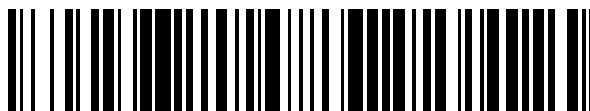


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 035**

51 Int. Cl.:

C07K 14/01 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2012 PCT/US2012/058717**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13052643**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2012 E 12839144 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2764093**

54 Título: **Lisinas de bacteriófago diméricas**

30 Prioridad:

05.10.2011 US 201161543803 P

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

24.09.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FISCHETTI, VINCENT A. y
RESCH, GREGORY**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 683 035 T3

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

DESCRIPCIÓN

Lisinas de bacteriófago diméricas

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a la generación y uso de lisinas diméricas para detectar y destruir las bacterias de *Streptococcus*, en particular lisinas mutantes capaces de dimerización en lisinas diméricas que poseen una actividad y/o estabilidad mejoradas. La presente invención se refiere a procedimientos para la mejora profiláctica y terapéutica, descolonización, y tratamiento de bacterias, en particular las cepas bacterianas de *Streptococcus*, y afecciones relacionadas. Los procedimientos de la invención utilizan lisinas de fago diméricas, en concreto lisinas de fago de neumococos diméricas, que incluyen las enzimas líticas Cpl-1 y variantes de las mismas.

ANTECEDENTES

15 Un problema importante en medicina ha sido el desarrollo de bacterias resistentes a los fármacos, ya que se usan más antibióticos para una amplia variedad de enfermedades y otras afecciones. Las infecciones hospitalarias son la 8ª causa principal de muerte en los Estados Unidos debido en gran parte a patógenos resistentes a fármacos y de reciente aparición. El uso de más antibióticos y el número de bacterias que muestran resistencia han dado lugar a
20 tiempos de tratamiento prolongados. Además, ahora se están usando con más frecuencia antibióticos inespecíficos 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 de la mucosidad. Adicionalmente, parece que está en aumento el número de personas alérgicas a los antibióticos. En consecuencia, existe la necesidad comercial de propuestas antibacterianas nuevas, especialmente las que operen mediante
25 modalidades nuevas o que proporcionen medios nuevos para destruir a las bacterias patógenas.

Las bacterias gram positivas están rodeadas por una pared celular que contiene polipéptidos y polisacáridos. La pared celular gram positiva aparece como una pared amplia y densa con un grosor de 20-80 nm que consiste en muchas capas de interconexión de peptidoglucano. Entre el 60 % y el 90 % de la pared celular gram positiva es
30 peptidoglucano, dándole forma a la célula, una estructura rígida y una resistencia al choque osmótico. La pared celular no excluye el violeta de metilo de la tinción de Gram, dejando que las células se tiñan de púrpura y sean por lo tanto "gram-positivas". Las bacterias gram positivas incluyen, aunque sin limitación, los géneros: *Actinomyces*, *Bacillus*, *Listeria*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, y *Clostridium*. Las especies médicamente relevantes incluyen: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*,
35 *Staphylococcus aureus*, y *Enterococcus faecalis*.

Los antibacterianos que inhiben la síntesis de la pared celular, como las penicilinas y cefalosporinas, interfieren en el enlace de los interpeptidos del peptidoglucano y debilitan la pared celular de bacterias tanto gram positivas como gram negativas. Como los peptidoglucanos de las bacterias gram positivas están expuestos, las bacterias gram
40 positivas son más susceptibles a estos antibióticos. Ventajosamente, las células eucariotas carecen de paredes celulares y no son susceptibles a estos fármacos u otros agentes de pared celular.

Se ha intentado tratar enfermedades bacterianas usando bacteriófagos. Sin embargo, la introducción directa de bacteriófagos en un animal para prevenir o combatir enfermedades tiene ciertas desventajas. Específicamente, tanto
45 la bacteria como el fago tienen que estar en los ciclos de crecimiento correctos y sincronizados para que el fago se una. Adicionalmente, debe haber el número correcto de fagos para que se unan a la bacteria; si hay demasiados o muy pocos fagos, no habrá unión o no habrá producción de enzima lisina. El fago también debe ser suficientemente activo. Los fagos también son inhibidos por muchas cosas que incluyen desechos bacterianos del organismo que van a atacar. La posibilidad de reacciones inmunológicas complica más el uso directo de un bacteriófago para tratar
50 infecciones bacterianas, haciendo al fago no funcional.

Las propuestas novedosas de terapia microbiana incluyen antibióticos basados en enzimas ("enzibióticos"), tales como las lisinas de bacteriófago. Los fagos usan estas lisinas para digerir la pared celular de sus huéspedes bacterianos, liberando la progenie viral por medio de lisis hipotónica. Se produce un resultado similar cuando lisinas
55 recombinantes purificadas son añadidas externamente a bacterias gram positivas. La alta actividad letal de las lisinas contra los patógenos gram positivos las hace candidatas atractivas para su desarrollo como agentes terapéuticos. Las lisinas de bacteriófago fueron propuestas 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 de doble cadena
60 (ADNdc) para coordinar la lisis del huésped con la terminación del ensamblaje viral (Wang, I. N. y col. (2000) Annu

Rev Microbiol 54:799-825). El fago codