con una variante que tiene un subgrupo de las actividades biológicas de la forma presente en la naturaleza de la proteína puede tener menos efectos secundarios en un sujeto con respecto al tratamiento con
- 35 la forma presente en la naturaleza de la proteína. Las variantes de una proteína de uso en la descripción que funcionan como agonistas (miméticos) o como antagonistas se pueden identificar cribando bibliotecas combinatorias de mutantes, tales como mutantes de truncamiento, de la proteína de la descripción. En una realización, se genera una biblioteca heterogénea de variantes mediante mutagénesis combinatoria a nivel del ácido nucleico y es codificada por una genoteca heterogénea. Hay una variedad de procedimientos que se pueden usar para producir
- 40 bibliotecas de variantes potenciales de los polipéptidos de la descripción a partir de una secuencia de oligonucleótido degenerada. Se pueden usar bibliotecas de fragmentos de la secuencia codificadora de un polipéptido de la descripción para generar una población heterogénea de polipéptidos para el cribado y la posterior selección de variantes, fragmentos activos o truncamientos. Se conocen varias técnicas en la técnica para el cribado de productos génicos de bibliotecas combinatorias fabricadas mediante mutaciones o truncamientos puntuales, y
- 45 para el cribado de bibliotecas de ADNc para productos génicos que tienen una propiedad seleccionada. Las técnicas usadas más ampliamente, que son susceptibles de análisis de alto rendimiento, para el cribado de genotecas grandes habitualmente incluyen la clonación de la genoteca en vectores de expresión replicables, la 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
- 50 cuyo producto se detectó. En este contexto, la porción más pequeña de una proteína (o ácido nucleico que codifica la proteína) de acuerdo con las realizaciones es un epítipo que es reconocible como específico para el fago que fabrica la proteína lisina. Por consiguiente, el polipéptido más pequeño (y el ácido nucleico asociado que codifica el polipéptido) que se puede esperar que se una a una diana o un receptor, tal como un anticuerpo, y es útil para algunas realizaciones, puede tener 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, 85 o 100
- 55 aminoácidos de longitud. Aunque las secuencias pequeñas tan cortas como 8, 9, 10, 11, 12 o 15 aminoácidos de longitud comprenden adecuadamente estructura suficiente para actuar como dianas o epítipos, las secuencias más cortas de 5, 6 o 7 aminoácidos de longitud pueden presentar estructura diana o epitópica en algunas condiciones y tienen valor en una realización. Por tanto, la porción más pequeña de la(s) proteína(s) o polipéptidos de lisina proporcionados en el presente documento, incluyendo como se expone en la figura 5 y en SEQ ID NO:1 y las
- 60 secuencias de dominio de SEQ ID NO: 3 y 4, incluye polipéptidos tan pequeños como de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 o

16 aminoácidos de longitud.

- Las porciones biológicamente activas de una proteína o fragmento de péptido de las realizaciones, como se describe en el presente documento, incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas a, o procedentes de, la secuencia de aminoácidos de la proteína de lisina de la descripción, que incluyen menos aminoácidos que la proteína de longitud completa de la proteína de lisina y presenta al menos una actividad de la proteína de longitud completa correspondiente. Habitualmente, las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de la proteína correspondiente. Una porción biológicamente activa de una proteína o un fragmento de proteína de la descripción puede ser un polipéptido que es de, por ejemplo, 10, 25, 50, 100 más o menos aminoácidos de longitud. Asimismo, otras porciones biológicamente activas, en las que se suprimen o añaden otras regiones de la proteína, se pueden producir mediante técnicas recombinantes y evaluar para determinar una o más de las actividades funcionales de la forma nativa de un polipéptido de las realizaciones.
- Se pueden preparar proteínas y ácidos nucleicos homólogos que comparten funcionalidad con tales proteínas y/o ácidos nucleicos pequeños (o regiones de proteína y/o ácido nucleico de moléculas más grandes) como valorará un experto en la materia. Tales moléculas pequeñas y regiones cortas de moléculas más grandes que pueden ser homólogas se prevén específicamente como realizaciones. Preferentemente, la homología de tales regiones valiosas es al menos 50 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, y preferentemente al menos 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, o al menos 99 % en comparación con los polipéptidos de lisina proporcionados en el presente documento, incluyendo como se señala en la figura 5 y en SEQ ID NO: 1) y las secuencias de dominio de SEQ ID NO: 3 y 4. Estos valores de porcentaje de homología no incluyen alteraciones debido a las sustituciones conservadoras de aminoácidos.

- Dos secuencias de aminoácidos son «sustancialmente homólogas» cuando al menos aproximadamente 70 % de los residuos de aminoácidos (preferentemente, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, y preferentemente al menos aproximadamente 90 o 95 %) son idénticos, o representan sustituciones conservadoras. Las secuencias de lisinas comparables, tales como lisinas PLYSs2 comparables, o lisinas CLYS comparables, son sustancialmente homólogas cuando uno o más, o varios, o hasta 10 %, o hasta 15 %, o hasta 20 % de los aminoácidos del polipéptido de lisina están sustituidos con una sustitución de aminoácido similar o conservadora, y donde las lisinas comparables tienen el perfil de actividades, efectos antibacterianos y/o especificidades bacterianas de una lisina, tal como la lisina PLYSs2 y/o la lisina CLYS, descritas en el presente documento.

- Los residuos de aminoácido descritos en el presente documento se prefieren que estén en la forma isomérica «L». Sin embargo, los residuos en la forma isomérica «D» se pueden sustituir por cualquier residuo de L-aminoácido, siempre y cuando el polipéptido retenga la propiedad funcional deseada de unión de inmunoglobulina. NH₂ se refiere al grupo amino libre presente en el amino terminal de un polipéptido COOH se refiere al grupo carboxi libre presente el carboxi terminal de un polipéptido. Manteniendo la nomenclatura de polipéptidos clásica, J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969), las abreviaturas para residuos de aminoácidos se presentan en la Tabla de correspondencias siguiente:

40

TABLA DE CORRESPONDENCIAS

SÍMBOLO		AMINOÁCIDO
<u>1 letra</u>	<u>3 letras</u>	
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
W	Trp	triptófano
R	Arg	arginina

D	Asp	ácido aspártico
N	Asn	asparagina
C	Cys	cisteína

Se pueden hacer mutaciones en las secuencias de aminoácidos, o en las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos y las lisinas del presente documento, incluyendo en las secuencias de lisina expuestas en la figura 5 y en SEQ ID NO: 1 o en las secuencias de dominio de SEQ ID NO: 3 o 4, o en fragmentos activos o truncamientos de los mismos, de tal manera que un codón particular se cambia a un codón que codifica para un aminoácido diferente, un aminoácido se sustituye por otro aminoácido, o uno o más aminoácidos se suprimen. Tal mutación generalmente se realiza haciendo los menos cambios posibles de aminoácido o nucleótido. Una mutación de sustitución de esta clase se puede hacer para cambiar un aminoácido en la proteína resultante de una manera no conservadora (por ejemplo, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a una agrupación de aminoácidos que tienen un tamaño o una característica particular a un aminoácido que pertenece a otra agrupación), o de una manera conservadora (por ejemplo, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a una agrupación de aminoácidos que tienen un tamaño o una característica particular a un aminoácido que pertenece a la misma agrupación). Tal cambio conservador generalmente conduce a menos cambio en la estructura y función de la proteína resultante. Un cambio no conservador es más probable que altere la estructura, actividad o función de la proteína resultante. Se debe considerar que la presente invención incluye secuencias que contienen cambios conservadores que no alteran significativamente la actividad o las características de unión de la proteína resultante.

El siguiente es un ejemplo de diversas agrupaciones de aminoácidos:

20 **Aminoácidos con grupos R no polares**

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

25 **Aminoácidos con grupos R polares no cargados**

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

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

30 Ácido aspártico, Ácido glutámico

Aminoácidos básicos (cargados positivamente a pH 6,0)

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

35 Otras agrupaciones pueden ser los aminoácidos con grupos fenilo: Fenilalanina, Triptófano, Tirosina

Otra agrupación puede ser de acuerdo con 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

40 Las sustituciones particularmente preferidas son:

- Lys por Arg y viceversa, de tal manera que se pueda mantener una carga positiva;
- Glu por Asp y viceversa, de tal manera que se pueda mantener una carga negativa;
- 45 • Ser por Thr, de tal manera que se pueda mantener un -OH libre; y
- Gln por Asn, de tal manera que se pueda mantener un NH₂ libre.

- Las sustituciones de aminoácidos conservadoras 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.
- 10 También se pueden introducir sustituciones de aminoácidos para sustituir un aminoácido con una propiedad particularmente preferible. Por ejemplo, se puede introducir una Cys como un sitio potencial de puentes disulfuro con otra Cys. Una His se puede introducir como un sitio particularmente «catalítico» (es decir, His puede actuar como un ácido o una base y es el aminoácido más común en la catálisis bioquímica). Se puede introducir Pro debido a su estructura particularmente plana, que induce giros β en la estructura de la proteína.
- 15 Por tanto, un experto en la materia, con base en un repaso de la secuencia del polipéptido de lisina PlySs2 proporcionada en el presente documento y a su conocimiento y la información pública disponibles para otros polipéptidos de lisina, puede hacer cambios o sustituciones de aminoácidos en la secuencia de polipéptido de lisina. Los cambios de aminoácidos se pueden hacer para reemplazar uno o más, uno o unos cuantos, uno o
- 20 varios, de uno a cinco, de uno a diez, u otro número tal de aminoácidos en la secuencia de la(s) lisina(s) proporcionada(s) en el presente documento para generar mutantes o variantes de las mismas. Se puede predecir la función o ensayar la función o capacidad de matar bacterias, incluyendo bacterias estafilocócicas y estreptocócicas, y/o de tener actividad comparable a la(s) lisina(s) de tales mutantes o variantes de las mismas como se describe y proporciona particularmente en el presente documento. Por tanto, se pueden hacer cambios a la secuencia de lisina,
- 25 y los mutantes o variantes que tienen un cambio en la secuencia se pueden ensayar usando los ensayos y procedimientos descritos y ejemplificados en el presente documento, incluyendo en los ejemplos. Un experto en la materia, con base en la estructura del dominio de la(s) lisina(s) del presente 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 conservadoras o no conservadoras razonables.
- 30 A este respecto, y con referencia ejemplar a la lisina PlySs2, se señala que, aunque la lisina de polipéptido PlySs2 representa una clase divergente de enzima lítica de profago, la lisina comprende un dominio CHPA N-terminal (cisteína-histidina amidohidrolasa/peptidasa) (SEQ ID NO: 3) y un dominio 5 de tipo SH3 C-terminal (SEQ ID NO: 4) como se representa en la figura 5. Los dominios se representan en la secuencia de aminoácidos en regiones de
- 35 color sombreadas diferentes, con el dominio CHAP correspondiente a la primera región de secuencia de aminoácidos sombreada empezando con LNN... y el dominio 5 de tipo SH3 correspondiente a la segunda región sombreada empezando con RSY... Los dominios CHAP están incluidos en varias lisinas de fago estreptocócicas y estafilocócicas anteriormente caracterizadas. Por tanto, un experto en la materia puede realizar y ensayar razonablemente sustituciones o reemplazos al dominio CHAP y/o el dominio SH-3 de PlySs2. Las comparaciones de
- 40 secuencia con la base de datos Genbank se pueden realizar 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.
- La lisina PlySs2 presenta actividad y capacidad para matar bacterias estafilocócicas y estreptocócicas. En particular
- 45 y con significancia, PlySs2 es activa para matar cepas de *Staphylococcus*, incluyendo *Staphylococcus aureus*, particularmente tanto cepas sensibles a antibióticos como resistentes a antibióticos diferentes. PlySs2 también es activa para matar cepas de *Streptococcus*, y presenta una letalidad particularmente eficaz contra cepas de *B. streptococcus* del Grupo A y Grupo B. La capacidad de la lisina PlySs2 contra bacterias se representa a continuación en la TABLA 1, basada en evaluaciones logarítmicas de muerte usando cepas aisladas *in vitro*. La
- 50 actividad de PlySs2 contra diversos organismos Gram positivos y Gram negativos y contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos se tabula a continuación en las TABLAS 2 y 3. Cabe señalar que los intervalos de CMI para PlySs2 contra las bacterias proporcionan actividad letal relativa.

TABLA 1

Reducción por PlySs2 en el crecimiento de diferentes bacterias (listado parcial)	
Bacteria	Muerte relativa con PlySs2
<i>Staphylococcus aureus</i> (SARV, SAIV, SARM, SASM)	+++
<i>Streptococcus suis</i>	+++
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	++
<i>Staphylococcus simulans</i>	+++

<i>Lysteria monocytogenes</i>	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	++
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> - GBS	++
<i>Streptococcus agalactiae</i> -GBS	+++
<i>Streptococcus pyogenes</i> -GAS	+++
<i>Streptococcus equi</i>	++
<i>Streptococcus sanguinis</i>	++
<i>Streptococcus gordonii</i>	++
<i>Streptococcus sobrinus</i>	+
<i>Streptococcus rattus</i>	+
<i>Streptococcus oralis</i>	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+
<i>Bacillus thuringiensis</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-
<i>Bacillus anthracis</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Enterococcus faecium</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-

TABLA 2

Cepas bacterianas susceptibles y no susceptibles

Organismo y subgrupo de susceptibilidad (n.º ensayado)	CMI (µg/mL)		
	50 %	90 %	Intervalo
<i>Staphylococcus aureus</i>			
Susceptible a meticilina (103)	4	8	1-16
Resistente a meticilina (120)	4	8	1-16
<i>Streptococcus pyogenes</i> , Grupo A (54)	2	8	0,5-8
<i>Streptococcus agalactiae</i> , Grupo B (51)	8	16	1-64
Otros organismos Gram positivos			
<i>Staphylococcus lugdiiensis</i> (10)	8	8	8
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (11)	128	512	4-512
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (26)	16	64	1-64
<i>Streptococcus mutans</i> (12)	64	256	2-256
<i>Listeria monocytogenes</i> (12)	128	512	1-512
<i>Enterococcus faecalis</i> (17)	> 512	> 512	32 -> 512
<i>Enterococcus faecium</i> (5)	> 512	> 512	32 -> 512
<i>Bacillus cereus</i> (10)	> 512	> 512	> 512
Organismos Gram negativos			
<i>Acinetobacter baumannii</i> (8)	> 512	> 512	> 512
<i>Escherichia coli</i> (6)	> 512	> 512	> 512
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (5)	> 512	> 512	> 512

TABLA 3

Actividad de PlySs2 contra *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos

Subgrupo de susceptibilidad (n.º ensayado)	CMI (mg/mL)		
	50 %	90 %	Intervalo
Resistente a vancomicina (14)	2	4	1-4
Vancomicina intermedia(31)	8	32	1-64
Resistente a linezolid (5)	2	2	2-4
Resistente a daptomicina (8)	2	4	2-4

5

La expresión «anticuerpo monoclonal» en sus diversas formas gramaticales se refiere a un anticuerpo que tiene solo una especie de sitio de combinación de anticuerpo capaz de inmunorreaccionar con un antígeno particular. Por

tanto, un anticuerpo monoclonal habitualmente presenta una única afinidad de unión por cualquier antígeno con el que inmunorreacciona. Un anticuerpo monoclonal, por lo tanto, puede contener 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).

5 El término «específico» se puede usar para referirse a la situación en la que un miembro de un par de unión específico no mostrará unión significativa a moléculas diferentes de su(s) ligando(s) específico(s). El término también es aplicable donde, p. ej., un dominio de unión de antígeno es específico para un epítipo particular que llevan varios antígenos, en cuyo caso el miembro de unión específica que lleva el dominio de unión de antígeno será capaz de
10 unirse a los diversos antígenos que llevan el epítipo.

El término «comprende» se usa generalmente en el sentido de incluir, es decir, permitir la presencia de una o más características o componentes.

15 El término «que consiste esencialmente en» se refiere a un producto, particularmente una secuencia de péptido, de un número definido de residuos que no están fijados covalentemente a un producto más grande. En el caso del péptido de la invención del presente documento, los expertos en la materia valorarán que, sin embargo, se pueden estudiar modificaciones menores al N- o C-terminal del péptido, tal como la modificación química del extremo terminal para añadir un grupo protector o similares, p. ej., la amidación del C-terminal.

20 El término «aislado» se refiere al estado en el que el(los) polipéptido(s) de lisina de la invención, o el ácido nucleico que codifica tales polipéptidos, estarán, de acuerdo con la presente invención. Los polipéptidos y el ácido nucleico estarán libres o sustancialmente libres 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
25 (p. ej., cultivo celular) cuando tal preparación es mediante tecnología de ADN recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*. Los polipéptidos y el ácido nucleico se pueden formular con diluyentes o adyuvantes e incluso con fines prácticos se pueden aislar, por ejemplo, los polipéptidos normalmente se mezclarán con polímeros o mucoadhesivos u otros vehículos, o se mezclarán con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, cuando se usen en diagnóstico o terapia.

30 Los ácidos nucleicos capaces de codificar el(los) polipéptido(s) de lisina PlySs2 de *S. suis* útiles y aplicables en la invención se proporcionan en el presente documento. Las secuencias de ácido nucleico representativas en este contexto son las secuencias de polinucleótidos que codifican para el polipéptido de la figura 5 o de SEQ ID NO: 1, particularmente las secuencias de polinucleótido de SEQ ID NO: 2 capaces de codificar el polipéptido de SEQ ID
35 NO: 1, y las secuencias que se hibridan, en condiciones rigurosas, con secuencias complementarias del ADN de SEQ ID NO: 2 y/o la(s) secuencia(s) de la figura 5. Variantes adicionales de estas secuencias, y secuencias de ácidos nucleicos que se hibridan con las mostradas en las figuras, también se contemplan para uso en la producción de enzimas que lisan de acuerdo con la descripción, incluyendo variantes naturales que se pueden obtener. Una gran variedad de secuencias de ácido nucleico aisladas o secuencias de ADNc que codifican enzimas lisinas
40 asociadas a fago y secuencias parciales que se hibridan con tales secuencias génicas son útiles para la producción recombinante de la(s) enzima(s) lisina(s) o el(los) polipéptido(s) de la invención.

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, capaz de replicación bajo su propio control.

45 Un «vector» es un replicón, tal como un plásmido, fago o cósmido, al que se puede fijar otro segmento de ADN para producir la replicación del segmento unido.

Una «molécula de ADN» se refiere a la forma polimérica de los desoxirribonucleótidos (adenina, guanina, timina o citosina) en su forma monocatenaria o de hélice bicatenaria. Este término se refiere solo a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no lo limita a cualquier forma terciaria particular. Por tanto, este término incluye ADN bicatenario encontrado, entre otras partes, en moléculas de ADN lineales (p. ej., fragmentos de restricción), virus, plásmidos y cromosomas. Al presentar la estructura de moléculas de ADN bicatenario particulares, las secuencias se pueden describir en el presente documento de acuerdo con la convención normal de dar solo la secuencia en la
50 dirección 5' a 3' a lo largo de la cadena no transcrita de ADN (es decir, la cadena que tiene una secuencia homóloga al ARNm).

Un «origen de replicación» se refiere a las secuencias de ADN que participan en la síntesis de ADN.

60 Una «secuencia codificadora» de ADN es una secuencia de ADN bicatenario que se transcribe y traduce a un

polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificadora están determinados por un codón de iniciación en el extremo 5' (amino) y un codón de detención de la traducción en el extremo 3' (carboxilo). Una secuencia codificadora puede incluir, pero no se limita a, secuencias procariotas, ADNc de ARNm eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN eucariota (p. ej., de mamífero), e incluso secuencias de ADN sintéticas. Una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción normalmente estarán situadas 3' con respecto a la secuencia codificadora.

Las secuencias de control transcripcional y traduccional son secuencias reguladoras de ADN, tales como promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, terminadores y similares, que posibilitan la expresión de una secuencia codificadora en una célula huésped.

Una «secuencia de promotor» es una región reguladora de ADN capaz de unir ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificadora aguas abajo (dirección 3'). Para fines de definición de la presente invención, la secuencia de promotor está unida en su extremo 3' por el sitio de iniciación de la transcripción y se prolonga aguas arriba (en dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del nivel de fondo. Dentro de la secuencia de promotor se encontrará un sitio de iniciación de la transcripción (definido convenientemente mapeando con nucleasa S1), así como dominios de unión de proteína (secuencias de consenso) responsables de la unión de ARN polimerasa. Los promotores eucariotas con frecuencia, pero no siempre, contendrán cajas «TATA» y cajas «CAT». Los promotores procariotas contienen secuencias de Shine-Dalgarno además de las secuencias de consenso -10 y -35.

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

Una «secuencia señal» se puede incluir antes de la secuencia codificadora. Esta secuencia codifica un péptido señal, N-terminal al polipéptido, que se comunica con la célula huésped para dirigir el polipéptido a la superficie celular o secretar el polipéptido al medio, y este péptido señal es cortado 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 procariotas y eucariotas.

El término «oligonucleótido», como se usa en el presente documento al hacer referencia a la sonda de la presente invención, se define como una molécula comprendida por dos o más ribonucleótidos, preferentemente más de tres. Su tamaño exacto dependerá de muchos factores que, a su vez, dependen de la función y uso finales del oligonucleótido.

Tal como se usan en el presente documento, los términos «endonucleasas de restricción» y «enzimas de restricción» se refieren a enzimas bacterianas, cada una de las cuales corta ADN bicatenario en, o cerca de, una secuencia de nucleótidos específica.

Una célula ha sido «transformada» por ADN exógeno o heterólogo cuando tal ADN ha sido introducido en la célula. El ADN transformante puede o no estar integrado (enlazado covalentemente) en el ADN cromosómico que constituye el genoma de la célula. En procariotas, levaduras y células de mamífero, por ejemplo, el ADN transformante se puede mantener sobre un elemento episomal tal como un plásmido. Con respecto a las células eucariotas, una célula transformada establemente es una en la que el ADN transformante se ha integrado en un cromosoma de tal manera que es heredado por las células hijas por medio de replicación del cromosoma. Esta estabilidad se demuestra mediante la capacidad de la célula eucariota para establecer líneas celulares o clones comprendidos por una población de células hijas que contienen el ADN transformante. Un «clon» es una población de células procedentes de una única célula o ancestro común mediante mitosis. Una «línea celular» es un clon de una célula primaria que es capaz de crecimiento estable *in vitro* durante muchas generaciones.

Dos secuencias de ADN son «sustancialmente homólogas» cuando al menos aproximadamente 75 % (preferentemente al menos aproximadamente 80 %, y lo más preferentemente al menos aproximadamente 90 o 95 %) de los nucleótidos concuerdan a lo largo de la longitud definida de las secuencias de ADN. Las secuencias que son sustancialmente homólogas se pueden identificar comparando las secuencias usando software clásico disponible en bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación de *Southern* en, por ejemplo, condiciones rigurosas como se definen para ese sistema particular. La definición de las condiciones de hibridación apropiadas es del dominio del experto en la materia. Véase, p. ej., Maniatis y col., arriba; DNA Cloning, Vols. I & II, arriba; Nucleic Acid Hybridization, arriba.

La descripción contempla moléculas de ADN y secuencias de nucleótidos que son derivados de las que se describen específicamente en el presente documento y que difieren de las descritas por la supresión, adición o sustitución de nucleótidos aunque todavía codifican una proteína que posee la característica funcional de el(los) polipéptido(s) de lisina. También se incluyen moléculas de ADN pequeñas que proceden de las moléculas de ADN descritas. Tales moléculas de ADN pequeñas incluyen oligonucleótidos adecuados para uso como sondas de hibridación o cebadores de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como tales, estas moléculas de ADN pequeñas comprenderán al menos un segmento de una enzima lítica codificada genéticamente por un bacteriófago de *Streptococcus suis*, y para los fines de PCR, comprenderán al menos una secuencia de 10-15 nucleótidos y, más preferentemente, una secuencia de 15-30 nucleótidos del gen. Las moléculas de ADN y secuencias de nucleótidos que proceden de las moléculas del ADN descritas como se ha descrito anteriormente también se pueden definir como secuencias de ADN que se hibridan en condiciones rigurosas a las secuencias de ADN descritas, o fragmentos de las mismas.

En realizaciones preferidas de la presente descripción, las condiciones rigurosas se pueden definir como aquellas en las que las moléculas de ADN con más de 25 % de variación de secuencia (también denominada «apareamiento incorrecto») no se hibridarán. En una realización más preferida, las condiciones rigurosas son aquellas en las que las moléculas de ADN con más de 15 % de apareamiento incorrecto no se hibridarán, y todavía más preferentemente las condiciones rigurosas son aquellas en las que las secuencias de ADN con más de 10 % de apareamiento incorrecto no se hibridarán. Preferentemente, las condiciones rigurosas son aquellas en las que las secuencias de ADN con más de 6 % de apareamiento incorrecto no se hibridarán.

La degeneración del código genético amplía adicionalmente el alcance de las realizaciones, ya que permite variaciones importantes en la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN, a la vez que mantiene la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. Por tanto, la secuencia de nucleótidos del gen podría cambiarse en esta posición a cualquiera de estos tres codones sin afectar a la composición de aminoácidos de la proteína codificada o a las características de la proteína. El código genético y las variaciones en codones de nucleótidos para aminoácidos particulares son bien conocidos para el experto en la materia. Con base en la degeneración del código genético, las moléculas de ADN variantes pueden proceder de las moléculas de ADN descritas en el presente documento usando técnicas de mutagénesis de ADN clásicas como se ha descrito anteriormente, o mediante síntesis de secuencias de ADN. Las secuencias de ADN que no se hibridan en condiciones rigurosas a las secuencias de ADN descritas en virtud de la variación de secuencia basada en la degeneración del código genético están incluidas en el presente documento mediante esta descripción.

Por tanto, se deberá valorar que también están dentro del alcance de la presente invención las secuencias de ADN que codifican una lisina de la presente invención, incluyendo PlySs2 y PlySs1, cuyas secuencias codifican para un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos como se proporciona en la figura 5 o en SEQ ID NO: 1, pero que están degeneradas con respecto a la misma o están degeneradas con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos ejemplares proporcionadas en la figura 5 y en SEQ ID NO: 2. Por «degeneradas con respecto a» se entiende que se usa un codón de tres letras diferente para especificar un aminoácido particular. Se sabe bien en la técnica qué codones se pueden usar indistintamente para codificar para cada aminoácido específico.

Un experto en la materia reconocerá que las técnicas de mutagénesis de ADN descritas en el presente documento y conocidas en la técnica pueden producir una amplia variedad de moléculas de ADN que codifican para una lisina de bacteriófago de *Streptococcus suis* y aún mantienen las características esenciales de los polipéptidos líticos descritos y proporcionados en el presente documento. También se pueden seleccionar proteínas recientemente obtenidas con el fin de obtener variaciones en la característica de el(los) polipéptido(s) como se describirá más íntegramente a continuación. Tales derivados incluyen aquellos con variaciones en la secuencia de aminoácidos que incluyen supresiones, adiciones y sustituciones menores.

Aunque el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos puede ser predeterminado, no es necesario predeterminar la mutación propiamente dicha. Las sustituciones de aminoácidos son habitualmente de residuos únicos, o pueden ser de uno o más, uno o unos cuantos, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete residuos; las inserciones normalmente serán del orden de aproximadamente 1 a 10 residuos de aminoácidos; y las supresiones oscilarán aproximadamente de 1 a 30 residuos. Las supresiones o inserciones pueden ser en forma única, pero preferentemente se realizan en pares adyacentes, es decir, una supresión de 2 residuos o inserción de 2 residuos. Las sustituciones, supresiones, inserciones, o cualquier combinación de las mismas se pueden combinar para llegar a un constructo final. Las variantes de sustitución son aquellas en las que al menos un residuo de la secuencia de aminoácidos se ha retirado y un residuo diferente se ha introducido en su lugar. Estas sustituciones se pueden hacer para no generar efecto significativo sobre las características de la proteína o cuando se desea

modular finamente las características de la proteína. Los aminoácidos que se pueden sustituir por un aminoácido original en una proteína y que se consideran como sustituciones conservadoras se han descrito anteriormente y serán reconocidos por un experto en la materia.

- 5 Como se sabe bien en la técnica, las secuencias de ADN se pueden expresar enlazándolas operativamente 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. Tal enlazamiento operativo 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, la disposición de un codón de iniciación, ATG, en el marco de lectura correcto aguas arriba de la secuencia de
- 10 ADN. Se puede emplear una amplia variedad de combinaciones de huésped/vector de expresión para expresar las secuencias de ADN de esta invención. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético. Se pueden usar cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión --secuencias que controlan la expresión de una secuencia de ADN enlazada operativamente a ella-- para expresar las secuencias de ADN de esta invención. Una amplia variedad
- 15 de células huésped unicelulares también son útiles para expresar las secuencias de ADN de esta invención. Estos huéspedes pueden incluir huéspedes eucariotas y procariotas bien conocidos, tales como cepas de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, hongos tales como levaduras, y células animales, células humanas y células vegetales en cultivo tisular. Un experto en la materia será capaz de seleccionar los vectores, las secuencias de control de la expresión y los huéspedes adecuados sin experimentación excesiva para lograr la expresión deseada
- 20 sin apartarse del alcance de esta invención.

Como se usa en el presente documento y como se denomina en la técnica, una biopelícula es un agregado de microbios con una arquitectura diferente. La formación de biopelícula implica la fijación de microorganismos que flotan libremente a una superficie. Una biopelícula es esencialmente un colectivo en el que células microbianas,

25 cada una de solo un micrómetro o dos de longitud, forma estructuras intrincadas, incluyendo torres que pueden ser de cientos de micrómetros de altura. Los canales dentro de las biopelículas actúan como conductos llenos de fluido por los que circulan nutrientes, oxígeno, desechos, etc., conforme sea necesario para mantener una comunidad de biopelícula viable. La comunidad de biopelícula o microbiana (bacteriana, fúngica o algal) habitualmente está envuelta por biopolímeros extracelulares producidos por las células microbianas y se adhiere a la interfase entre un

30 líquido y una superficie. La propiedad encapsulada de las biopelículas es una de varias características que hace a los organismos microbianos en la misma altamente resistentes a los productos terapéuticos antimicrobianos clásicos. Las bacterias que crecen en una biopelícula, por ejemplo, son altamente resistentes a los antibióticos, y en algunos casos son hasta 1000 veces más resistentes que las mismas bacterias que crecen sin una superestructura de biopelícula.

- 35 La terapia antibiótica clásica puede ser inútil donde se detecta un implante contaminado con biopelícula y el único recurso en tales circunstancias puede ser retirar el implante contaminado. Las biopelículas, asimismo, están implicadas en numerosas enfermedades crónicas. Los pacientes con fibrosis quística, por ejemplo, padecen infecciones por *Pseudomonas* que con frecuencia dan como resultado biopelículas resistentes a antibióticos. La
- 40 formación de biopelícula se produce cuando microorganismos que flotan libremente se fijan a una superficie. Como las biopelículas protegen a las bacterias, estas con frecuencia son más resistentes a los tratamientos antimicrobianos tradicionales, lo que las hace un riesgo grave para la salud, que queda demostrado por más de un millón de casos de infecciones del tracto urinario asociadas a catéteres (ITUAC) notificadas cada año, muchas de las cuales se pueden atribuir a bacterias asociadas a biopelícula (Donlan, RM (2001) Emerg Infect Dis7(2):277-281;
- 45 Maki D y Tambyah P (2001) Emerg Infect Dis 7(2):342-347).

Se han intentado diversas estrategias para prevenir la formación de biopelícula e incluyen inhibir la adsorción de proteína o la adherencia de biopelícula usando medios químicos y mecánicos. Las estrategias químicas incluyen revestimientos antimicrobianos sobre dispositivos permanentes y modificaciones poliméricas. Los antibióticos,

50 biocidas y revestimientos de iones son ejemplos de procedimientos químicos de prevención de biopelícula y pueden interferir con la fijación y expansión de biopelículas inmaduras. Sin embargo, estos revestimientos son eficaces solo durante un periodo de tiempo corto (aproximadamente 1 semana), después del cuál la lixiviación del agente antimicrobiano reduce la eficacia del revestimiento (Dror N y col. (2009) Sensors 9(4):2538-2554). Diversos estudios *in vitro* han confirmado la eficacia de la plata para prevenir la infección, tanto en forma de revestimiento como en

55 forma de nanopartículas dispersas en una matriz polimérica. Sin embargo, sigue habiendo preocupación sobre el uso de plata *in vivo* con efectos tóxicos potenciales sobre el tejido humano y se ha limitado el uso de revestimientos de plata. A pesar de esto, los revestimientos de plata se usan sobre dispositivos tales como catéteres (Vasilev K y col. (2009) Expert Rev Med Devices 6(5):553-567). A través de modificación polimérica, los agentes antimicrobianos se pueden inmovilizar sobre superficies de dispositivos usando cadenas poliméricas largas y flexibles. Estas

60 cadenas están ancladas a la superficie del dispositivo mediante enlaces covalentes, lo que produce superficies de

muerte por contacto sin lixiviación. Un estudio *in vitro* encontró que cuando se fijaba bromuro de N-alquilpiridinio, un agente antimicrobiano, a un poli(4-vinil-N-hexilpiridina), el polímero era capaz de desactivar más del 99 % de bacterias de *S. epidermidis*, *E. coli* y *P. aeruginosa* (Jansen B y Kohnen W (1995) J Ind Microbiol 15(4):391-396).

- 5 Las estrategias mecánicas para prevenir biopelículas incluyen alterar la superficie de dispositivos tales como catéteres, incluyendo modificar la hidrofobicidad de la superficie del dispositivo, alterar su naturaleza física usando materiales de superficie lisa, y alterar la carga de la superficie. La hidrofobicidad y la carga de las cadenas poliméricas se pueden controlar usando varios compuestos de cadena principal y agentes antimicrobianos, incluyendo policationes cargados positivamente. En otra estrategia, se producen ondas acústicas superficiales de
- 10 baja energía a partir de un dispositivo alimentado por batería que entrega pulsos rectangulares periódicos y ondas propagadas a la superficie, en este caso un catéter, lo que crea ondas horizontales que previenen la adherencia de bacterias a las superficies. Esta técnica se ha ensayado en conejos blancos y cobayas y redujo el crecimiento de biopelícula (Hazan, Z y col. (2006) Antimicrob Agents and Chemother 50(12):4144-152).
- 15 De acuerdo con la presente invención, se proporcionan procedimientos y composiciones para la prevención, la dispersión y el tratamiento de biopelículas bacterianas. Los procedimientos y las composiciones se proporcionan particularmente para la prevención, la dispersión y el tratamiento de biopelículas que comprenden bacterias estafilocócicas. En particular, los procedimientos y las composiciones para la prevención, la dispersión y el tratamiento de biopelículas que comprenden *Staphylococcus aureus*, incluyendo o comprendiendo *S. aureus*
- 20 resistente a antibióticos y/o sensible a antibióticos, son un aspecto de la invención. En un aspecto de la invención, los procedimientos y las composiciones de la invención comprenden una lisina, particularmente lisina PlySs2, que es capaz de matar bacterias estafilocócicas y estreptocócicas, incluyendo bacterias resistentes a antibióticos.

- Los procedimientos y las composiciones de la invención, que comprenden particularmente lisina PlySs2, se pueden
- 25 combinar o incorporar con medios químicos o mecánicos, composiciones o estrategias para la prevención o dispersión de biopelículas. Por tanto, las composiciones del presente documento se pueden combinar o incorporar con antibióticos, biocidas y revestimientos de iones para minimizar el crecimiento o la creación de biopelículas, particularmente en o sobre dispositivos permanentes o catéteres. A modo de ejemplo y no de limitación, una composición que comprende PlySs2 se puede administrar o proporcionar de otro modo para preesterilizar o
 - 30 mantener un dispositivo permanente o catéter libre de biopelícula o con adherencia bacteriana reducida o riesgo reducido de formación de biopelícula. Por tanto, una composición que comprende PlySs2 se puede utilizar en solución para purgar o lavar regularmente y mantener un dispositivo permanente, catéter, etc., libre de biopelícula o con adherencia bacteriana reducida o riesgo reducido de formación de biopelícula. En un caso en el que se sospecha, es evidente, o se demuestra una biopelícula, una composición que comprende PlySs2 se puede
 - 35 administrar o poner en contacto de otro modo con la biopelícula o el dispositivo, la región, la posición, el punto para facilitar, iniciar, o dar como resultado la dispersión, reducción, retirada o tratamiento de la biopelícula. Por tanto, por ejemplo, en casos donde un paciente presenta temperatura elevada o malestar, enrojecimiento, tumefacción asociados alrededor de un dispositivo o catéter, una composición que comprende PlySs2 se puede administrar al paciente o poner en contacto con el dispositivo o catéter para reducir, disipar o tratar la temperatura, el malestar, el
 - 40 enrojecimiento, la tumefacción correspondientes dispersando, previniendo o tratando cualquier biopelícula que se esté formando o se haya formado.

- De acuerdo con la invención, una composición que comprende lisina, particularmente lisina PlySs2 o variantes activas de la misma, se puede administrar o poner en contacto de otro modo con una biopelícula creada o
- 45 sospechada o con el dispositivo, la región, la posición, el punto con biopelícula, en una dosis o administración única o múltiples. La lisina se puede administrar junto con, antes o después de uno o más antibióticos. La lisina se puede administrar en una dosis inicial, por ejemplo, seguida de o junto con antibiótico, y la dosis inicial de lisina puede ir seguida de una dosis posterior de lisina. En tal situación, la dosis inicial de lisina, particularmente PlySs2, puede servir para dispersar la biopelícula, seguida de una dosis posterior de lisina (de cantidad inferior, igual o superior, lo
 - 50 que puede depender en parte de la respuesta inicial y la dispersión de la biopelícula) que puede servir para dispersar adicionalmente o matar o descolonizar adicionalmente las bacterias en o de o procedentes de la biopelícula. Una dosis de antibiótico se puede administrar también posteriormente o además para que sirva además para dispersar o matar o colonizar adicionalmente las bacterias en o de o procedentes de la biopelícula.

- 55 En el presente documento se proporcionan composiciones terapéuticas o farmacéuticas que comprenden la(s) enzima(s)/el(los) polipéptido(s) lítico(s) de uso en los procedimientos y las aplicaciones proporcionados en la invención, así como procedimientos de uso relacionados. Las composiciones terapéuticas o farmacéuticas pueden comprender uno o más polipéptidos líticos, y opcionalmente incluyen enzimas líticas naturales, truncadas, quiméricas o barajadas, opcionalmente combinadas con otros componentes tales como un vehículo, portador,
- 60 polipéptido, polinucleótido, proteína(s) holina, uno o más antibióticos o excipientes, vehículos o portadores

adecuados. La invención proporciona composiciones terapéuticas o composiciones farmacéuticas de las lisinas de la invención, incluyendo PlySs2 para uso en la muerte, la reducción, la descolonización, la profilaxis o el tratamiento de bacterias gram positivas en biopelículas y particularmente para dispersar, prevenir o tratar biopelículas.

- 5 La(s) enzima(s) o el(los) polipéptido(s) incluidos en las composiciones terapéuticas de uso en el procedimiento de la invención pueden ser una o más, o cualquier combinación de enzima(s) lítica(s) asociadas a fago inalteradas, polipéptidos líticos truncados, polipéptido(s) lítico(s) variantes, y enzimas líticas quiméricas y/o barajadas. Adicionalmente, se pueden usar diferente(s) polipéptido(s) lítico(s) codificados genéticamente por un fago diferente para el tratamiento de las mismas bacterias. Estas enzimas líticas también pueden ser cualquier combinación de
- 10 enzimas o polipéptidos líticos «inalterados», polipéptido(s) lítico(s) truncado(s), polipéptido(s) lítico(s) variantes, y enzimas líticas quiméricas y barajadas. La(s) enzima(s)/el(los) polipéptido(s) lítico(s) en una composición terapéutica o farmacéutica para bacterias gram positivas, incluyendo *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Listeria*, se pueden usar solos o en combinación con antibióticos o, si hay otros organismos bacterianos invasores que se van a tratar, en combinación con otras enzimas líticas asociadas a fago específicas para otras bacterias a las que se van a
- 15 dirigir. La enzima lítica, enzima truncada, enzima variante, enzima quimérica, y/o enzima lítica barajada se puede usar junto con una proteína holina. La cantidad de la proteína holina también se puede variar. Opcionalmente se pueden incluir varios antibióticos en la composición terapéutica con la(s) enzima(s) o el(los) polipéptido(s) y con o sin la presencia de lisostafina. Se puede incluir más de una enzima o polipéptido lítico en la composición terapéutica.
- 20 La composición farmacéutica de uso en el procedimiento de la invención también puede incluir una o más enzimas líticas alteradas, incluyendo isozimas, análogos o variantes de las mismas, producidas mediante síntesis química o técnicas de ADN recombinante. En particular, se puede producir proteína lítica alterada mediante sustitución, supresión, truncamiento, quimerización o barajado de aminoácidos, o combinaciones de los mismos. La composición farmacéutica puede contener una combinación de una o más proteínas líticas naturales y una o más proteínas líticas
- 25 truncadas, variantes, quiméricas o barajadas. La composición farmacéutica también puede contener un péptido o un fragmento de péptido de al menos una proteína lítica procedente de la misma especie de bacteria o de una diferente, con una adición opcional de uno o más agentes complementarios, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 30 La composición farmacéutica de uso en los presentes procedimientos puede contener un agente complementario, incluyendo uno o más agentes antimicrobianos y/o uno o más antibióticos convencionales, particularmente como se proporciona en el presente documento. Con el fin de acelerar el tratamiento de la infección o la dispersión de la biopelícula bacteriana, 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 principalmente interfiriendo
- 35 con la estructura o función de una célula bacteriana mediante 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 proteína y ADN. Los antibióticos se pueden subagrupar ampliamente en los que afectan a la biosíntesis de peptidoglicano de la pared celular y los que afectan a la síntesis de ADN o proteína en bacterias gram positivas. Los inhibidores de la síntesis de la pared celular, incluyendo penicilina y antibióticos como ella, rompen la pared celular exterior rígida de
- 40 tal manera que la célula relativamente sin soporte hincha y finalmente se rompe. El agente complementario puede ser un antibiótico, tal como eritromicina, claritromicina, azitromicina, roxitromicina, y otros miembros de la familia de los macrólidos, penicilinas, cefalosporinas, y cualquier combinación de los mismos en cantidades que son eficaces para mejorar sinérgicamente el efecto terapéutico de la enzima lítica. Virtualmente, se puede usar cualquier otro antibiótico con la enzima lítica alterada y/o inalterada. Los antibióticos que afectan a la biosíntesis de peptidoglicano de la pared celular incluyen: glicopéptidos, que inhiben la síntesis de peptidoglicano impidiendo la incorporación de
- 45 ácido N-acetilmurámico (NAM) y subunidades de péptido N-acetilglucosamina (NAG) a la matriz de peptidoglicano. Los glicopéptidos disponibles incluyen vancomicina y teicoplanina; penicilinas, que actúan inhibiendo la formación de enlaces cruzados de peptidoglicano. El grupo funcional de las penicilinas, el resto β -lactama, se une e inhibe a la DD-transpeptidasa que enlaza las moléculas de peptidoglicano en bacterias. Las enzimas hidrolíticas continúan
- 50 descomponiendo la pared celular, lo que provoca citólisis o muerte debido a la presión osmótica. Las penicilinas comunes incluyen oxacilina, ampicilina y cloxacilina; y polipéptidos, que interfieren con la desfosforilación del pirofosfato de C₅₅-isoprenilo, una molécula que lleva unidades estructurales de peptidoglicano fuera de la membrana plasmática. Un polipéptido que afecta a la pared celular es la bacitracina. Otros antibióticos útiles y relevantes incluyen vancomicina, linezolid y daptomicina.
- 55
- Similarmente, se pueden incluir otras enzimas líticas en el vehículo para tratar o dispersar otras bacterias o infecciones bacterianas. La composición farmacéutica también puede contener un péptido o un fragmento de péptido de al menos una proteína lítica, una proteína holina, o al menos una proteína holina y una lítica, cada una de estas proteínas lítica y holina procedentes de la misma o diferente especies bacterianas, con una adición opcional de uno
- 60 o más agentes complementarios, y un vehículo o diluyente adecuado.

También son de uso en los procedimientos composiciones que contienen moléculas de ácido nucleico que, solas o en combinación con otras moléculas de ácido nucleico, son capaces de expresar una cantidad eficaz de un(os) polipéptido(s) lítico(s) o un fragmento de péptido de un(os) polipéptido(s) lítico(s) *in vivo*. También se proporcionan cultivos celulares que contienen estas moléculas de ácido nucleico, polinucleótidos, y vectores que llevan y expresan estas moléculas *in vitro* o *in vivo*.

Los presentes procedimientos pueden utilizar composiciones terapéuticas o farmacéuticas que comprenden polipéptido(s) lítico(s) combinado(s) con una variedad de vehículos para dispersar o descolonizar las bacterias o tratar las enfermedades provocadas por las bacterias gram positivas susceptibles. El vehículo contiene adecuadamente cantidades menores de aditivos tales como sustancias que mejoran la isotonicidad y la estabilidad química. Tales materiales no son tóxicos para los receptores en 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 (menos de aproximadamente diez residuos), p. ej., poliarginina o tripéptidos; proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos 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 azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones tales como sodio; tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos, poloxámeros o polietilenglicol (PEG); y/o sales neutras. La glicerina o glicerol (1,2,3-propanotriol) se comercializa para uso farmacéutico. El DMSO es un disolvente aprótico con una notable capacidad para mejorar la penetración de muchos fármacos aplicados localmente. El vehículo portador también puede incluir solución de Ringer, una solución tamponada, y solución de dextrosa, particularmente cuando se prepara una solución intravenosa.

Un(os) polipéptido(s) lítico(s) se pueden añadir a estas sustancias en forma líquida o en un estado liofilizado, después de lo cual se solubilizarán cuando se encuentren con fluidos corporales tales como saliva. El(los) polipéptidos/la enzima también pueden estar en una micela o un liposoma.

Las tasas de dosificación o cantidades eficaces de una enzima lítica alterada o inalterada/polipéptido(s) de y para uso en la presente invención dependerán en parte de si la enzima lítica/el(los) polipéptidos se van a usar terapéuticamente o profilácticamente, de la duración de la exposición del receptor a la bacteria infecciosa, del tamaño y peso del individuo, etc. La duración de uso de la composición que contiene la enzima/el(los) polipéptido(s) también depende de si el uso es para fines profilácticos, donde el uso puede ser horario, diario o semanal, durante un periodo de tiempo breve; o si el uso será para fines terapéuticos donde puede ser necesario un régimen más intenso del uso de la composición, de tal manera que el uso puede durar horas, días o semanas, y/o ser de una frecuencia diaria, o a intervalos programados durante el día. Cualquier forma de dosificación empleada debe posibilitar un número mínimo de unidades durante una cantidad mínima de tiempo. Los vehículos que se clasifican como vehículos de liberación «prolongada» o «retardada» (tal como, por ejemplo, ciertos aerosoles nasales o pastillas para chupar) podrían poseer o proporcionar una concentración más baja de unidades de ingrediente activo (enzima) por ml, pero durante un periodo de tiempo más largo, mientras que un vehículo de liberación «corta» o «rápida» (tal como, por ejemplo, un gargarismo) podría poseer o proporcionar una concentración alta de unidades de ingrediente activo (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 de unidades/ml mucho más alta, o una dosificación de unidades/ml más baja.

La enzima lítica/el(los) polipéptido(s) para uso deben estar en un ambiente que tenga un pH que permita la actividad de la enzima/el(los) polipéptido(s) líticos. Un tampón estabilizador puede permitir la actividad óptima de la enzima/el(los) polipéptido(s) de lisina. El tampón puede contener un reactivo reductor tal como ditiotreitól o beta mercaptoetanol (BME). El tampón estabilizador también puede ser, o incluir, un reactivo quelante de metal, tal como sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético, o también puede contener un tampón fosfato o citrato-fosfato, o cualquier otro tampón.

Se puede incluir un tensioactivo suave en una composición terapéutica o farmacéutica para uso en los procedimientos en una cantidad eficaz para potenciar el efecto terapéutico de la enzima/el(los) polipéptido(s) lítico(s) se puede usar en una composición. Los tensioactivos suaves adecuados incluyen, entre otros, ésteres de polioxietenosorbitano y ácidos grasos (serie Tween), octilfenoxipolietoxietanol (serie Triton-X), n-octil-beta-D-glucopiranosido, n-octil-beta-D-tioglucopiranosido, n-decil-beta-D-glucopiranosido, n-dodecil-beta-D-glucopiranosido, y tensioactivos presentes biológicamente, p. ej., ácidos grasos, glicéridos, monoglicéridos, desoxicolato y ésteres de desoxicolato.

También se pueden usar conservantes en esta invención y preferentemente comprenden aproximadamente de 0,05 % a 0,5 % en peso de la composición total. El uso de conservantes garantiza que, si el producto se contamina microbianamente, la formulación prevendrá o disminuirá el crecimiento de 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 los mismos.

La composición terapéutica de uso en los presentes procedimientos y aplicaciones 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. La lisostafina, un producto génico de *Staphylococcus simulans*, ejerce un efecto bacteriostático y bactericida sobre *S. aureus* degradando enzimáticamente los enlaces cruzados de poliglicina de la pared celular (Browder y col., Res. Comm., 19: 393-400 (1965)). El gen para lisostafina se ha clonado y secuenciado posteriormente (Recsei y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 1127-1131 (1987)). Una composición terapéutica también puede incluir mutanolisina y lisozima.

Los medios de aplicación de la composición terapéutica que comprende una enzima/polipéptido(s) lítico(s) de acuerdo con los presentes procedimientos incluyen, pero no se limitan a, medios directos, indirectos, de vehículo, y especiales, o cualquier combinación de medios. La aplicación directa de la enzima/el(los) polipéptido(s) lítico(s) puede ser mediante cualquier medio adecuado para poner directamente el polipéptido en contacto con el punto de biopelícula, infección o colonización bacteriana, tal como con el área nasal (por ejemplo, aerosoles nasales), aplicaciones dérmicas o cutáneas (por ejemplo, ungüentos o formulaciones tópicos), supositorios, aplicaciones de tampón, etc. Las aplicaciones nasales incluyen, por ejemplo, aerosoles nasales, gotas nasales, ungüentos nasales, lavados nasales, inyecciones nasales, taponamientos nasales, aerosoles e inhaladores bronquiales, o indirectamente por medio del uso de pastillas para la garganta, enjuagues bucales o gargarismos, o mediante el uso de ungüentos aplicados a las fosas nasales o la cara, o cualquier combinación de estos y procedimientos de aplicación similares. Las formas en las que la enzima lítica se puede administrar incluyen, pero no se limitan a, pastillas para chupar, pastillas, caramelos, inyectables, gomas de mascar, comprimidos, polvos, aerosoles, líquidos, ungüentos y aerosoles.

El modo de aplicación de la enzima lítica incluye un número de diferentes tipos y combinaciones de vehículos que incluyen, pero no se limitan a, un líquido acuoso, un líquido de base alcohol, un gel hidrosoluble, una loción, un ungüento, una base de líquido no acuoso, una base de aceite mineral, una mezcla de aceite mineral y vaselina, lanolina, liposomas, proteínas de soporte tales como albúmina sérica o gelatina, carmel de celulosa en polvo, y combinaciones de los mismos. Un modo de entrega del vehículo que contiene el agente terapéutico incluye, pero no se limita a, un frotis, aerosol, un parche de liberación retardada, una toallita con líquido absorbido, y combinaciones de los mismos. La enzima lítica se puede aplicar a un vendaje directamente o en uno de los otros vehículos. Los vendajes se pueden vender húmedos o secos, donde la enzima está en forma liofilizada sobre el vendaje. Este procedimiento de aplicación es más eficaz para el tratamiento de piel infectada. Los vehículos de composiciones tópicas pueden comprender excipientes semisólidos o de tipo gel que incluyen un espesante de polímero, agua, conservantes, tensioactivos o emulsionantes activos, antioxidantes, filtros solares, y un disolvente o sistema de disolventes mixto. Los espesantes de polímero que se pueden usar incluyen los conocidos por un experto en la materia, tales como agentes gelificantes hidrófilos o hidroalcohólicos usados frecuentemente en las industrias cosmética y farmacéutica. Otros polímeros gelificantes preferidos incluyen hidroxietilcelulosa, goma de celulosa, polímero entrecruzado de MVE/MA decadieno, copolímero de PVM/MA, o una combinación de los mismos.

Puede ser ventajoso tener materiales que presentan adherencia a tejidos mucosos, para ser administrados con una o más enzimas de fago y otros agentes complementarios a lo largo de un periodo de tiempo. Los materiales que tienen capacidad de liberación controlada son particularmente deseables, y el uso de mucoadhesivos de liberación sostenida ha recibido un grado de atención significativo. Se conocen otras estrategias que implican mucoadhesivos que son la combinación de materiales hidrófilos e hidrófobos. También se pueden usar micelas y micelas multilaminares para controlar la liberación de enzima. Los materiales que tienen capacidad de dirigirse o adherirse a superficies, tales como membranas de plástico, dispositivos utilizados en la práctica clínica, incluyendo particularmente cualquier material o componente que se coloca en el cuerpo y susceptible a adherencia bacteriana o desarrollo de biopelícula, tal como catéteres, válvulas, dispositivos protésicos, bombas de fármacos o compuestos, estents, materiales ortopédicos, etc., se pueden combinar, mezclar o fusionar a la(s) lisina(s) de uso en la presente invención.

Las composiciones terapéuticas o farmacéuticas de uso en el procedimiento también pueden contener mucoadhesivos poliméricos, incluyendo un copolímero de injerto que comprende una cadena principal hidrófila y

cadenas de injerto hidrófobas para la liberación controlada de agentes biológicamente activos. Las composiciones de esta solicitud pueden contener opcionalmente otros materiales poliméricos, tales como plastificantes de poli(ácido acrílico), poli(vinilpirrolidona) y carboximetilcelulosa de sodio, y otros excipientes farmacéuticamente aceptables en cantidades que no provocan un efecto perjudicial sobre la mucoadhesividad de la composición.

5

Una(s) enzima(s)/un(os) polipéptido(s) lítico(s) de la invención se pueden administrar para uso de acuerdo con la invención mediante cualquier medio farmacéuticamente aplicable o aceptable, incluyendo tópicamente, oralmente o parenteralmente. Por ejemplo, la enzima/el(los) polipéptidos lítico(s) se pueden administrar por intramuscularmente, intratecalmente, subdérmicamente, subcutáneamente o intravenosamente para tratar infecciones por bacterias gram

10 positivas. En los casos en los que la inyección parenteral es el modo de administración elegido, se usa preferentemente una formulación isotónica. Generalmente, los aditivos para isotonicidad pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En algunos casos, se prefieren soluciones isotónicas tales como solución salina tamponada con fosfato. Los estabilizadores incluyen gelatina y albúmina. Se puede añadir un agente de vasoconstricción a la formulación. Las preparaciones farmacéuticas de acuerdo con esta solicitud se proporcionan

15 estériles y libres de pirógenos.

Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos de animales, normalmente ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo de animal también se usa para conseguir un intervalo de concentración y una vía de administración deseables. Tal información se puede

20 usar a continuación para determinar las dosis y vías de administración útiles en humanos. La dosificación exacta es elegida por cada médico en función del paciente que 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 se pueden tener en cuenta incluyen la gravedad del estado patológico, la edad, peso y género del paciente; la dieta, la duración deseada del tratamiento, el procedimiento de administración, el tiempo y la frecuencia de administración, la

25 una o más combinaciones de fármacos, las sensibilidades de reacción, y la tolerancia/respuesta a la terapia. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada se pueden administrar cada 3 a 4 días, cada semana, o una vez cada dos semanas, dependiendo de la semivida y la velocidad de eliminación de la formulación particular.

Las tasas o cantidades de dosificación eficaces de la enzima/el(los) polipéptido(s) lítico(s) que se van a administrar,

30 y la duración del tratamiento dependerán en parte de la gravedad de la infección, el peso del paciente, particularmente humano, la duración de la exposición del receptor a la bacteria infecciosa, el número de centímetros cuadrados de piel o tejido o superficie que están infectados, la profundidad de la infección, la gravedad de la infección, y una variedad de diversas otras variables. La composición se puede aplicar en cualquier lugar de una a varias veces al día, la semana o el mes, y se puede aplicar durante un periodo de tiempo corto, tal como días o

35 hasta varias semanas, o largo, tal como muchas semanas o hasta meses. El uso puede prolongarse días o semanas o más. Cualquier forma de dosificación empleada debe posibilitar un número mínimo de unidades durante una cantidad mínima de tiempo. La concentración de las unidades activas de enzimas que se cree que posibilita una cantidad o dosificación eficaz de enzimas se puede seleccionar de acuerdo con proceda.

40 La lisina se puede administrar en una única dosis o múltiples dosis, individualmente o en combinación con otro agente, tal como uno o más antibióticos. La lisina, opcionalmente con otro agente, tal como antibiótico, se puede administrar mediante el mismo modo de administración o mediante diferentes modos de administración. La lisina se puede administrar una vez, dos veces o múltiples veces, una o más en combinación o individualmente. Por tanto, la lisina se puede administrar en una dosis inicial seguida de una o más dosis posteriores, particularmente en función

45 de la respuesta y la muerte o descolonización bacteriana o la dispersión de la biopelícula o la muerte de bacterias en la biopelícula, y puede combinarse o alternarse con una o más dosis de antibiótico. En un aspecto particular de la invención, una lisina, particularmente PlySs2, o combinaciones de antibiótico y lisina se pueden administrar durante periodos más largos y la dosificación de puede prolongar sin riesgo de resistencia.

50 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(s) adicional(es) añadido(s), 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

55 amplio.

El término «ensayo» significa cualquier procedimiento usado para medir una propiedad específica de un compuesto. Un «ensayo de cribado» significa un procedimiento usado para caracterizar o seleccionar compuestos, con base en su actividad, de una biblioteca de compuestos.

60

El término «prevenir» o «prevención» se refiere a una reducción del riesgo de adquirir o desarrollar una enfermedad o un trastorno (es decir, provocar 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 predispuesto a la enfermedad con antelación al comienzo de la enfermedad.

5

El término «profilaxis» está relacionado con, y abarcado en, el término «prevención», y se refiere a una medida o un procedimiento cuyo propósito es prevenir, en lugar de tratar o curar una enfermedad. Los ejemplos no limitantes de medidas profilácticas pueden incluir la administración de vacunas; la administración de heparina de bajo peso molecular a pacientes hospitalarios con riesgo de trombosis debido, por ejemplo, a inmovilización; y la

10

administración de un agente antipalúdico tal como cloroquina, con antelación a una visita a una región geográfica en la que la malaria es endémica o el riesgo de contraer malaria es alto.

«Cantidad terapéuticamente eficaz» significa aquella cantidad de un fármaco, compuesto, antimicrobiano, anticuerpo, polipéptido o agente farmacéutico que producirá la respuesta biológica o médica de un sujeto que busca

15

un médico u otro facultativo. En particular, en lo que respecta a infecciones bacterianas gram positivas y al crecimiento de bacterias gram positivas, el término «cantidad eficaz» pretende incluir una cantidad eficaz de un compuesto o agente que logrará una reducción biológicamente significativa de la cantidad o magnitud de infección por bacterias gram positivas, incluyendo que tiene un efecto bactericida y/o bacteriostático. La expresión «cantidad terapéuticamente eficaz», se usa en el presente documento para indicar una cantidad suficiente para prevenir, y

20

preferentemente reducir en al menos aproximadamente 30 por ciento, más preferentemente al menos 50 por ciento, lo más preferentemente al menos 90 por ciento un cambio clínicamente significativo en el crecimiento o la cantidad de bacterias infecciosas, u otra característica de patología tal como, por ejemplo, fiebre o recuento de leucocitos elevados como pueden cursar en su presencia y actividad.

25

El término «tratar» o «tratamiento» de cualquier enfermedad o infección se refiere, en una realización, a mitigar la enfermedad o infección (es decir, detener la enfermedad o el crecimiento del agente o las bacterias infecciosas o reducir la manifestación, magnitud o gravedad de al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra realización, «tratar» o «tratamiento» se refiere a mitigar al menos un parámetro físico, que puede no ser discernible por el sujeto. En otro aspecto más, «tratar» o «tratamiento» se refiere a modular la enfermedad o infección, ya sea

30

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 retardar la progresión de una enfermedad o reducir una infección.

35

La expresión «farmacéuticamente aceptable» se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen habitualmente una reacción alérgica o adversa similar, tal como malestar gástrico, mareos y similares, cuando se administran a un humano.

40

Cabe señalar que en el contexto de los procedimientos de tratamiento que se llevan a cabo *in vivo* o los procedimientos de tratamiento médicos y clínicos de acuerdo con la presente solicitud y las reivindicaciones, el término sujeto, paciente o individuo se refiere a un humano.

45

Los términos «bacterias gram positivas», «bacterias Gram positivas», «gram positivas», y cualquier variante no mencionada específicamente, se pueden usar en el presente documento indistintamente, y como se usan en toda la presente solicitud y las reivindicaciones, se refieren a bacterias Gram positivas que se conocen y/o se pueden identificar mediante la presencia de ciertas características de la pared celular y/o membrana celular y/o mediante tinción con colorante de Gram. Las bacterias gram positivas se conocen y se pueden identificar fácilmente y se pueden seleccionar entre, pero no se limitan a, los géneros *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* y *Clostridium*, e incluyen todas y cada una de las especies o cepas reconocidas o no reconocidas de las mismas. En un aspecto de la invención, las bacterias gram positivas sensibles a la lisina PlyS

50

incluyen bacterias seleccionadas entre una o más de *Staphylococcus* y *Streptococcus*.

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

55

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

60

La expresión «farmacéuticamente aceptable» se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen habitualmente una reacción alérgica o adversa similar, tal como malestar gástrico, mareos y similares, cuando se administran a un humano.

La expresión «cantidad terapéuticamente eficaz», se usa en el presente documento para indicar una cantidad suficiente para prevenir, y preferentemente reducir en al menos aproximadamente 30 por ciento, más preferentemente al menos 50 por ciento, lo más preferentemente al menos 90 por ciento, un cambio clínicamente significativo en la actividad de la fase S de una masa celular diana, u otra característica de patología tal como, por ejemplo, presión sanguínea, fiebre o recuento de leucocitos elevados que puedan cursar en su presencia y actividad.

La invención proporciona composiciones que comprenden un polipéptido de lisina para uso en la prevención, la dispersión, el tratamiento y/o la descolonización de biopelículas bacterianas y en la prevención de infecciones después de la dispersión de biopelícula(s) donde se sospecha o están presentes una o más de bacterias *Staphylococcus* y *Streptococcus*, y donde el polipéptido de lisina es lisina PlySs2, que tiene capacidad para matar bacterias *S. aureus*, incluyendo SARM. La invención proporciona el uso de composiciones que comprenden la lisina PlySs2 para reducir o prevenir el crecimiento de biopelícula sobre la superficie de dispositivos, implantes, membranas de separación (por ejemplo, membranas de pervaporación, diálisis, ósmosis inversa, ultrafiltración y microfiltración) donde el dispositivo médico, catéter o implante se pone en contacto con dicha composición. En particular, la lisina PlySs2 tiene capacidad para matar bacterias *S. aureus*, incluyendo SARM.

La composición de la invención puede ser para uso en el tratamiento de una infección del tracto urinario asociada a catéteres (ITUAC), donde la infección se atribuye a bacterias asociadas a biopelícula, administrando una composición que comprende lisina PlySs2. La invención proporciona composiciones que comprenden lisina PlySs2 para uso en el tratamiento de una infección del tracto urinario asociada a catéteres (ITUAC), donde la infección se atribuye a bacterias asociadas a biopelícula. Las composiciones comprenden lisina PlySs2, incluyendo el polipéptido como se proporciona en la figura 5 o en SEQ ID NO: 1 o variantes del mismo capaces de matar bacterias estafilocócicas o estreptocócicas, incluyendo *S. aureus*. Los procedimientos o las composiciones pueden comprender adicionalmente uno o más antibióticos.

La endocarditis, incluyendo la endocarditis estafilocócica en el corazón, tal como en una válvula aórtica u otra válvula o estent o dispositivo implantado en el corazón o los vasos del mismo, es un problema, riesgo y realidad clínica significativa para muchos pacientes cardíacos. La invención proporciona un procedimiento para reducir, prevenir, dispersar o tratar la endocarditis, incluyendo la endocarditis estafilocócica, y para la prevención o el tratamiento de biopelícula(s) en válvulas cardíacas o estents vasculares. En estos procedimientos, se administra lisina, particularmente lisina PlySs2 o variantes activas de la misma como se proporcionan en el presente documento, para prevenir o tratar la endocarditis estafilocócica o biopelícula(s) sobre válvulas cardíacas o estents vasculares.

La invención se puede entender mejor por referencia a los Ejemplos no limitantes siguientes, que se proporcionan como ejemplares de la invención. Los ejemplos siguientes se presentan con el fin de ilustrar más íntegramente las realizaciones preferidas de la invención.

40 **EJEMPLO 1**

La lisina PlySs2 demuestra capacidad para matar diversas cepas de bacterias gram positivas clínicamente significativas, incluyendo cepas resistentes y sensibles a metilicina y vancomicina de *Staphylococcus aureus* (SARM, SASM, SARV y SAIV). PlySs2 es una lisina exclusiva que tiene amplia actividad letal de especies y puede matar múltiples especies de bacterias, particularmente bacterias gram positivas, significativamente diversas *Staphylococcus* y también *Streptococcus* sensibles a antibióticos y resistentes a antibióticos, incluyendo estreptococos del Grupo A y el Grupo B. Otras bacterias sensibles a PlySs2 incluyen cepas bacterianas de *Enterococcus* y *Listeria*. Una tabulación de la sensibilidad de diversas bacterias, incluyendo estafilocócicas y estreptocócicas, a la lisina PlySs2 se ha proporcionado anteriormente, incluyendo en las TABLAS 2 y 3.

Una tabulación de estudios de CMI adicionales se presenta a continuación en la TABLA 4.

TABLA 4
PlySs2 y actividad antibiótica contra cepas de *S. aureus**

Organismo o (n.º de cepas)	PlySs2		Daptomicina		Vancomicina		Oxacilina		Linezolid	
	CMI ₉₀	[µM]	CMI ₉₀	[µM]	CMI ₉₀	[µM]	CMI _{50/90}	[µM]	CMI _{50/90}	[µM]
SARM (n = 45)	4	0,15	1	0,6	1	0,7	> 4*	> 10,0	2	5,7
SASM (n	4	0,15	1	0,6	1	0,7	n/a	n/a	2	5,7

- 28)										
SAIV (n = 10)	32	1,2	8	4,9	4	2,7	n/a	n/a	2	5,7
SARV (n = 14)	2	0,08	1	0,6	> 16	> 10,6	n/a	n/a	2	5,7
SARL (n = 5)	2	0,08	1	0,6	1	0,7	n/a	n/a	> 64	> 183
SARD (n = 8)	4	0,15	16	9,9	1	0,7	n/a	n/a	2	5,7

*Las CMI se determinaron usando el procedimiento de microdilución en caldo y evaluando la inhibición del crecimiento bacteriano de 80 % de acuerdo con procedimientos del CLSI (M07-A9).

*Rojo/Negrita = fallo del fármaco (el valor de CMI está por encima del valor crítico del EUCAST para el fármaco indicado sobre *S. aureus*)

Notable y exclusivamente, a pesar de la actividad contra numerosas bacterias clínicamente significativas, incluyendo numerosas cepas de estafilococos y estreptococos y otras ensayadas como se indica en las tablas anteriores, PlySs2 presenta como máximo solo efectos mínimos sobre otras bacterias, particularmente flora bacteriana natural o comensal. La TABLA 5, a continuación, demuestra poca actividad lítica de PlySs2 contra diversas bacterias comensales del intestino humano.

TABLA 5

Sensibilidad de las bacterias intestinales a PlySs2		
Organismo	N (n.º ensayado)	CMI de CF-301 (ug/mL)
<i>Salmonella enteritidis</i>	1	> 512
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	> 512
<i>Escherichia coli</i>	10	> 512
<i>Klebsiella spp.</i>	8	> 512
<i>Proteus mirabilis</i>	2	> 512
<i>Lactobacillus spp.</i>	6	> 512
<i>Lactococcus spp.</i>	3	> 512

La formación de biopelícula es una característica clave en la patogénesis de muchas infecciones bacterianas (31).
 15 Dentro de tejidos infectados (es decir, válvulas cardíacas en la endocarditis o hueso en la osteomielitis) o sobre implantes (es decir, prótesis articulares y catéteres), existen patógenos bacterianos tales como *S. aureus* en biopelículas que proporcionan un ambiente favorable para el crecimiento y la persistencia, protegidas de la acción de los antibióticos y el sistema inmunitario (32). Los estudios proporcionados en el presente documento demuestran ahora la potente actividad antibiopelícula de la lisina PlySs2 a tan solo una concentración de 1X CMI, en
 20 comparación con la completa inactividad de antibióticos usados a concentraciones de 1000X CMI. Esta potente actividad antibiopelícula de la lisina proporciona un medio y composiciones que son eficaces contra biopelículas y complementará exclusivamente la acción de los antibióticos permitiendo el acceso a biopelículas rotas por la lisina.

A la vista de la rápida muerte bacteriana de PlySs2 y de los efectos sobre numerosas cepas y especies bacterianas clínicamente significativas, la eficacia de la lisina PlySs2 contra biopelículas de *Staphylococcus aureus* se ensayó en vitro usando ensayos de biopelícula.

La concentración mínima inhibitoria de la lisina PlySs2 contra la cepa SARM de *S. aureus* resistente a meticilina ATCC BAA-42 se determinó como 16 µg/ml. Este valor es la CMI determinada en presencia de agente reductor (tal como DTT o BMS) en el ensayo de CMI. El agente reductor se añade con el fin de mejorar la reproducibilidad entre y en ensayos en la determinación de valores de CMI. Los estudios de biopelícula se realizan sin agente reductor añadido. El valor de CMI para BAA-42 en ausencia de agente reductor es 32 µg/ml. El valor de CMI es consistente en promedio con otras cepas de SARM como se señala en las tablas proporcionadas anteriormente (véanse las Tablas 2 y 4). Las CMI se determinaron usando el procedimiento de microdilución en caldo de acuerdo con las
 35 normas y como se describe en el documento M07-A9 del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) (Methods for dilutional antimicrobial sensitivity tests for bacteria that grow aerobically. Volume 32 (Wayne [PA]: Clinical and Laboratory Standards Institute [US], 2012).

Las biopelículas se generaron usando una variación del procedimiento descrita por Wu y col. (Wu JA y col. (2003) Antimicrob Agents and Chemother 47(11):3407-3414). Brevemente, 1 x 10⁶ células en fase estacionaria de la cepa de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) ATCC BAA-42 se inocularon en 2 ml de caldo de soja triptico

suplementado con 1 % glucosa y se hicieron crecer durante 18 horas en placas de cultivo tisular de 24 pocillos a 37 °C sin aireación. Las células planctónicas (bacterias no adherentes) se retiraron lavando con 1X PBS y las bacterias restantes (sésiles o bacterias de biopelícula) se trataron a continuación con la lisina PlySs2 o con antibiótico (daptomicina, linezolid o vancomicina obtenidos de Sigma-Aldrich) a diversas concentraciones durante hasta 24 horas. En los diversos intervalos (0 horas, 2 horas, 4 horas, hasta 24 horas), los pocillos se lavaron con 1X PBS, se fijaron mediante secado al aire a 37 °C durante 15 minutos y se tiñeron con 1 ml de 1 % de solución de violeta cristal (Sigma-Aldrich) para visualizar la biopelícula restante. La densidad óptica de biopelículas teñidas con violeta cristal se determinó también para proporcionar una comparación más cuantitativa. Un estudio de densidad ejemplar se proporciona en la figura 7.

En estudios iniciales, biopelículas de SARM BAA-42 se trataron con concentraciones de 1000X CMI (1000 µg/ml) para cada uno de daptomicina, linezolid y vancomicina y 1X CMI (32 µg/ml) para lisina PlySs2 (sin agente reductor añadido). Todos los valores de CMI se determinaron usando el procedimiento de microdilución en caldo descrito en el documento M07-A9 del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) (Methods for dilutional antimicrobial sensitivity tests for bacteria that grow aerobically. Volume 32. Wayne [PA]: Clinical and Laboratory Standards Institute [US], 2012). Las biopelículas de SARM tratadas durante hasta 4 horas se presentan en la figura 1, hasta 6 horas se presentan en la figura 2, y hasta 24 horas se presentan en la figura 3. La biopelícula se elimina en un plazo de 2 horas de tratamiento con lisina PlySs2 sola a 1X CMI 32 µg/ml (FIGURA 1, 2 y 3). No hay cambio visualmente evidente en la biopelícula en 4 horas o 6 horas de tratamiento con 1000 µg/ml (1000 X CMI) de daptomicina, vancomicina o linezolid (FIGURA 1 y 2). Esto es consistente con informes anteriores que han notificado sensibilidad mínima de las biopelículas a vancomicina a dosis muy altas (10000 µg/ml) (Weigel LM y col. (2007) Antimicrob Agents and Chemother 51(1):231-238).

Concentraciones inferiores de tratamiento con lisina PlySs2 y daptomicina se evaluaron contra biopelículas de la cepa de SARM BAA-42. Las biopelículas se trataron con dosis sub-CMI inferiores de PlySs2 durante 0,5 horas, 1 hora, 4 horas y 24 horas. Como se describió anteriormente, las biopelículas de BAA-42 se generaron en placas de 24 pocillos y los pocillos se trataron con lisina PlySs2 o antibiótico daptomicina (con controles de medio adecuados). Para PlySs2, se usaron dosis sub-CMI de 3,2 µg/mL (un valor de 1/10X CMI) o 0,32 µg/mL (un valor de 1/100X CMI). Para la daptomicina, se usaron 1 µg/mL (un valor de 1X CMI) o 10 µg/mL (un valor de 10X CMI). Los pocillos se incubaron durante hasta 24 horas, lavaron, fijaron y tiñeron. Los resultados se presentan en la figura 4. Incluso a 1/100 de la CMI de lisina PlySs2, se observó disolución de biopelícula. Se demuestra disolución significativa con 3,2 µg/ml (1/10X CMI) de lisina PlySs2 a 4 horas, e incluso se observa algo de disolución con 0,32 µg/ml (1/100X CMI) a 4 horas. Con concentraciones de daptomicina de hasta 10X CMI, no se observa disolución.

Estudios de CMI comparables se completaron usando una lisina estafilocócica alternativa, particularmente lisina ClyS, contra biopelículas de SARM ATCC BAA-42. La CMI de la lisina ClyS para esta cepa de *S. aureus* es 32 µg/ml. Se inocularon placas de cultivo tisular de poliestireno con 5 x 10⁵ UFC de cepa de *S. aureus* ATCC BAA-42 por pocillo (en caldo de soja triptico con 0,2 % de glucosa) y se incubaron durante 24 horas a 35 °C para permitir la formación de biopelícula. Las biopelículas resultantes se lavaron 3 veces para retirar las células planctónicas y se trataron con concentraciones de lisina ClyS de 32 µg/ml, 3,2 µg/ml, 0,32 µg/ml y 0,032 µg/ml (o medio solo) durante 24 horas a 35 °C. Cada pocillo se lavó y tiñó con 2 % de violeta cristal. El violeta cristal tiñe el material de biopelícula adherente. Los resultados usando las diversas concentraciones de ClyS se representan en la figura 14. ClyS dispersa eficazmente la biopelícula a 32 µg/ml (1X CMI) y 3,2 µg/ml (0,1X CMI). También se observa reducción en la biopelícula teñida a 0,32 µg/ml y un tanto a 0,032 µg/ml. La lisina ClyS estafilocócica es capaz de dispersar y reducir biopelícula de *S. aureus*.

EJEMPLO 2

Se evalúan combinaciones de daptomicina más lisina a dosis sub CMI sobre biopelículas. Se ha encontrado que la lisina PlySs2 y la daptomicina ejercen un efecto letal sinérgico sobre células de *S. aureus* planctónicas (solicitud provisional de EE. UU. de n.º de serie. 61/644.944 y 61/737.239). Se llevan a cabo una serie de experimentos para investigar si este efecto sinérgico también puede dirigirse a bacterias en una biopelícula. El procedimiento de tablero de ajedrez de microdilución en caldo (Sopirala MM y col. (2010) Antimicrob Agents and Chemother 54(11):4678-4683) se aplica a biopelículas de *S. aureus* maduras crecidas en placas de microtitulación de 96 pocillos. La actividad de combinaciones sub-CMI de lisina y daptomicina se examina contra biopelículas de 18 horas de cepa de SARM ATCC BAA-42 crecidas de la manera descrita anteriormente con la excepción de que las células se hacen crecer en suspensiones de 0,2 ml. Después de la formación de biopelícula, los pocillos se lavan con 1X PBS y se tratan con PlySs2 y daptomicina solas o en una serie de combinaciones durante 24 horas sin aireación. Las biopelículas, a continuación, se lavan, fijan y tiñen para evaluar la formación de biopelícula. El efecto de las combinaciones de fármaco sub-CMI se evalúa por tanto mediante comparación con los efectos del fármaco solo a

esas mismas concentraciones sub-CMI.

EJEMPLO 3

5 Estudios de biopelícula mixta *in vitro*

La lisina PlySs2 también se usa en combinación con daptomicina para dirigirse a biopelículas multiespecie. Las biopelículas con frecuencia contienen más de una especie bacteriana (Yang L y col. (2011) FEMS Immunol and Med 62(3):339-347). La lisina PlySs2 y la daptomicina se utilizan para dirigirse a biopelículas comprendidas por la cepa de *S. aureus* sensible a PlySs2 y daptomicina ATCC BAA-42 y la cepa de *Enterococcus faecalis* resistente a PlySs2 y sensible a daptomicina. Mientras que las cepas de *E. faecalis* son sensibles a la daptomicina en forma planctónica, sin embargo, son resistentes a la daptomicina como un miembro sésil de una biopelícula. Solo cuando los enterococos se liberan de una biopelícula pueden volverse resistentes a daptomicina. Para ensayar la capacidad de PlySs2 para mediar en esta liberación (y, por tanto, sensibilizar *E. faecalis* a la daptomicina), se realiza el experimento siguiente.

Las biopelículas se generan como se ha descrito anteriormente en placas de 24 pocillos usando inóculos iniciales de 1×10^6 estafilococos y 1×10^6 enterococos (solos y juntos). Las biopelículas se lavan con PBS y se tratan con PlySs2 y daptomicina solas y en combinación (usando una serie de combinaciones sub-CMI) durante 24 horas. Después del tratamiento, los pocillos de biopelícula se separan en dos fracciones, incluyendo la no adherente (que incluye bacterias tanto vivas como muertas) y la adherente (formas de biopelícula). La fracción no adherente se emplatada para viabilidad, para determinar los recuentos de UFC relativos para estafilococos y estreptococos. Los recuentos de UFC generadas se comparan con los recuentos de UFC para las biopelículas tratadas con controles de tampón. Al mismo tiempo, las biopelículas restantes se rompen mediante sonicación y se emplan para viabilidad. De esta manera, se puede determinar si PlySs2 media en la liberación de *E. faecalis* a partir de biopelículas en las que la daptomicina la puede matar.

Las biopelículas con combinaciones lisina^santibiótico^s, lisina^Santibiótico^R, lisina^Rantibiótico^S también se evalúan como se señala a continuación.

- I. Biopelícula mixta de estafilococos/enterococos - tratamiento con lisina más antibiótico como se ha descrito anteriormente.
- II. Se genera y evalúa biopelícula mixta de *S. aureus*/*S. epidermidis* o tan solo biopelículas de *S. epidermidis*. Los experimentos se realizan también como antes usando biopelículas formadas a partir de bacterias *S. aureus* y *S. epidermidis*.
- III. Combinación de biopelículas de bacterias estaf. + estrept., tratamiento con PlySs2 y dapto u otros antibióticos.

Los experimentos se realizan como antes usando biopelículas formadas a partir de *S. aureus* y *S. pyogenes* (o *S. dysgalactiae*). Como tanto *S. pyogenes* (estreptococos del Grupo A) como *S. dysgalactiae* (estreptococos del Grupo B) son sensibles a PlySs2, estos experimentos no utilizarán daptomicina. En su lugar, la lisina PlySs2 se evalúa sola para romper y matar organismos en una biopelícula mixta que consiste en estafilococos y estreptococos.

EJEMPLO 4

45 Modelos de biopelícula basado en catéter *in vivo*

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* asociadas a dispositivos permanentes pueden ser muy difíciles de tratar debido a la naturaleza persistente de las biopelículas bacterianas a los antibióticos convencionales, y generalmente requieren la retirada de los dispositivos infectados tales como catéteres. Se pueden administrar ciclos de antibióticos y puede incluso que parezca que eliminan la mayoría de las bacterias asociadas con el dispositivo, solo para tener una recurrencia de la infección en un plazo de unos días. Esto se cree que es consecuencia de estafilococos persistentes residuales en la biopelícula que crecen en exceso, repueblan la biopelícula y resiembran la infección en el punto del dispositivo o en alguna otra parte (Darouiche RO (2004) N Engl J Med 350:1422-1429). Por lo tanto, un tratamiento que mate rápidamente los estafilococos en las biopelículas y también sea eficaz sobre bacterias planctónicas sería muy beneficioso. Se ha demostrado en los ejemplos anteriores que la lisina PlySs2 elimina rápida y eficazmente películas de *S. aureus in vitro*. Este estudio evalúa la capacidad de la lisina PlySs2 para erradicar biopelículas de *S. aureus* creadas sobre catéteres implantados *in vivo* en ratones.

Un modelo basado en catéter se evaluó usando catéteres situados de forma subcutánea en el flanco, de forma intraperitoneal o intramuscular en el muslo (modificado de Zhu Y y col. (2007) Infect Immunol 75(9):4219-4226). Este

modelo de murino basado en catéter se usa para evaluar el impacto de PlySs2 sobre la viabilidad de biopelículas *in vivo*. Antes de la implantación, las biopelículas se hacen crecer *in vitro* sobre segmentos de tubo de catéter (PVC [cloruro de polivinilo] que contienen DEHP [di(2-ethylhexil)ftalato] como plastificante; conjunto de infusión SmartSite de CareFusion, n.º 72023). El lumen de cada catéter de 5,08 cm (2 pulgadas) se inocula con 200 µl de caldo de soja triptico (TSB) suplementado con 0,25 % de glucosa que contiene 2×10^7 UFC de *S. aureus*, y las biopelículas se hacen crecer 72 horas a 37 °C. Alternativamente, los catéteres se cortan en segmentos de 2 mm y se colocan en 1,0 ml de TSB inoculado suplementado con 0,25 % de glucosa, y los segmentos de catéter se pasan diariamente a medio fresco durante tres días antes de la implantación. Se induce anestesia en ratones Balb/c de 6-8 semanas mediante inyección intraperitoneal de 0,15 ml de 100 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilazina (Butler-Schein). Los segmentos de catéter se implantan subcutáneamente en cada flanco de los ratones, o alternativamente en el espacio intraperitoneal o el músculo del muslo. Se implantaron grupos de 5-10 ratones con biopelícula. Los ratones se trataron con una cantidad apropiada de PlySs2, antibiótico o vehículo, o combinación de PlySs2 + antibiótico 1-24 horas postimplantación. Todos los ratones de cada grupo se sacrificaron con humanidad a los 1-4 días postinfección. Para cuantificar la formación de biopelícula, los catéteres infectados se retiraron inmediatamente después del sacrificio, se lavaron con cuidado tres veces en PBS estéril para retirar las bacterias no adherentes y posteriormente se colocaron en 5 ml de PBS estéril. Las bacterias adherentes se retiraron de los catéteres mediante sonicación. El número de bacterias recuperadas se cuantificó a continuación mediante dilución en serie y recuento de placas en el medio selectivo apropiado. Alternativamente, los catéteres lavados se tiñeron mediante incubación de 15 minutos en azul de metileno, se lavaron dos veces en 5 ml de PBS estéril y se visualizaron. La tinción de azul de metileno se puede cuantificar a continuación destiñendo en 0,2 ml de ácido acético al 30 % a temperatura ambiente y leer la absorbancia a 600 nm. La magnitud de masa de biopelícula residual se expresa como la lectura de absorbancia a 600 nm dividida por el peso del segmento de catéter (DO_{600}/g).

La figura 15 proporciona los resultados de tal estudio de catéter donde los catéteres con biopelícula de *S. aureus* (cepa de SARM ATCC BAA-42) crecida durante 3 días se implantaron en el espacio subcutáneo de ratones y a continuación se trataron a 24 horas posimplante. Los ratones se implantaron cada uno con 2 catéteres y se evaluaron cada una de las condiciones siguientes en 2 ratones: control negativo (sin biopelícula, sin agente), control de PlySs2 (sin biopelícula con tratamiento simulado con agente PlySs2), solo vehículo, PlySs2 administrada intraperitonealmente (IP), PlySs2 administrada intravenosamente (IV), y PlySs2 administrada subcutáneamente (SC). PlySs2 se administró como un único bolo de 100 µg (correspondiente a 5 mg/kg en el ratón y dosis de ~50 µg/ml). Los catéteres se retiraron 6 horas postratamiento y se tiñeron con azul de metileno. La cantidad relativa de tinción (visualizada a 600 nm) en cada condición se presenta en la figura 15. Cada una de las dosis IP, IV y SC redujo la tinción, dando como resultado el bolo subcutáneo la eliminación de la tinción en el catéter a niveles próximos al control.

EJEMPLO 5

En otro conjunto de experimentos, catéteres implantados en la vena yugular en ratones se preinstalan con lisina PlySs2 para evaluar la protección de los ratones de infección por biopelícula con este pretratamiento. Usando el modelo animal de catéter yugular descrito anteriormente, los catéteres de ratones cateterizados en la vena yugular se pretrataron con instilación de lisina PlySs2 en PBS 24 h antes de la exposición a *S. aureus*. Los animales de control, recibieron catéteres pretratados con PBS solo. En el día de la exposición, 2 h antes de la exposición, todos los catéteres se purgaron con PBS para retirar la lisina no unida en exceso y, a continuación, los ratones se expusieron a *S. aureus* a través de la vena caudal como se ha descrito anteriormente. Los animales expuestos se sacrificaron varios días después de la exposición bacteriana y los catéteres y órganos se recuperaron y las bacterias se cuantificaron como se ha descrito anteriormente.

EJEMPLO 6

La endocarditis estafilocócica es una infección basada en biopelícula que se puede inducir experimentalmente en la válvula aórtica de ratas (Entenza JM y col. (2005) IAI 73:990-998). Brevemente, las vegetaciones aórticas estériles se producen en ratas y se instalan bombas de infusión para entregar lisina como se describe (Entenza y col.). La endocarditis se induce 24 h después mediante exposición i.v. con 10^5 - 10^7 estafilococos. A 24 o 48 horas después de la infección, se administran intravenosamente lisina y/o antibióticos tales como daptomicina, vancomicina o linezolid. Las ratas de control reciben solo tampón. A diversos intervalos después de la inyección hasta 72 horas, los animales se sacrifican y se realizan cultivos de sangre y vegetación cuantitativos. Las densidades bacterianas se expresan como \log_{10} UFC por mL o gramo de tejido, respectivamente.

EJEMPLO 7

Con el fin de comparar las actividades de erradicación de biopelícula relativas de PlySs2 y los antibióticos de terapia clásica, se realizó un análisis temporal de veinticuatro horas de la actividad de PlySs2 y los antibióticos sobre biopelículas de SARM. Las biopelículas se generaron en placas de poliestireno de 24 pocillos inoculando 10⁵ bacterias (cepa de SARM ATCC BAA-42) en 0,5 ml de caldo de soja triptico con 0,2 % de glucosa (TSB+) por pocillo y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Se generó una placa para cada intervalo de tratamiento que se iba a evaluar (0, 0,5, 1, 2, 4, 6 y 24 horas). Después de 24 horas, el medio se aspiró, los pocillos se lavaron dos veces con 1X PBS y el tratamiento con fármaco se añadió y comenzó el tiempo de tratamiento. Las concentraciones de fármaco indicadas (1000XCMI para daptomicina, vancomicina o linezolid; 1XMIC para lisina PlySs2) en 1 ml de MHB2 (o MHB2 suplementado a 50 ug de CaCl₂ por ml) se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante los periodos de tiempo indicados antes de la aspiración, 2 lavados con 1X PBS y secado al aire durante 15 minutos. Los pocillos se tiñeron con una solución de 3 % de violeta cristal en 1 ml durante 5 min., a continuación se aspiraron, se lavaron 3 veces con 1X PBS, se secaron al aire durante 15 minutos y se fotografiaron. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Los resultados se muestran en las figuras 6 y 7. La tinción con violeta cristal de los pocillos se muestra en la figura 6 y la cuantificación del tinte retenido en los pocillos de la placa se muestra en la figura 7. PlySs2 a 1X CMI eliminó completamente la biopelícula en 2 horas, mientras que la daptomicina, la vancomicina y el linezolid a concentraciones de 1000X CMI no presentaron eliminación de biopelícula a 24 horas.

Con el fin de determinar la capacidad de concentraciones sub-CMI de PlySs2 para tratar biopelículas, se realizó un análisis temporal de veinticuatro horas. Las biopelículas se generaron en placas de poliestireno de 24 pocillos inoculando 10⁵ bacterias (cepa de SARM ATCC BAA-42) en 0,5 ml de caldo de soja triptico con 0,2 % de glucosa (TSB+) por pocillo y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Se generó una placa para cada intervalo de tratamiento que se iba a evaluar (30 min, 1 h, 4 h, 24 h). Después de 24 horas, el medio se aspiró, los pocillos se lavaron dos veces con 1X PBS y se añadió PlySs2 y comenzó el tiempo de tratamiento. Las concentraciones de PlySs2 indicadas (0,1X CMI y 0,01X CMI) en 1 ml de MHB2, o medio solo se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante los periodos de tiempo indicados antes de la aspiración, 2 lavados con 1X PBS y secado al aire durante 15 minutos. Los pocillos se tiñeron con una solución de 3 % de violeta cristal en 1 ml durante 5 min. y, a continuación, se aspiraron, se lavaron 3 veces con 1X PBS, se secaron al aire durante 15 minutos y se fotografiaron. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Los resultados se presentan en la figura 8. PlySs2 a 0,1X CMI eliminó la biopelícula en 4 horas. PlySs2 a 0,01X CMI produjo una eliminación parcial en 4 horas, mientras que la eliminación total se observó en el intervalo de 24 horas.

EJEMPLO 8

Las actividades de erradicación de biopelícula se evaluaron para PlySs2 y daptomicina contra biopelículas de SARM crecidas sobre catéteres. Las biopelículas se generaron en segmentos de 5,08 cm (2 pulgadas) de tubo de catéter (PVC [cloruro de polivinilo] que contenía DEHP [di(2-ethylhexil)ftalato] como plastificante; (conjunto de infusión SmartSite de CareFusion, n.º 72023) inoculando 10⁵ bacterias (cepa de SARM ATCC BAA-42) en 0,2 ml de caldo de soja triptico con 0,2 % de glucosa (TSB+) por segmento y se incubaron durante 72 horas a 37 °C. Todas las muestras se prepararon por duplicado para tinción con azul de metileno o cuantificación de UFC. Después de 72 horas, el medio se purgó, los segmentos se lavaron con 1 ml de 1X PBS y se añadió el tratamiento. Las concentraciones de fármaco indicadas (1X CMI y 1000X CMI para daptomicina, 1X CMI para PlySs2) en 0,2 ml de solución de Ringer lactada se añadieron a cada segmento y se incubaron durante 24 horas antes de purgar y lavar con 1 ml de 1X PBS. Las muestras por duplicado se examinaron a continuación como sigue: Para evaluar la erradicación de biopelícula, los segmentos se tiñeron con una solución de 0,02 % de azul de metileno (en agua) en 0,22 ml durante 15 min. A continuación, los segmentos se purgaron, se lavaron 3 veces con dH₂O, se secaron al aire durante 15 minutos y se fotografiaron. Para cuantificar la cantidad de células vivas retenidas dentro de las biopelículas residuales, los segmentos por duplicado se trataron con 0,22 ml de tampón de lisis (100 ug/ml de lisostafina en solución de Ringer lactada) durante 8 minutos. Después, se retiraron muestras de 0,1 ml, se añadieron a placa de poliestireno blanco sólido de 96 pocillos y se mezclaron con 0,1 ml de reactivo de luciferina/luciferasa Bactiter-Glo de Promega y se midieron inmediatamente las unidades relativas de luz (URL) (como se especifica en las instrucciones del fabricante del kit) y se compararon con una curva patrón generada anteriormente que correlacionaba valores de URL con concentraciones conocidas de bacterias. De esta manera, se determinó una estimación de UFC bacterianas en cada biopelícula.

Los resultados se presentan en la figura 9. La tinción relativa de biopelícula se muestra en la figura 9A. PlySs2 eliminó completamente la biopelícula del catéter a 1X CMI, mientras que la daptomicina no retiró biopelícula significativa incluso a 1000X CMI. Como se observa en la figura 9B, PlySs2 a 1X CMI redujo las UFC hasta las 100 UFC/ml, que es el límite de detección, mientras que no se observó reducción de UFC con la daptomicina a 1X CMI y se observó una reducción de dos log de 100 millones a 1 millón de UFC/ml a 1000X CMI de daptomicina.

- Para determinar la cantidad más baja de PlySs2 necesaria para erradicar biopelícula de catéteres, se realizó un experimento de titulación (FIGURA 10). Las biopelículas se generaron en segmentos de 2 cm de tubo de catéter de DEHP inoculando 10^5 bacterias (cepa de SARM ATCC BAA-42) en 0,2 ml de caldo de soja tríptico con 0,2 % de glucosa (TSB+) por segmento y se incubaron durante 72 horas a 37 °C. Después de 72 horas, el medio se purgó, los segmentos se lavaron con 1 ml de 1X PBS y se añadió el tratamiento de fármaco. Las concentraciones de fármaco indicadas (cantidades de 1X, 0,1X, 0,01X, 0,001X, 0,0001X y 0,00001X CMI para daptomicina, 1X CMI de PlySs2) en 0,2 ml de solución de Ringer lactada se añadieron a cada segmento y se incubaron durante 24 horas antes de purgar y lavar con 1 ml de 1X PBS. Los segmentos se tiñeron con una solución de 0,02 % de azul de metileno (en agua) en 0,22 ml durante 15 min, antes de purgarse, lavarse 3 veces con dH₂O, secarse al aire durante 15 minutos y fotografiarse. La cantidad de PlySs2 necesaria para erradicar totalmente la biopelícula como se determinó mediante tinción fue 0,01X CMI (0,32 ug/ml) (FIGURA 10). Un análisis de titulación similar realizado con daptomicina (1X, 10X, 100X, 1000X, 5000X CMI de daptomicina) demostró que concentraciones de daptomicina tan altas como 5000X CMI (5 mg/ml) no retiraban la biopelícula (FIGURA 11).
- 15 Para la cuantificación de UFC restantes después del tratamiento de biopelícula con lisina o antibiótico, los segmentos por duplicado como se evaluaron en la figura 10 y 11 se trataron con 0,22 ml de tampón de lisis (100 ug/ml de lisostafina en solución de Ringer lactada) durante 8 minutos. Después, se retiraron muestras de 0,1 ml, se añadieron a placa de poliestireno blanco sólido de 96 pocillos y se mezclaron con 0,1 ml de reactivo de luciferina/luciferasa Bactiter-Glo de Promega y se midieron inmediatamente las unidades relativas de luz (URL) (como se especifica en las instrucciones del fabricante del kit) y se compararon con una curva patrón generada anteriormente que correlacionaba el valor de URL con concentraciones conocidas de bacterias. De esta manera, se determinó una estimación de UFC bacterianas en cada biopelícula. El análisis de titulación confirmó los resultados de la tinción con azul de metileno y se proporciona en la figura 13. PlySs2 es activa en la retirada de bacterias de biopelícula hasta una concentración de 0,01X CMI, mientras que la daptomicina es completamente ineficaz hasta 25 concentraciones de 5000x CMI.

- A continuación, se realizó un análisis temporal de la actividad de PlySs2 contra biopelículas de SARM en catéter (FIGURA 12). Las biopelículas se generaron en segmentos de 5,08 cm (2 pulgadas) de tubo de catéter de DEHP inoculando 10^5 bacterias (cepa de SARM ATCC BAA-42) en 0,2 ml de caldo de soja tríptico con 0,2 % de glucosa (TSB+) por segmento y se incubaron durante 72 horas a 37 °C. Se prepararon dos muestras para cada intervalo indicado (0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h) para albergar tinción con azul de metileno y cuantificación de UFC. Después de 72 horas, el medio se purgó, los segmentos se lavaron con 1 ml de 1X PBS y se añadió el tratamiento. Se añadió PlySs2 (concentración 1X CMI, o 32 ug/mL) en 0,2 ml de solución de Ringer lactada a cada segmento y se incubaron durante los intervalos indicados antes de purgar y lavar con 1 ml de 1X PBS. A continuación, se examinaron muestras por duplicado en cada intervalo como sigue: los segmentos se tiñeron con una solución de 0,02 % de azul de metileno (en agua) en 0,22 ml durante 15 min. A continuación, los segmentos se purgaron, lavaron 3 veces con dH₂O, se secaron al aire durante 15 minutos y se fotografiaron. Los segmentos por duplicado se trataron con 0,22 ml de tampón de lisis (100 ug/ml de lisostafina en solución de Ringer lactada) durante 8 minutos. Después, se retiraron muestras de 0,1 ml, se añadieron a placa de poliestireno blanco sólido de 96 pocillos y se mezclaron con 0,1 ml de reactivo de luciferina/luciferasa Bactiter-Glo de Promega y se midieron inmediatamente las unidades relativas de luz (URL) (como se especifica en las instrucciones del fabricante del kit) y se compararon con una curva patrón generada anteriormente que correlacionaba el valor de URL con concentraciones conocidas de bacterias. De esta manera, se determinó una estimación de UFC bacterianas en cada biopelícula. El análisis temporal reveló una retirada progresiva de biopelícula teñible de los catéteres a 1X CMI de PlySs2 a lo largo del tiempo, con retirada completa en 60 minutos (FIGURA 12A). El análisis de UFC reveló un curso temporal progresivo similar, con valores de UFC en el límite de detección (100 UFC/ml) en 60 minutos (FIGURA 12B).

EJEMPLO 9

- 50 Para determinar la estabilidad de PlySs2 en un escenario de catéter simulado, se incubó PlySs2 a diversas concentraciones en solución de Ringer lactada a 37 °C. Después de 7 días, la actividad lítica de PlySs2 se evaluó añadiendo 1×10^5 estafilococos, incubando durante 4 horas, a continuación tratando con proteinasa K para retirar la PlySs2 residual y realizando diluciones en serie y emplatando para viabilidad. El valor de UFC resultante para cada 55 condición se dividió por 1×10^5 para determinar el % de pérdida de actividad.

- Los resultados se tabulan a continuación en la TABLA 6. Después de una incubación de 7 días en solución de Ringer lactada a 37 °C, se observaron pérdidas de actividad indetectables para las concentraciones de 10X y 100X CMI de PlySs2, mientras que se determinó una pérdida de 58,3 % para la muestra de 1X CMI.

60

TABLA 6

Estabilidad de PlySs2 a 37 °C en solución de Ringer lactada	
TRATAMIENTO	% DE PÉRDIDA DE ACTIVIDAD (7 días)
1X CMI	58,3
10X CMI	< 0,002
100X CMI	< 0,002

Lo anterior indica que PlySs2 es activa y estable al menos hasta 7 días en un escenario de catéter simulado y puede matar eficazmente estafilococos y de ese modo prevenir la colonización bacteriana incluso después de un periodo de tiempo prolongado incubando en Ringer lactada, una solución IV y de purga terapéutica clásica ejemplar.

EJEMPLO 10

Se realizó un estudio temporal para evaluar la esterilización luminal en un catéter para evaluar la viabilidad de las bacterias que se desalojan de la biopelícula y están suspendidas en la fase líquida del lumen después o en el tratamiento con lisina. En la figura 12 descrita anteriormente, se demostró que la biopelícula (adherente a las paredes) se pierde y dispersa totalmente en 1 hora. En el presente estudio, la esterilización (muerte completa) de las bacterias en el lumen, como se evalúa mediante análisis de UFC que detecta células vivas, se produce aproximadamente entre 6 y 24 horas. Las biopelículas se formaron con cepa ATCC BAA-42 durante 3 días a 37 °C. Las biopelículas se lavaron con 1X PBS (para retirar células planctónicas) y se trataron con solución de Ringer lactada (control de tampón) o solución de Ringer lactada que contenía lisina PlySs2 (a una concentración de 1X CMI) o daptomicina (a una concentración de 1X CMI) y también con lisina PlySs2 (a una concentración de 10X CMI). Las biopelículas se trataron durante hasta 24 horas y las UFC se evaluaron a 2 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas y 24 horas. En cada intervalo, el contenido luminal de los catéteres se retiró y se emplató para viabilidad. La figura 16 proporciona los resultados para tratamientos de nivel 1X CMI (32 µg/ml), 1X CMI de daptomicina y 10X CMI (320 µg/ml) frente a tampón solo.

EJEMPLO 11

Se evaluó la eficacia de la lisina contra biopelículas de *Staphylococcus epidermidis*. Las biopelículas de diversas cepas de *S. epidermidis* se generaron en placas de microtitulación de 24 pocillos y se trataron con lisina PlySs2 para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración de erradicación de biopelícula (CEB) de PlySs2 contra cada cepa. Los resultados se tabulan a continuación en la TABLA 7 contra más de veinte cepas de *S. epidermidis* diferentes. La CMI (en microgramos/ml) se determinó y calculó usando el procedimiento del CLSI clásico para microdilución en caldo como se describe y menciona en los Ejemplos anteriores. La concentración de erradicación de biopelícula (CEB) de PlySs2 (en microgramos/ml) es la concentración más baja de un intervalo de dilución que destruye completamente una biopelícula de 24 horas de las cepas indicadas.

Para determinar la CEB, biopelículas de 24 h se hicieron crecer en placas de 24 pocillos, se lavaron 2x con PBS y se trataron con o sin PlySs2 (intervalo de dilución) preparada en solución de Ringer lactada. Las placas tratadas se incubaron a 37 °C (aire ambiental) durante 24 horas, se lavaron con PBS y se tiñeron con violeta cristal (VC) durante 15 minutos. La tinción con VC se solubilizó después con 1 mL de 33 % de ácido acético en cada pocillo, y se leyó la absorbancia (DO_{600 nm}) usando 200 µL del VC solubilizado. El porcentaje de biopelícula se determinó dividiendo la absorbancia del pocillo por la absorbancia del pocillo sin lisina (control de biopelícula). La CEB se determinó como el valor que presentó > 75 % de eliminación de la biopelícula.

TABLA 7

CFS	Tipo	Designación	CMI	CEB
166	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Contaminante de laboratorio ambiental; NY, NY, secuenciación de ARNr 16S	na	5,12
224	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	HER 1292	512	5,12
225	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	HPH-6	128	0,512
226	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	HPH-5	512	5,12
227	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	HCN-4	> 512	5,12
272	<i>Staphylococcus</i>	NRS53 (SEVI)	128	0,215

	<i>epidermidis</i>			
280	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NRS101 (SERM)	128	0,512
300	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NRS8 (SEVI)	32	0,512
313	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NRS34 (SEVI)	8	0,512
533	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NRS6; (SEVI); torrente sanguíneo EE. UU.	> 512	0,512
552	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC n.º 12228 (SESM)	na	51,2
769	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NRS101	64	0,512
1152	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC-14990	na	5,12
1154	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC-49461	na	5,12
1161	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NRS850-VCU028	na	5,12
1164	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NRS853-VCU041	na	5,12
1165	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NRS854-VCU045	na	5,12
1168	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NRS857-VCU065	na	0,512
1174	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NRS864-VCU112	na	51,2
1184	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NRS874-VCU126	na	5,12
1185	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NRS875-VCU127	na	5,12
1186	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NRS876-VCU128	na	0,512
CMI = concentración mínima inhibitoria de PlySs2 (en µg/ml) calculada usando el procedimiento clásico del CLSI para microdilución en caldo. na, indica que los datos no están disponibles. CEB = concentración de erradicación de biopelícula de PlySs2 (en µg/ml) es la concentración más baja de un intervalo de dilución que destruye completamente una biopelícula de 24 horas de las cepas indicadas.				

Estos resultados demuestran la potente actividad de la lisina PlySs2 contra biopelículas de *S. epidermidis*; notablemente, la potente actividad se extiende a cepas con biopelículas de *epidermidis* con CMI de PlySs2 alta; notablemente, la potente actividad se extiende a cepas con niveles de CMI de PlySs2 altos. Estos datos indican que PlySs2 será activa contra un amplio abanico de biopelículas de *S. epidermidis*.

Las biopelículas de *S. epidermidis* en catéteres se trataron con PlySs2 y se evaluaron usando procedimientos similarmente a como se ha descrito anteriormente para los estudios de *S. aureus*. *S. epidermidis* no produce biopelículas sobre catéteres tan robustamente como las cepas de *S. aureus* descritas anteriormente, sin embargo, se produjo crecimiento de biopelícula y se pudo evaluar.

Los resultados de los estudios de biopelícula de *S. epidermidis* (cepa CFS 313 NRS34, que es una cepa de *S. epidermidis* con sensibilidad intermedia a vancomicina (SEIV)) sobre catéteres tratados con PlySs2 a 10X CMI y por debajo se muestran en la figura 17. La biopelícula de *S. epidermidis* se destruyó a concentraciones de PlySs2 por debajo de 0,1X CMI. La CMI aquí es 8 ug/ml. Un resultado similar y un nivel de actividad comparable se observaron con la cepa de *S. aureus* CFS 218 (cepa de SARM ATCC BAA-42).

EJEMPLO 12

Los resultados de un ensayo de prevención de biopelícula se presentan en la figura 18. La cepa de *S. aureus* SARM

BAA-42 (5×10^5 bacterias/ml) se inoculó en 2 ml de TSB + 0,2 % de glucosa en cada pocillo de una fila de una placa de 24 pocillos. La lisina PlySs2 se añadió inmediatamente (a concentraciones de 1X CMI (32 $\mu\text{g/ml}$), 0,1X CMI, 0,01X CMI, 0,001X CMI y 0,0001X CMI y a continuación se incubó durante 6 horas a 37 °C en aire ambiental. Los pocillos se lavaron con PBS, se tiñeron con violeta cristal y se fotografiaron para evaluar el desarrollo de biopelícula en cada una de las condiciones. El control de tampón también se evaluó simultáneamente. En este estudio, las bacterias y la lisina PlySs2 (diferentes concentraciones) se añadieron al mismo tiempo y se permitió que progresara la formación de biopelícula durante 6 horas. Como se demuestra en la figura 18, la preincubación con 1X y 0,1X CMI de PlySs2 puede prevenir eficaz y completamente la formación posterior de biopelícula. Por tanto, PlySs2 no solo puede erradicar biopelículas maduras, sino que también puede prevenir la formación de biopelícula nueva.

EJEMPLO 13

Además de biopelículas generadas por SARM BAA-42 como se ha descrito anteriormente, se evaluó la susceptibilidad de biopelículas de cepa de *S. aureus* adicionales a la lisina PlySs2. Cada una de las cepas de SARM CFS 553 (ATCC 43300) (FIGURA 19) y CFS 992 (JMI 5381) se evaluaron en estudios de catéter usando procedimientos como se ha descrito anteriormente. En cada caso, biopelículas de 3 días de edad se lavaron y trataron con las concentraciones de PlySs2 indicadas durante 4 horas. La 1X CMI para la cepa ATCC 4330 es 16 $\mu\text{g/ml}$ y la 1X CMI para la cepa JMI 5381 es 32 $\mu\text{g/ml}$. Como se muestra en la figura 19 y 20, estas biopelículas de cepa de SARM alternativas fueron susceptibles a PlySs2 y PlySs2 erradicó y dispersó totalmente la biopelícula del catéter a niveles de 10X CMI, 1X CMI y 0,1X CMI. Las biopelículas se redujeron significativamente en cada cepa usando 0,01X CMI de PlySs2.

EJEMPLO 14

Las biopelículas se generaron sobre tubos de catéter (PVC con DEPH como plastificante) como antes y se evaluó la sensibilidad a PlySs2 mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Las biopelículas de tres días de cepa de SARM CFS 218 (cepa de SARM ATCC BAA-42) sobre la superficie del catéter se trataron con una concentración de 1X CMI (es decir, 32 $\mu\text{g/ml}$) de PlySs2 en solución de Ringer lactada durante 30 segundos o 15 minutos antes de que se lavara el tratamiento y la biopelícula restante se fijara con glutaraldehído. Después de la fijación sobre la superficie del catéter, las muestras se procesaron adicionalmente y se analizaron mediante espectroscopía electrónica de barrido a una magnificación de 5000x (FIGURA 21). El tratamiento con tampón solo (es decir, solución de Ringer lactada sola) se incluye como control. Como se muestra en la figura 21, el tratamiento con PlySs2 disminuye rápidamente la biopelícula de SARM (en un plazo de 30 segundos) y a los 15 minutos retira casi completamente la biopelícula.

REFERENCIAS

1. Klevens, R.M., et al. Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. JAMA 298, 1763-1771 (2007).
2. Brink, A.J. Does resistance in severe infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* give you the 'creeps'? Current opinion in critical care 18, 451-459 (2012).
3. Ben-David, D., Novikov, I. & Mermel, L.A. Are there differences in hospital cost between patients with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infection and those with methicillin-susceptible *S. aureus* bloodstream infection? Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America 30, 453-460 (2009).
4. Fischetti, V.A. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. Current opinion in microbiology 11, 393-400 (2008).
5. Fenton, M., Ross, P., McAuliffe, O., O'Mahony, J. & Coffey, A. Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. Bioengineered Bugs 1, 9-16 (2010).
6. Nelson, D., Loomis, L. & Fischetti, V.A. 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 98, 4107-4112 (2001).
7. Witznath, M., et al. Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. Critical care medicine 37, 642-649 (2009).
8. McCullers, J.A., Karlstrom, A., Iverson, A.R., Loeffler, J.M. & Fischetti, V.A. Novel Strategy to Prevent Otitis Media Caused by Colonizing *Streptococcus pneumoniae*. PLOS pathogens 3, 0001-0003 (2007).
9. Pastagia, M., et al. A novel chimeric lysin shows superiority to mupirocin for skin decolonization of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrobial agents and chemotherapy 55, 738-744 (2011).
10. Loeffler, J.M., Djurkovic, S. & Fischetti, V.A. Phage Lytic Enzyme Cpl-1 as a Novel Antimicrobial for Pneumococcal Bacteremia. Infection and Immunity 71, 6199-6204 (2003).
11. Entenza, J.M., Loeffler, J.M., Grandgirard, D., Fischetti, V.A. & Moreillon, P. Therapeutic effects of bacteriophage

- Cpl-1 lysin against *Streptococcus pneumoniae* endocarditis in rats. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, 4789-4792 (2005).
12. Grandgirard, D., Loeffler, J.M., Fischetti, V.A. & Leib, S.L. Phage lytic enzyme Cpl-1 for antibacterial therapy in experimental pneumococcal meningitis. *The Journal of infectious diseases* 197, 1519-1522 (2008).
- 5 13. Blaser, M. Stop killing beneficial bacteria. *Nature* 476, 393-394 (2011).
14. Willing, B.P., Russell, S.L. & Finlay, B.B. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nature reviews. Microbiology* 9, 233-243 (2011).
15. Gilmer, D.B., Schmitz, J.E., Euler, C. & Fischetti, V.A. Novel Bacteriophage Lysin with Broad Lytic Activity Protects against Mixed Infection by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* TBD
- 10 (2012).
16. Schuch, R., Fischetti, V.A. & Nelson, D.C. A Genetic Screen to Identify Bacteriophage Lysins. in *Bacteriophages: Methods and Protocols*, Volume 2: Molecular and Applied Aspects, Vol. 502 307-319 (2009).
17. Bateman, A. & Rawlings, N.D. The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. *Trends Biochem Sci* 28, 234-237 (2003).
- 15 18. Whisstock, J.C. & Lesk, A.M. SH3 domains in prokaryotes. *Trends in Biochemical Sciences* 24, 132-133 (1999).
19. Rossi, P., et al. Structural elucidation of the Cys-His-Glu-Asn proteolytic relay in the secreted CHAP domain enzyme from the human pathogen *Staphylococcus saprophyticus*. *Proteins* 74, 515-519 (2009).
20. Mueller, M., de la Pena, A. & Derendorf, H. Issues in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-Infective Agents: Kill Curves versus MIC. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 369-377 (2004).
- 20 21. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Vol. 32 (Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute (US), 2012).
22. Friedman, L., Alder, J.D. & Silverman, J.A. Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50, 2137-2145 (2006).
23. Donlan, R.M. & Costerton, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15, 167-193 (2002).
- 25 24. Cottarel, G. & Wierzbowski, J. Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy. *Trends in biotechnology* 25, 547-555 (2007).
25. Tallarida, R.J. Revisiting the isobole and related quantitative methods for assessing drug synergism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 342, 2-8 (2012).
- 30 26. LaPlante, K.L., Leonard, S.N., Andes, D.R., Craig, W.A. & Rybak, M.J. Activities of clindamycin, daptomycin, doxycycline, linezolid, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin against community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with inducible clindamycin resistance in murine thigh infection and in vitro pharmacodynamic models. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52, 2156-2162 (2008).
27. Crandon, J.L., Kuti, J.L. & Nicolau, D.P. Comparative efficacies of human simulated exposures of telavancin and
- 35 vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a range of vancomycin MICs in a murine pneumonia model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54, 5115-5119 (2010).
28. Abad, C.L., Kumar, A. & Safdar, N. Antimicrobial therapy of sepsis and septic shock--when are two drugs better than one? *Critical care clinics* 27, e1-27 (2011).
29. Fischbach, M.A. Combination therapies for combating antimicrobial resistance. *Current opinion in microbiology*
- 40 14, 519-523 (2011).
30. Loeffler, J.M., Nelson, D. & Fischetti, V.A. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* 294, 2170-2172 (2001).
31. Costerton, J.W. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 284, 1318-1322 (1999).
32. Kiedrowski, M.R. & Horswill, A.R. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Annals of the*
- 45 *New York Academy of Sciences* 1241, 104-121 (2011).
33. Domenech, M., Garcia, E. & Moscoso, M. In vitro destruction of *Streptococcus pneumoniae* biofilms with bacterial and phage peptidoglycan hydrolases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55, 4144-4148 (2011).
34. Meng, X., et al. Application of a bacteriophage lysin to disrupt biofilms formed by the animal pathogen *Streptococcus suis*. *Applied and environmental microbiology* 77, 8272-8279 (2011).
- 50 35. Schuch, R., Nelson, D. & Fischetti, V. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature* 418, 884-889 (2002).
36. Fischetti, V.A., Nelson, D. & Schuch, R. Reinventing phage therapy: are the parts greater than the sum? *Nature Biotechnology* 24, 1508-1511 (2006).
37. Manoharadas, S., Witte, A. & Blasi, U. Antimicrobial activity of a chimeric enzymatic towards *Staphylococcus aureus*. *Journal of biotechnology* 139, 118-123 (2009).
- 55 38. Rashel, M., et al. Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11. *The Journal of infectious diseases* 196, 1237-1247 (2007).
39. Daniel, A., et al. Synergism between a novel chimeric lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54, 1603-1612 (2010).
- 60 40. Kokai-Kun, J.F., Chanturiya, T. & Mond, J.J. Lysostaphin as a treatment for systemic *Staphylococcus aureus*

- infection in a mouse model. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 60, 1051-1059 (2007).
41. Dhand, A., et al. Use of antistaphylococcal beta-lactams to increase daptomycin activity in eradicating persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: role of enhanced daptomycin binding. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 53, 158-163 (2011).
- 5 42. Matias, V.R. & Beveridge, T.J. Cryo-electron microscopy of cell division in *Staphylococcus aureus* reveals a mid-zone between nascent cross walls. *Molecular microbiology* 64, 195-206 (2007).
43. Kashyap, D.R., et al. Peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by activating protein-sensing two-component systems. *Nature medicine* 17, 676-683 (2011).
44. Moise, P.A., North, D., Steenbergen, J.N. & Sakoulas, G. Susceptibility relationship between vancomycin and daptomycin in *Staphylococcus aureus*: facts and assumptions. *Lancet Infect Dis* 9, 617-624 (2009).
- 10 45. Jobson, S., Moise, P.A. & Eskandarian, R. Retrospective observational study comparing vancomycin versus daptomycin as initial therapy for *Staphylococcus aureus* infections. *Clinical therapeutics* 33, 1391-1399 (2011).
46. Schweizer, M.L., et al. Comparative effectiveness of nafcillin or cefazolin versus vancomycin in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *BMC infectious diseases* 11, 279 (2011).
- 15 47. Berti, A.D., et al. Altering the proclivity towards daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using combinations with other antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56, 5046-5053 (2012).
48. Sopirala, M.M., et al. Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54, 4678-4683 (2010).
49. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Vol. 32 (Clinical and Laboratory Standards Institute (US), Wayne (PA), 2012).
- 20 50. *Clinical Microbiology Procedures Handbook* 3rd Ed. Washington DC, (ASM Press, 2010).
51. Pereira, P.M., Filipe, S.R., Tomasz, A. & Pinho, M.G. Fluorescence ratio imaging microscopy shows decreased access of vancomycin to cell wall synthetic sites in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 3627-3633 (2007).
- 25 52. Zhang, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics* 9, 40 (2008).
53. Pettersen, E.F., et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry* 25, 1605-1612 (2004).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> Schuch, Raymond
 <120> PREVENCIÓN, ROTURA Y TRATAMIENTO DE BIOPELÍCULA CON LISINA DE BACTERIÓFAGO
 <130> 3136-1-008PCT
 <140> NO ASIGNADA
- 35 <141> 09/05/2013
 <150> 61/644.799
 <151> 09/05/2012
 <150> 61/736.813
 <151> 13/12/2012
- 40 <160> 5
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 245
 <212> PRT
- 45 <213> *Streptococcus suis*
 <400> 1

ES 2 729 123 T3

Met Thr Thr Val Asn Glu Ala Leu Asn Asn Val Arg Ala Gln Val Gly
1 5 10 15

Ser Gly Val Ser Val Gly Asn Gly Glu Cys Tyr Ala Leu Ala Ser Trp
20 25 30

Tyr Glu Arg Met Ile Ser Pro Asp Ala Thr Val Gly Leu Gly Ala Gly
35 40 45

Val Gly Trp Val Ser Gly Ala Ile Gly Asp Thr Ile Ser Ala Lys Asn
50 55 60

Ile Gly Ser Ser Tyr Asn Trp Gln Ala Asn Gly Trp Thr Val Ser Thr
65 70 75 80

Ser Gly Pro Phe Lys Ala Gly Gln Ile Val Thr Leu Gly Ala Thr Pro
85 90 95

Gly Asn Pro Tyr Gly His Val Val Ile Val Glu Ala Val Asp Gly Asp
100 105 110

Arg Leu Thr Ile Leu Glu Gln Asn Tyr Gly Gly Lys Arg Tyr Pro Val
115 120 125

Arg Asn Tyr Tyr Ser Ala Ala Ser Tyr Arg Gln Gln Val Val His Tyr
130 135 140

Ile Thr Pro Pro Gly Thr Val Ala Gln Ser Ala Pro Asn Leu Ala Gly
145 150 155 160

Ser Arg Ser Tyr Arg Glu Thr Gly Thr Met Thr Val Thr Val Asp Ala
165 170 175

Leu Asn Val Arg Arg Ala Pro Asn Thr Ser Gly Glu Ile Val Ala Val
180 185 190

Tyr Lys Arg Gly Glu Ser Phe Asp Tyr Asp Thr Val Ile Ile Asp Val
195 200 205

Asn Gly Tyr Val Trp Val Ser Tyr Ile Gly Gly Ser Gly Lys Arg Asn
210 215 220

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

Trp Gly Thr Phe Lys
245

<210> 2

5 <211> 738

<212> ADN

<213> Streptococcus suis

ES 2 729 123 T3

<400> 2

```

atgacaacag taaatgaagc attaaataat gtaagagctc aggttgggtc cgggtgtgtct      60
gttggcaacg gcgaatgcta cgctttggct agttggtagc agcgcatgat tagtcoggat      120
gcaactgtcg gacttggcgc tgggtgtgggc tgggtcagcg gtgcaatcgg cgataacaatc      180
tctgccaaaa acatcggtc atcatacaac tggcaagcta acggctggac agtttccaca      240
tctgggtccat ttaaagcagg tcagattgtg acgcttgggg caacaccagg aaacccttac      300
ggacatgtgg taatcgtcga agcagtggac ggcgatagat tgactatttt ggagcaaaac      360
tacggcggga aacgttatcc cgtccgtaat tattacagcg ctgcaagcta tcgtcaacag      420
gtcgtgcatt acatcacacc gcctggcacg gtcgcacagt cagcacccaa ccttgcaggc      480
tctcgttcct atcgcgagac gggcactatg actgtcacgg tcgatgctct caatgttcgc      540
agggcgccaa atacttcagg cgagattgta gcagtataca agcgtggtga atcatttgac      600
tatgatactg tcatcatcga tgtcaatggc tatgtctggg tgtcttacat aggcggcagc      660
ggcaaacgta actacgttgc gacgggcgct accaaagacg gtaagcgttt cggcaatgct      720
tggggtacat ttaaataa      738

```

<210> 3

<211> 139

5 <212> PRT

<213> Streptococcus suis

<400> 3

```

Leu Asn Asn Val Arg Ala Gln Val Gly Ser Gly Val Ser Val Gly Asn
1          5          10          15

Gly Glu Cys Tyr Ala Leu Ala Ser Trp Tyr Glu Arg Met Ile Ser Pro
20          25          30

Asp Ala Thr Val Gly Leu Gly Ala Gly Val Gly Trp Val Ser Gly Ala
35          40          45

Ile Gly Asp Thr Ile Ser Ala Lys Asn Ile Gly Ser Ser Tyr Asn Trp
50          55          60

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

Gln Ile Val Thr Leu Gly Ala Thr Pro Gly Asn Pro Tyr Gly His Val
85          90          95

Val Ile Val Glu Ala Val Asp Gly Asp Arg Leu Thr Ile Leu Glu Gln
100         105         110

Asn Tyr Gly Gly Lys Arg Tyr Pro Val Arg Asn Tyr Tyr Ser Ala Ala
115         120         125

Ser Tyr Arg Gln Gln Val Val His Tyr Ile Thr
130         135

```

ES 2 729 123 T3

<210> 4

<211> 67

<212> PRT

<213> Streptococcus suis

5 <400> 4

Arg Ser Tyr Arg Glu Thr Gly Thr Met Thr Val Thr Val Asp Ala Leu
1 5 10 15

Asn Val Arg Arg Ala Pro Asn Thr Ser Gly Glu Ile Val Ala Val Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Val Trp Val Ser Tyr Ile Gly Gly Ser Gly Lys Arg Asn Tyr
50 55 60

Val Ala Thr
65

<210> 5

10 <211> 280

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 5

ES 2 729 123 T3

Met	Glu	Thr	Leu	Lys	Gln	Ala	Glu	Ser	Tyr	Ile	Lys	Ser	Lys	Val	Asn	1	5	10	15
Thr	Gly	Thr	Asp	Phe	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Gln	Cys	Met	Asp	Leu	20	25	30	
Ala	Val	Asp	Tyr	Ile	Tyr	His	Val	Thr	Asp	Gly	Lys	Ile	Arg	Met	Trp	35	40	45	
Gly	Asn	Ala	Lys	Asp	Ala	Ile	Asn	Asn	Ser	Phe	Gly	Gly	Thr	Ala	Thr	50	55	60	
Val	Tyr	Lys	Asn	Tyr	Pro	Ala	Phe	Arg	Pro	Lys	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	65	70	75	80
Val	Trp	Thr	Thr	Gly	Asn	Phe	Ala	Thr	Tyr	Gly	His	Ile	Ala	Ile	Val	85	90	95	
Thr	Asn	Pro	Asp	Pro	Tyr	Gly	Asp	Leu	Gln	Tyr	Val	Thr	Val	Leu	Glu	100	105	110	
Gln	Asn	Trp	Asn	Gly	Asn	Gly	Ile	Tyr	Lys	Thr	Glu	Leu	Ala	Thr	Ile	115	120	125	
Arg	Thr	His	Asp	Tyr	Thr	Gly	Ile	Thr	His	Phe	Ile	Arg	Pro	Asn	Phe	130	135	140	
Ala	Thr	Glu	Ser	Ser	Val	Lys	Lys	Lys	Asp	Thr	Lys	Lys	Lys	Pro	Lys	145	150	155	160
Pro	Ser	Asn	Arg	Asp	Gly	Leu	Asn	Lys	Asp	Lys	Ile	Val	Tyr	Asp	Arg	165	170	175	
Thr	Asn	Ile	Asn	Tyr	Asn	Met	Val	Leu	Gln	Gly	Lys	Ser	Ala	Ser	Lys	180	185	190	
Ile	Thr	Val	Gly	Ser	Lys	Ala	Pro	Tyr	Asn	Leu	Lys	Trp	Ser	Lys	Gly				

ES 2 729 123 T3

	195		200		205										
Ala	Tyr	Phe	Asn	Ala	Lys	Ile	Asp	Gly	Leu	Gly	Ala	Thr	Ser	Ala	Thr
	210					215					220				
Arg	Tyr	Gly	Asp	Asn	Arg	Thr	Asn	Tyr	Arg	Phe	Asp	Val	Gly	Gln	Ala
225					230					235					240
Val	Tyr	Ala	Pro	Gly	Thr	Leu	Ile	Tyr	Val	Phe	Glu	Ile	Ile	Asp	Gly
				245					250					255	
Trp	Cys	Arg	Ile	Tyr	Trp	Asn	Asn	His	Asn	Glu	Trp	Ile	Trp	His	Glu
			260					265					270		
Arg	Leu	Ile	Val	Lys	Glu	Val	Phe								
		275					280								

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un polipéptido de lisina capaz de matar bacterias *Staphylococcus* y *Streptococcus* para uso en un procedimiento para tratar o prevenir infecciones bacterianas gram positivas de bacterias *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* donde las bacterias *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* están en una biopelícula y donde el polipéptido de lisina comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o variantes de la misma que tienen al menos identidad de 80 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1 y es eficaz para matar las bacterias *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* en la biopelícula y donde la biopelícula se dispersa o trata eficazmente.
2. Uso *ex vivo* o *in vitro* de una composición que comprende un polipéptido de lisina capaz de matar estafilococos y estreptococos para prevenir o reducir la formación de biopelícula bacteriana de *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* sobre un dispositivo médico, catéter o implante o la fijación y el crecimiento de bacterias *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* sobre el dispositivo médico, catéter o implante donde el polipéptido de lisina comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o variantes de la misma que tienen al menos identidad de 80 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1 y es eficaz para prevenir o reducir la formación de biopelícula bacteriana de *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* o la fijación y el crecimiento de bacterias *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* sobre el dispositivo médico, catéter o implante y donde el dispositivo médico, catéter o implante se pone en contacto con dicha composición.
3. Un polipéptido de lisina capaz de matar bacterias *Staphylococcus* y *Streptococcus* para uso en un procedimiento para tratar o prevenir infecciones bacterianas gram positivas por *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* donde las bacterias *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* están en una biopelícula y donde el polipéptido de lisina comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o variantes de la misma que tienen al menos identidad de 80 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1 y es eficaz para matar las bacterias *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* en la biopelícula y donde la biopelícula se rompe o trata eficazmente.
4. Uso de un polipéptido de lisina capaz de matar bacterias *Staphylococcus* y *Streptococcus* para romper o tratar una biopelícula bacteriana gram positiva de bacterias *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* donde el polipéptido de lisina comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o variantes de la misma que tienen al menos identidad de 80 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1 y es eficaz para matar las bacterias *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* en la biopelícula, donde el uso es *in vitro* o *ex vivo* y donde la biopelícula se dispersa o trata eficazmente.
5. Una composición que comprende un polipéptido de lisina capaz de matar bacterias *Staphylococcus* y *Streptococcus* para uso en un procedimiento para tratar una infección por *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos que implica o incluye una biopelícula en un humano donde el polipéptido de lisina comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o variantes de la misma que tienen al menos identidad de 80 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1 y es eficaz para matar las bacterias *Staphylococcus* en la biopelícula, que comprende la etapa de administrar a un humano con una infección por biopelícula de *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos, una cantidad eficaz de la composición mediante la cual el número de *Staphylococcus aureus* en el humano se reduce y la biopelícula y la infección consiguiente se controlan.
6. Uso de un polipéptido de lisina de acuerdo con la reivindicación 4 donde el crecimiento de biopelícula de *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* se reduce o previene sobre una superficie de un dispositivo, implante o membrana de separación administrando o utilizando dicho polipéptido de lisina.
7. La composición para uso, el polipéptido de lisina para uso o el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde el polipéptido de lisina comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o variantes de la misma que tienen al menos identidad de 90% con el polipéptido de SEQ ID NO: 1 y es eficaz para matar las bacterias *Staphylococcus* y/o *Streptococcus*.
8. La composición para uso, el polipéptido de lisina para uso o el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde el polipéptido de lisina comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1.
9. La composición para uso, el polipéptido de lisina para uso o el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 6, 7 u 8 donde las bacterias *Staphylococcus* y *Streptococcus* que el polipéptido de lisina es capaz de matar se seleccionan entre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus equi zoo*, *Streptococcus agalactiae* (GBS),

Streptococcus pyogenes (GAS), *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus dysgalactiae*, Grupo G *Streptococcus*, Grupo E *Streptococcus* y *Streptococcus pneumoniae*.

10. La composición para uso o el uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las
5 reivindicaciones 1, 2, 5, 7, 8 o 9 donde la composición comprende además uno o más antibióticos.

11. La composición para uso o el uso de la composición de acuerdo con la reivindicación 10 donde el antibiótico se selecciona del grupo que consiste en daptomicina, vancomicina y linezolid.

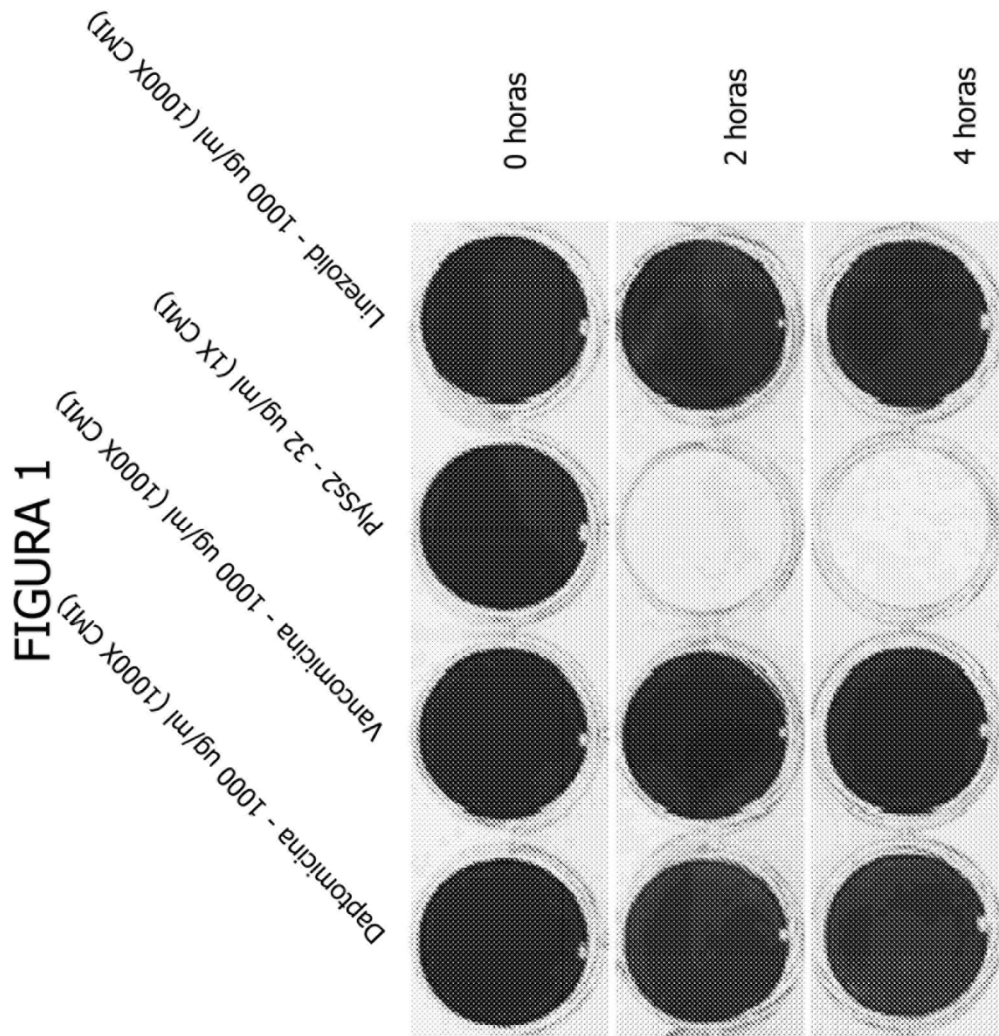
10 12. La composición para uso, el polipéptido de lisina para uso o el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 6 a 10, donde el polipéptido de lisina es eficaz contra bacterias resistentes a antibióticos.

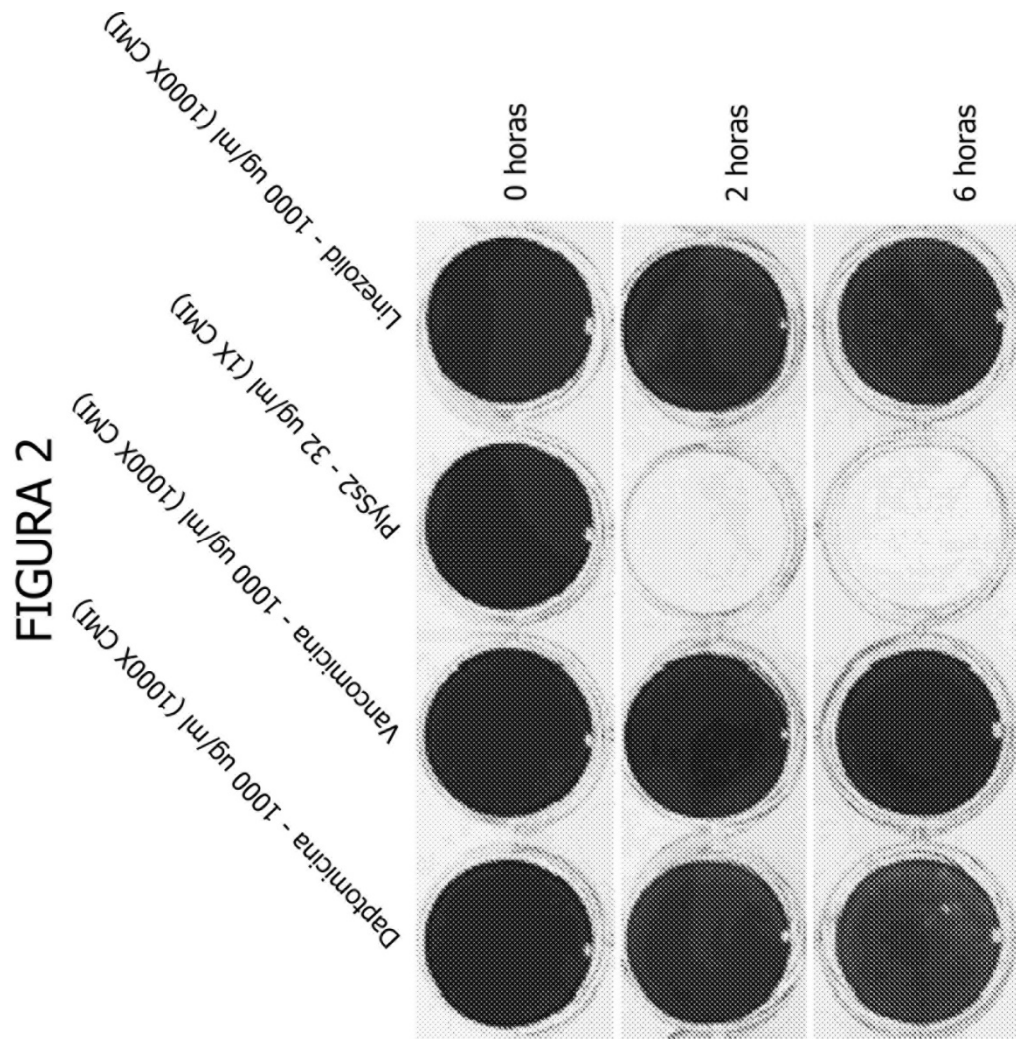
13. La composición para uso, el polipéptido de lisina para uso o el uso de acuerdo con la reivindicación 12 donde las bacterias resistentes a antibióticos son *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM),

15 *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (SARV), *Staphylococcus aureus* resistente a daptomicina (SARD) y *Staphylococcus aureus* resistente a linezolid (SARL).

14. La composición para uso, el polipéptido de lisina para uso o el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 6 a 10 donde la lisina de SEQ ID NO: 1 es eficaz contra bacterias con sensibilidad a
20 antibióticos alterada.

15. La composición para uso, el polipéptido de lisina para uso o el uso de acuerdo con la reivindicación 14 donde las bacterias con sensibilidad a antibióticos alterada son *Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia a vancomicina (SAIV).





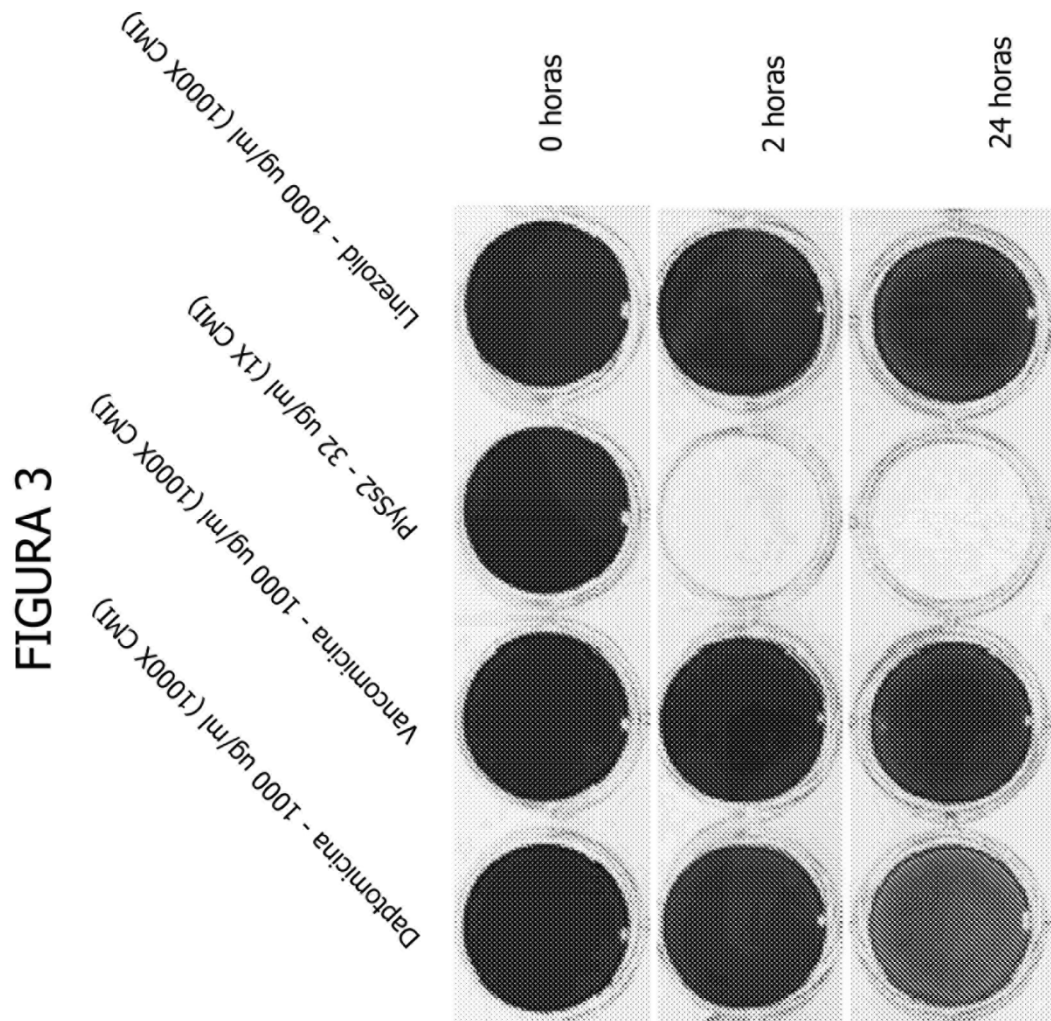


FIGURA 4

Efecto de PlySs2 (a 1/100 y 1/10 CMI) y daptomicina (a 1X y 10X CMI) sobre biopelículas de *S. aureus*

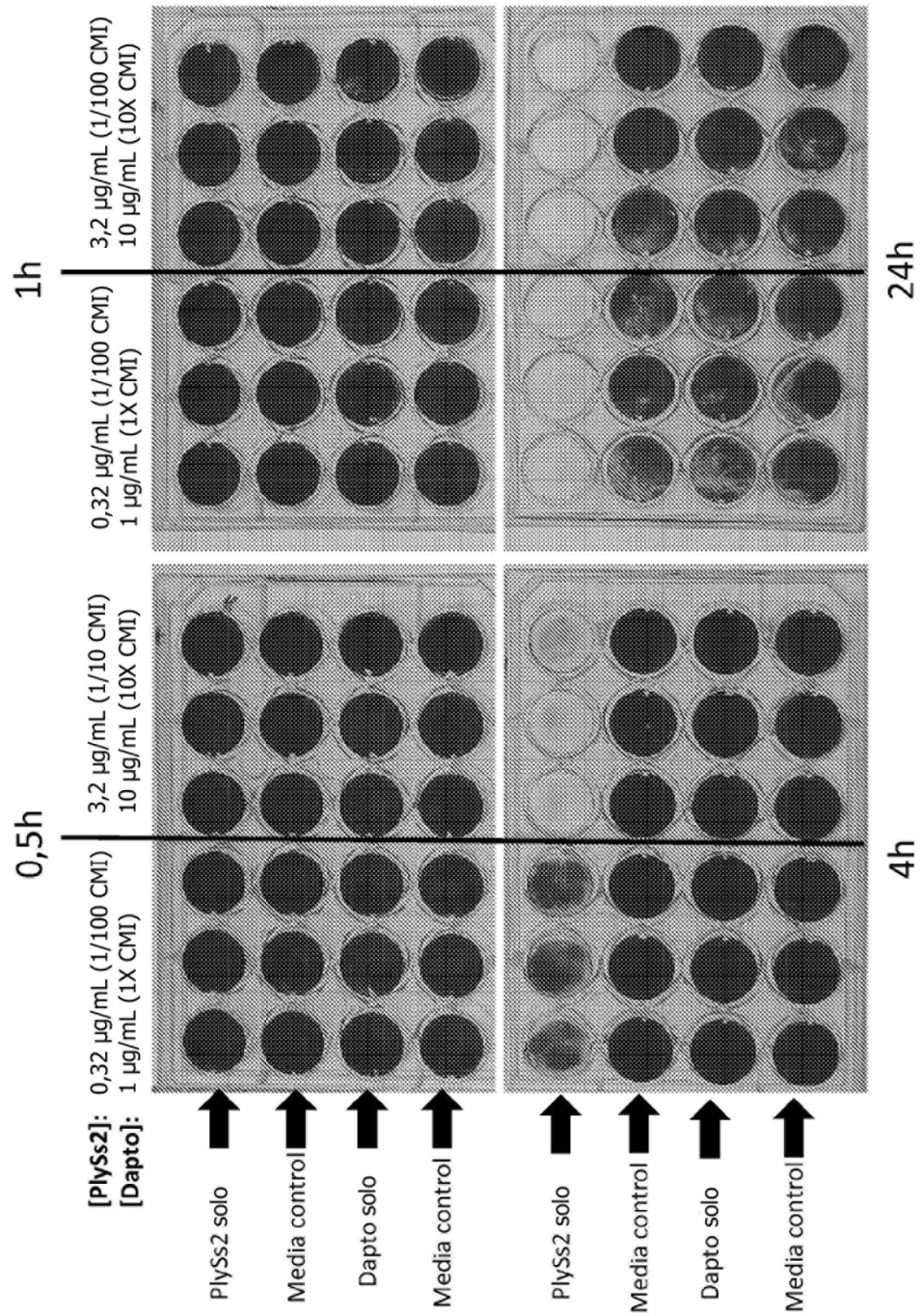
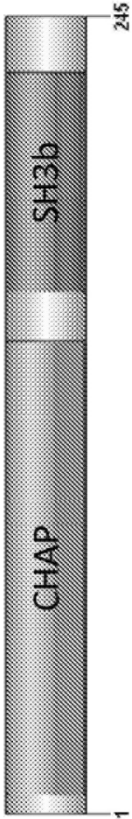


FIGURA 5

MTTVNEALNN VRAQVGSGVS VNGECYALA SWYERMISFD ATVGLGAGVG WVSGAIGDTI SAKNIGSSYN
WOANGWTIVST SCPEFKAGQIV TLGATPGNFI GHVVIVEAVD GDRLTILEQN YCGKRYEVRN YYSAAASYRQQ
VVHYITPPGT VAQSAFNLG SRSYRETGTM TVTVDAINVR RAPNTSGEIV AVYKRGESEFD YDTVIIDVNG
YVWVSYIGGS GKRNXYVATGA TKDGKRFNGA WGTFFK

Dominio CHAP en verde LNNVR...VVHYIT
Dominio SH3-5 en rojo RSYRE...GKRNXYVAT



ATGACAACAG TAAATGAAGC ATTAAATAAT GTAAGAGCTC AGGTTGGGTC CGGTGTGTCT GTTGGCAACG
GCGAATGCTA CGCTTTGGCT AGTTGGTACG AGCGCATGAT TAGTCCGGAT GCAACTGTCTG GACTTGGCGC
TGGTGTGGC TGGGTCAGCG GTGCAATCGG CGATACAATC TCTGCCAAA ACATCGGCTC ATCATACAAC
TGGCAAGCTA ACGGCTGGAC AGTTTCCACA TCTGGTCCAT TTAAGCAGG TCAGATTGTG ACGTTGGGG
CAACACCAGG AAACCCCTTAC GGACATGTGG TAATCGTCGA AGCAGTGGAC GCGATAGAT TGACTATTTT
GGAGCAAAAC TACGGCGGGA AACGTTATCC CGTCCGTAAT TATTACAGG CTGCAAGCTA TCGTCAACAG
GTCGTGCATT ACATCACACC GCCTGGCAGG GTCGCACAGT CAGCACCCAA CCTTGCAGGC TCTCGTTCCT
ATCGCGAGAC GGGCACTATG ACTGTACAGG TCGATGCTCT CAATGTTCTG AGGGCGCCAA ATACTTCAGG
CGAGATTGTA GCAGTATACA AGCGTGGTGA ATCATTTGAC TATGATACTG TCATCATCGA TGTCAATGGC
TATGTCCTGG TGTCATTACAT AGGCGGCAGC GGCAAAACGTA ACTACGTTGC GACGGGCGCT ACCAAAGACG
GTAAGCGTTT CGGCAATGCT TGGGGTACAT TTAAATAA

FIGURA 6

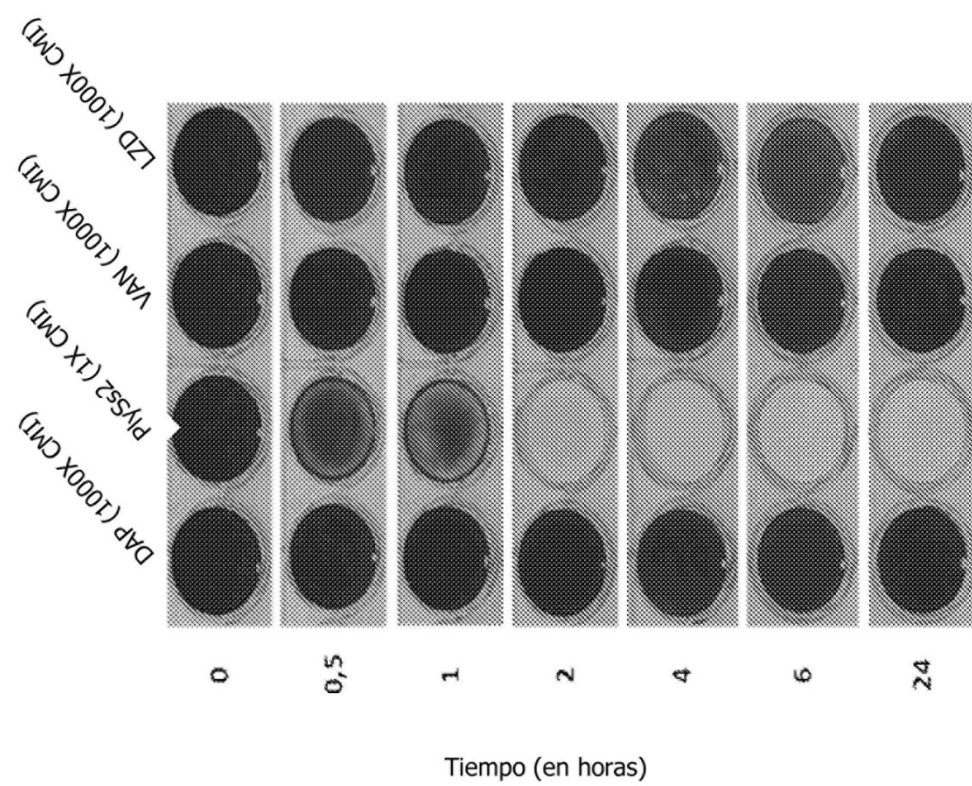


FIGURA 7

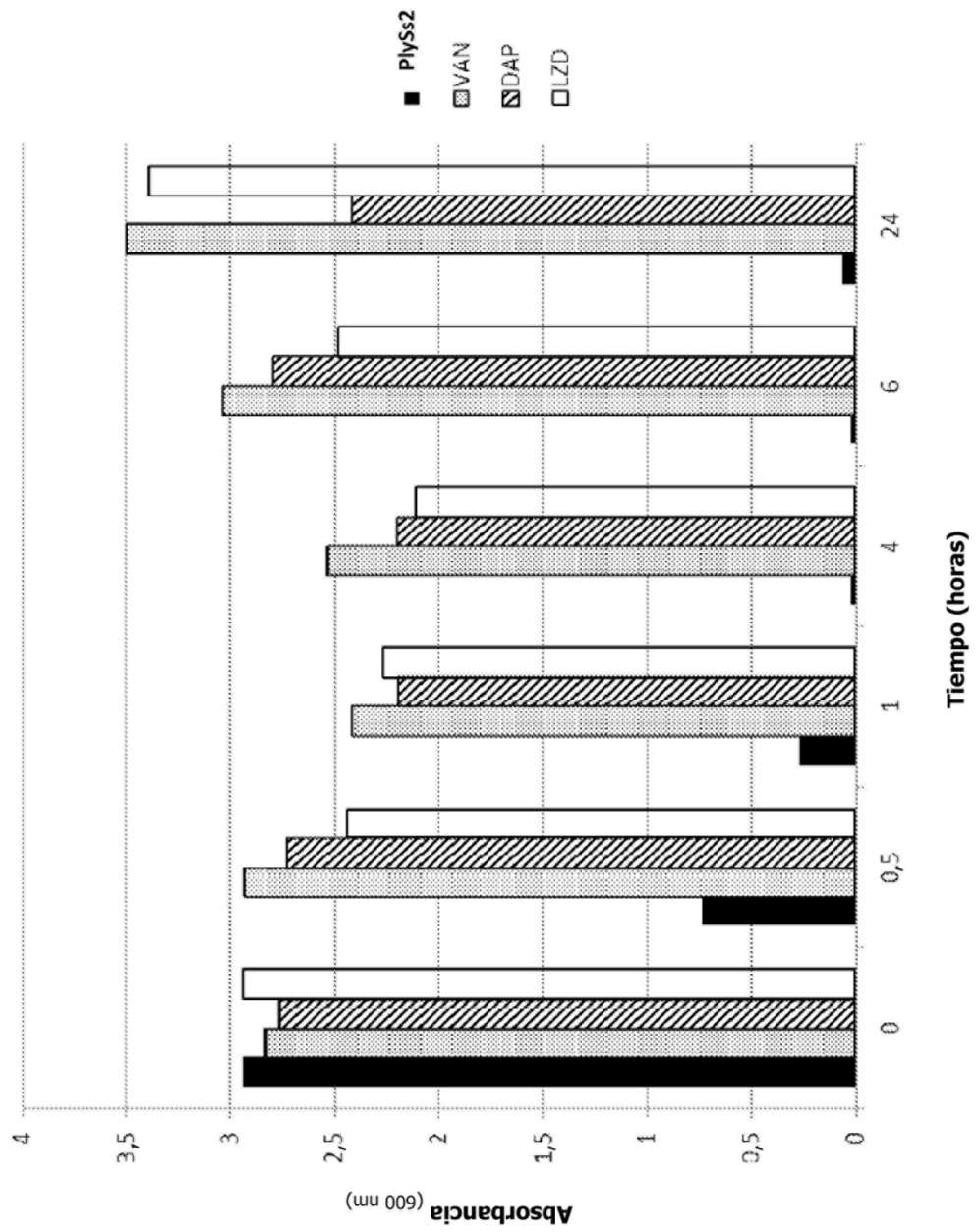


FIGURA 8

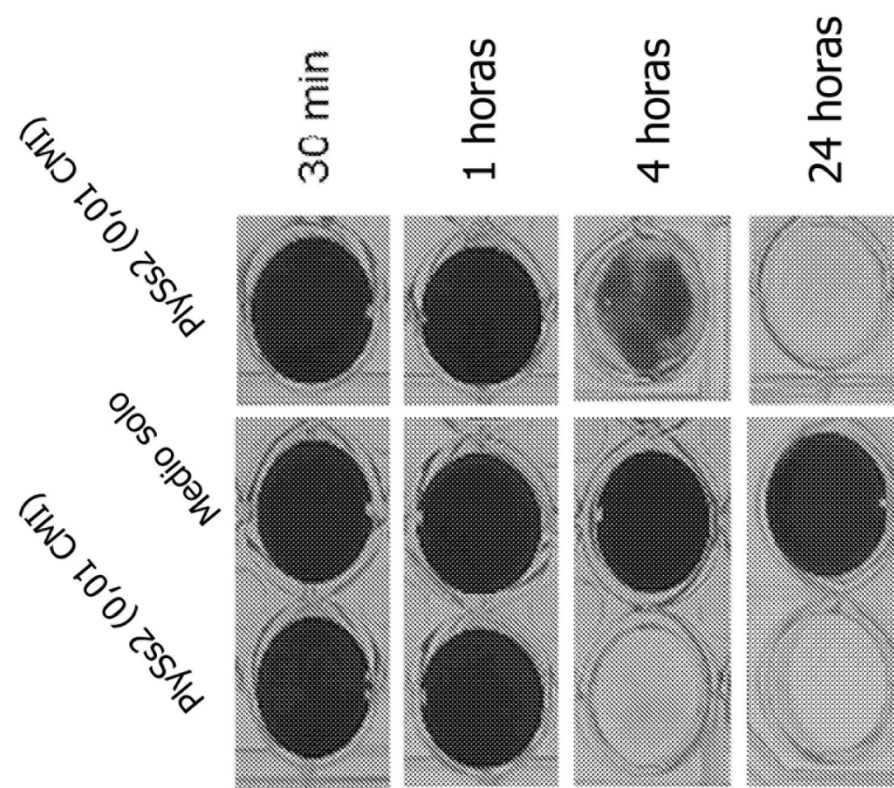


FIGURA 9

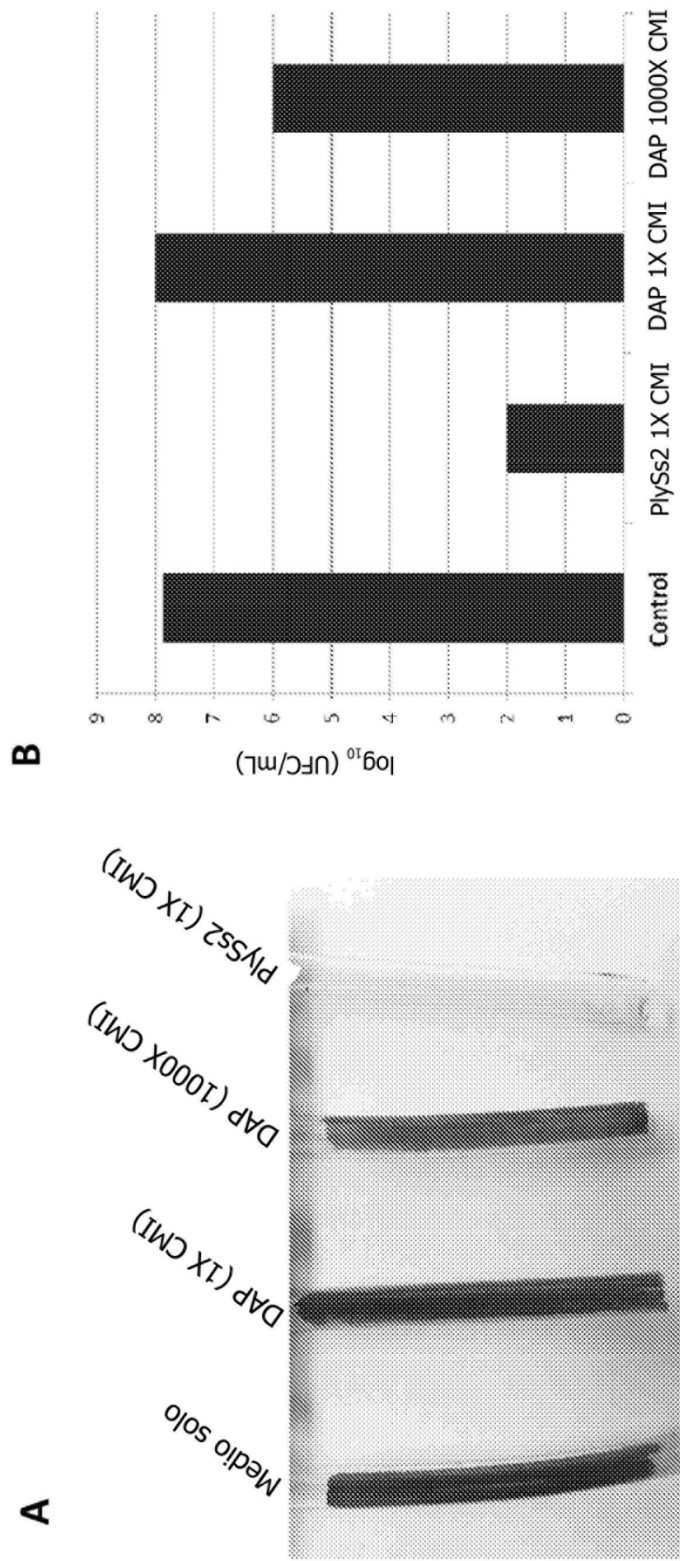


FIGURA 10
CMI de PlySs2

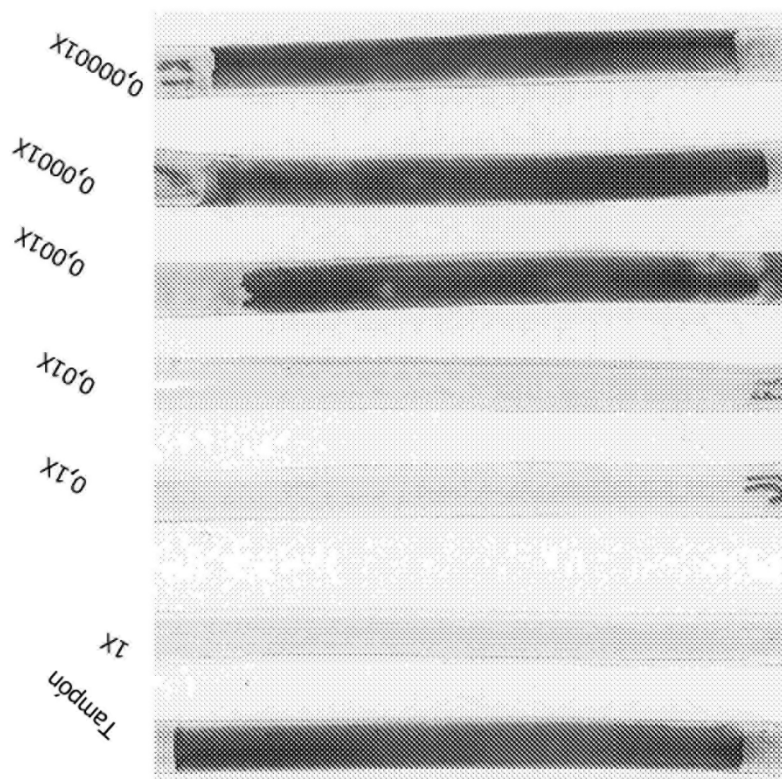


FIGURA 11

CMI de DAP

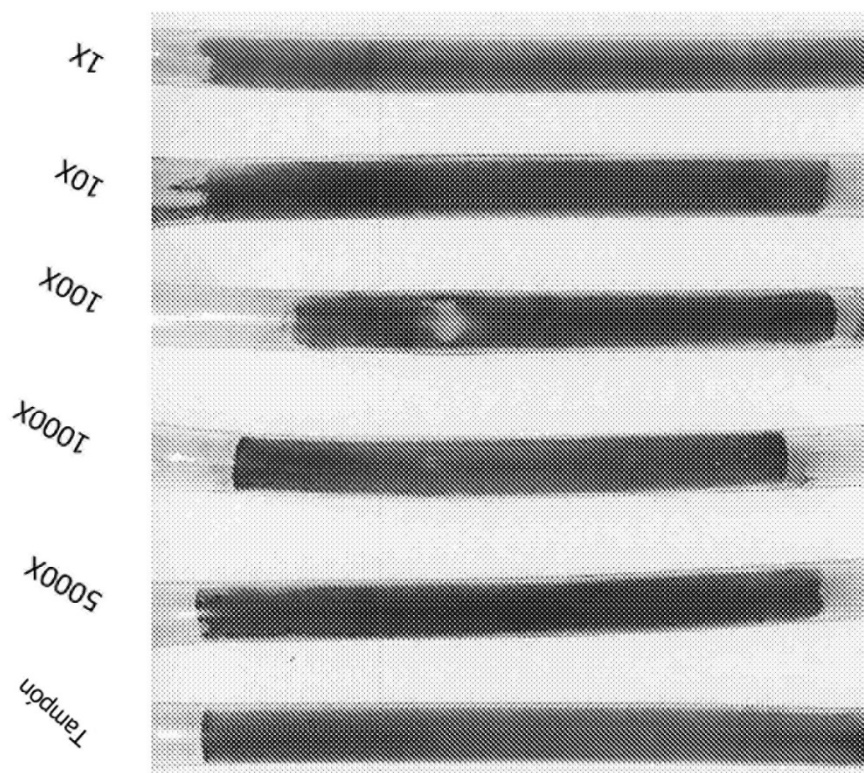


FIGURA 12

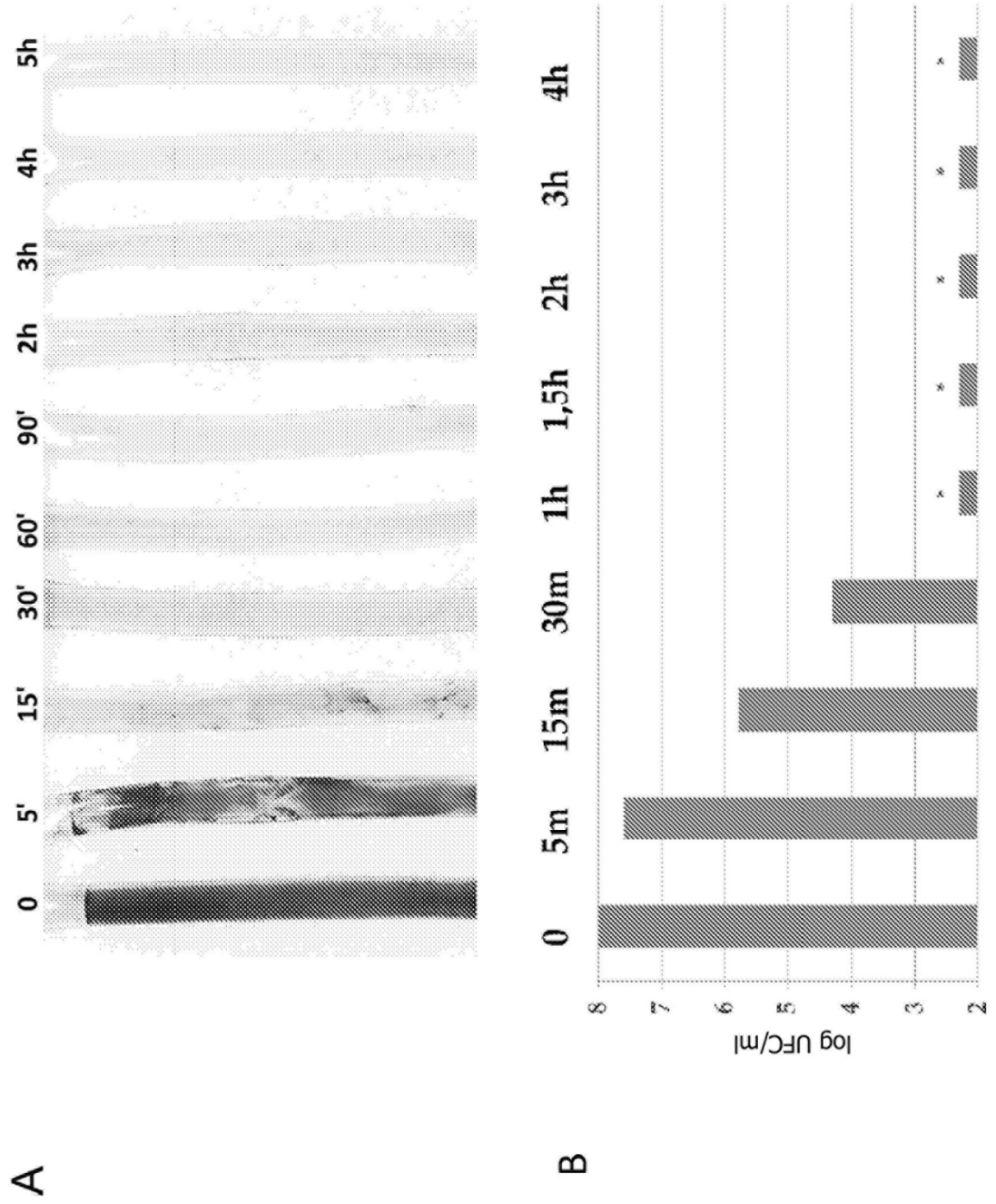


FIGURA 13

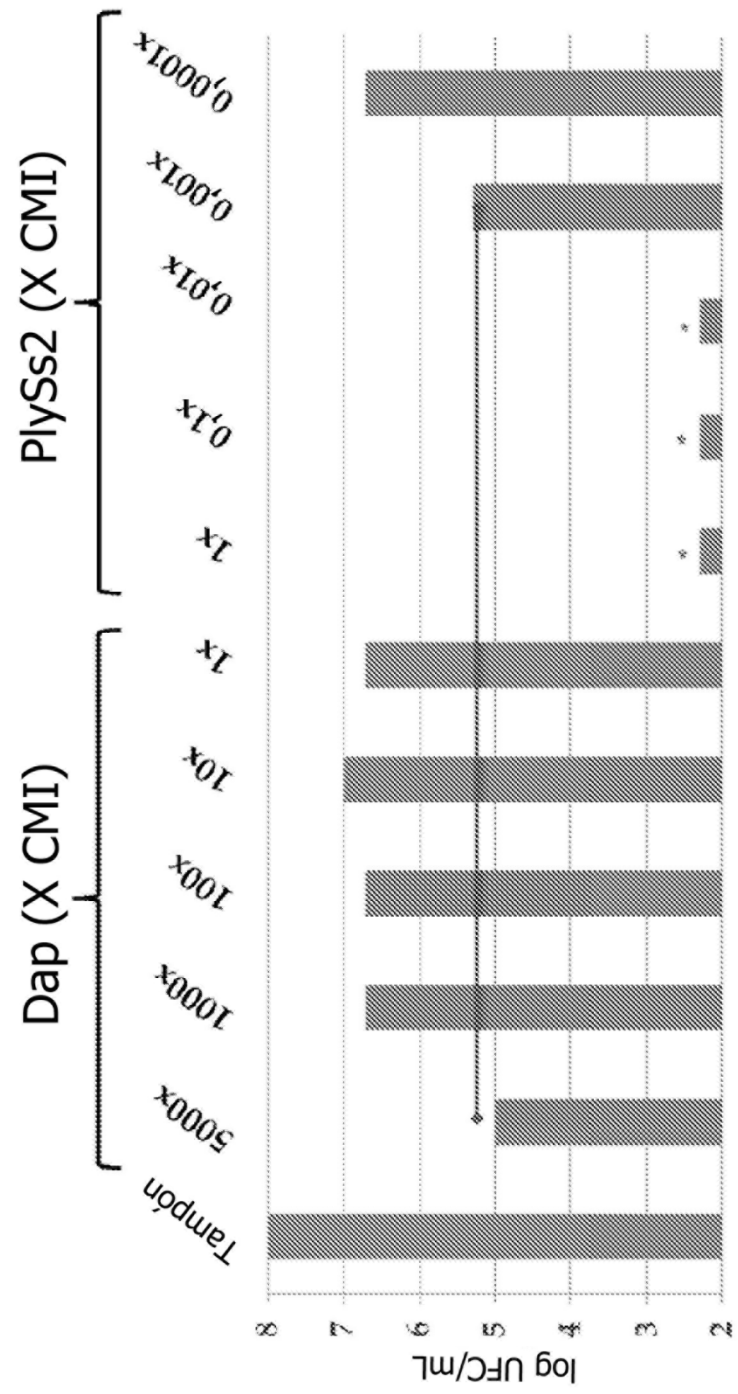


FIGURA 14

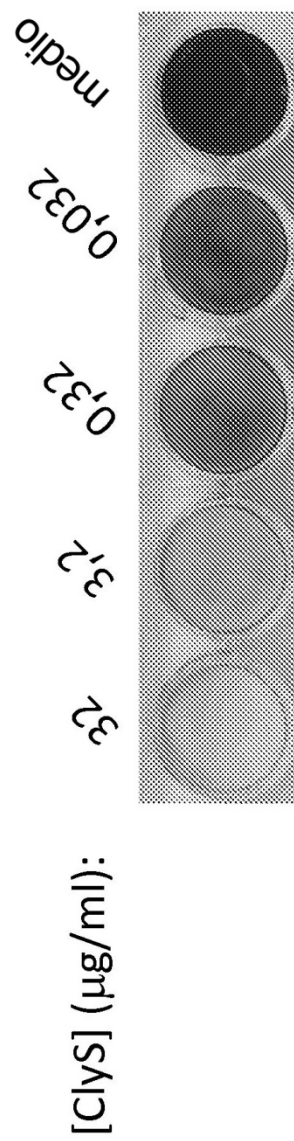


FIGURA 15

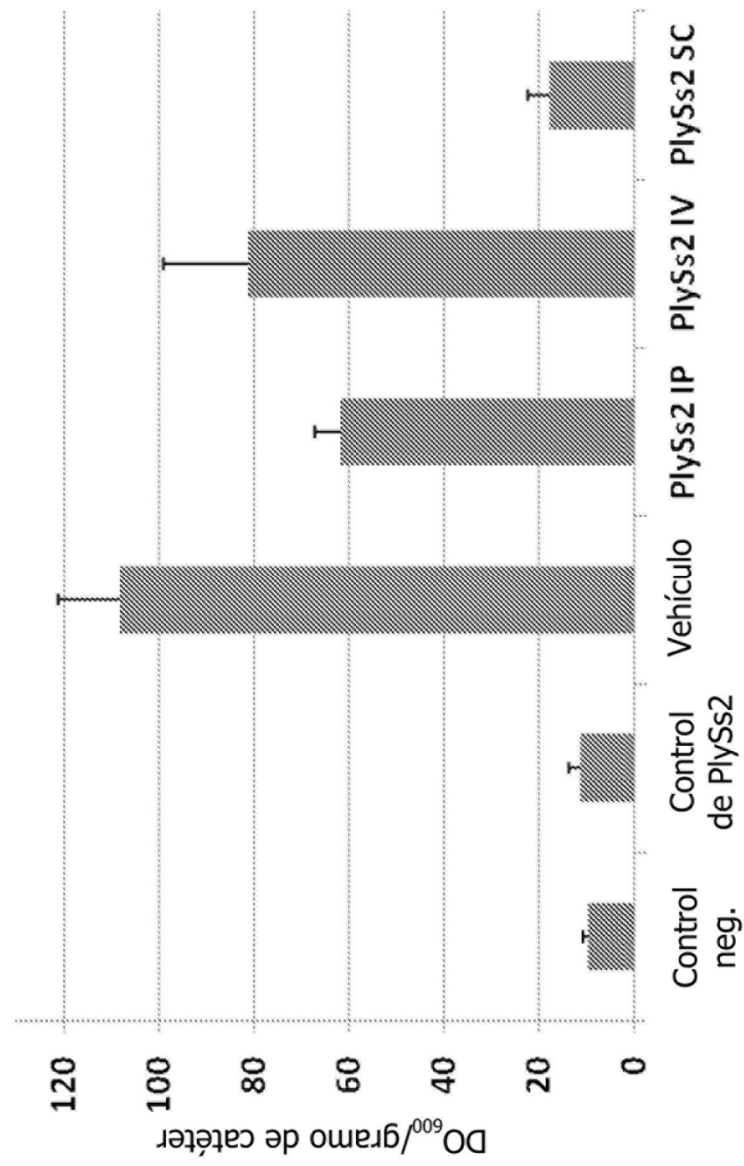


FIGURA 16

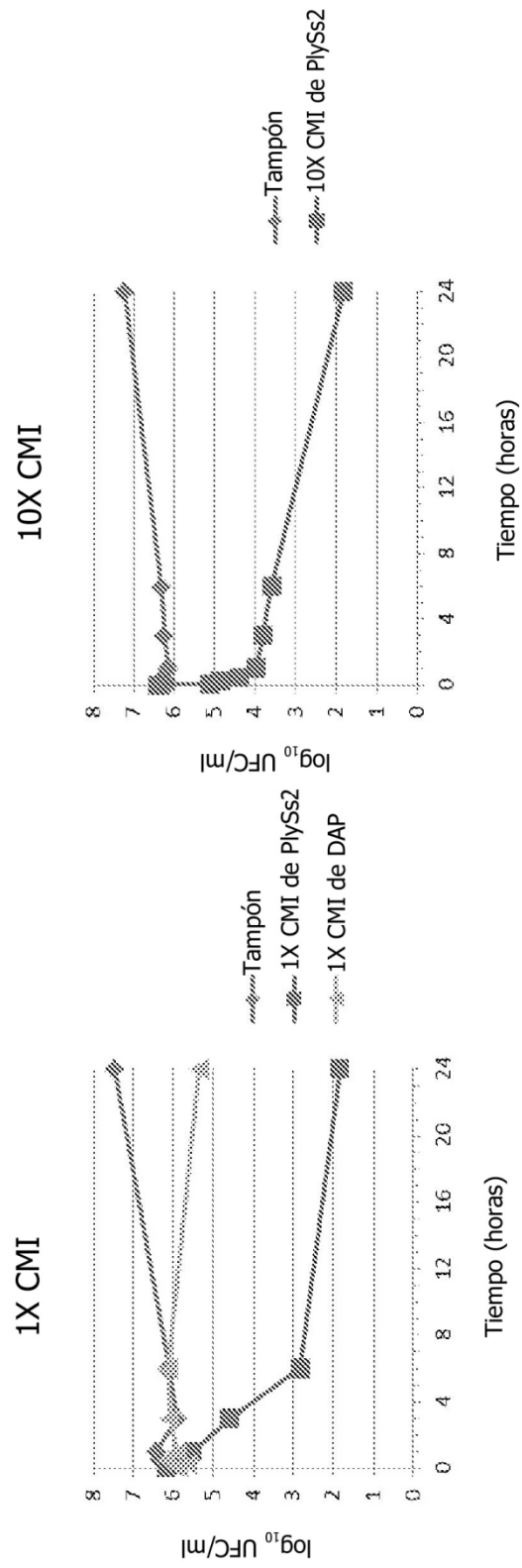


FIGURA 17

10X CMI
1X CMI
0,1X CMI
0,01X CMI
0,001X CMI
0,0001X CMI
Tampón
Tampón

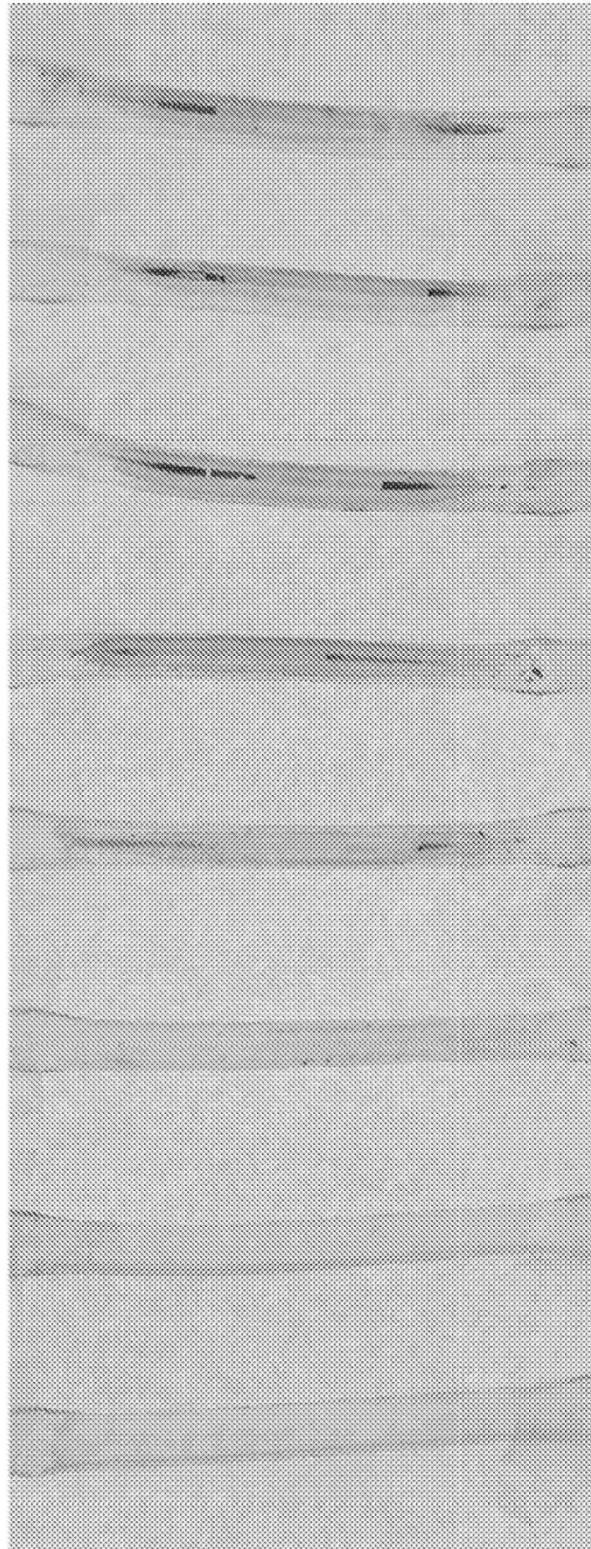


FIGURA 18

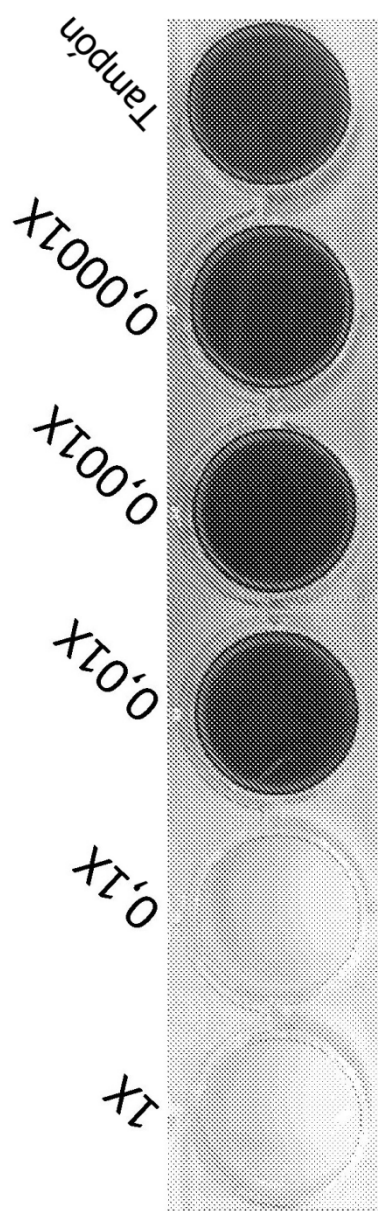


FIGURA 19

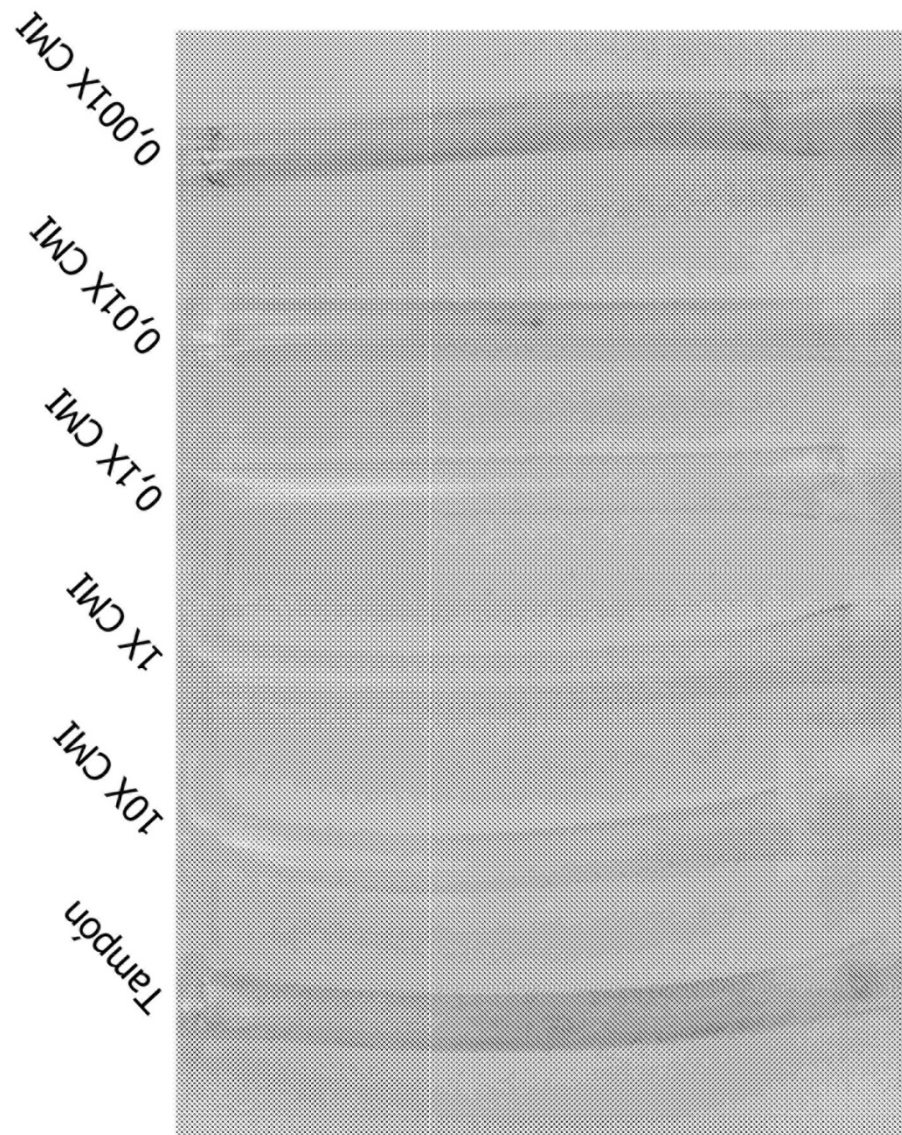


FIGURA 20

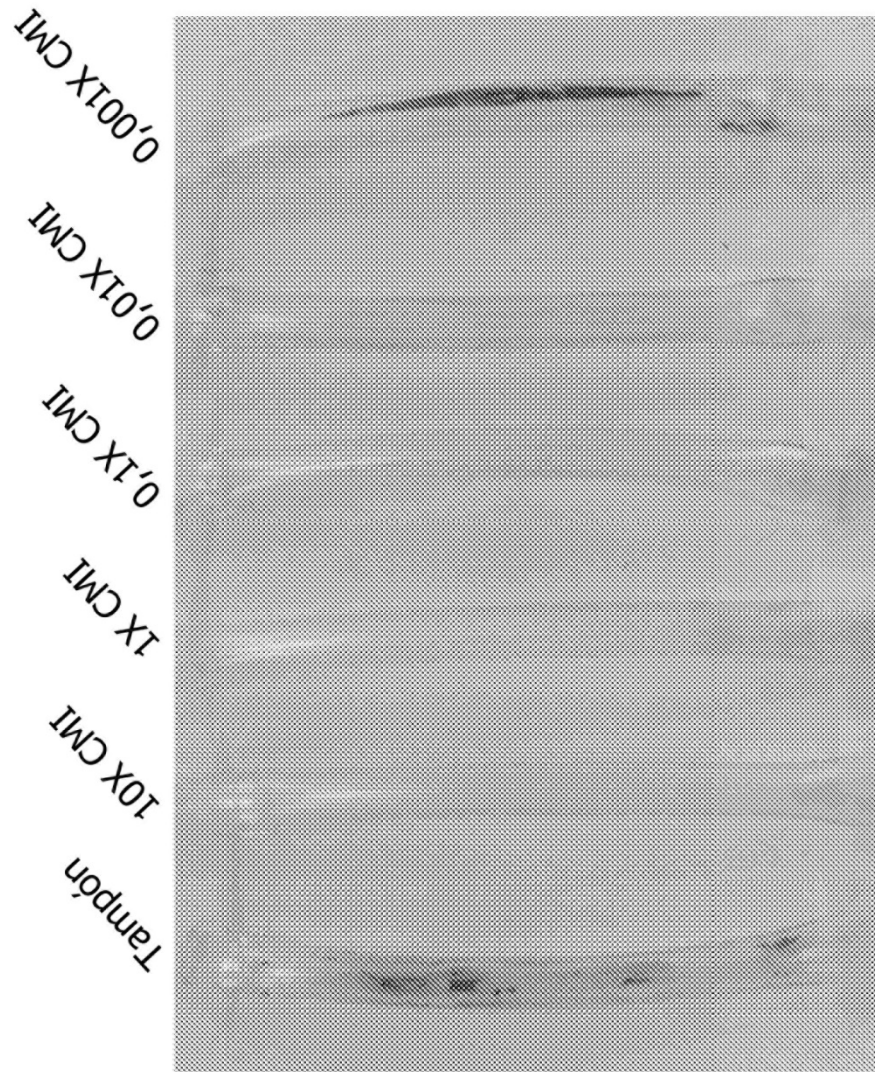


FIGURA 21

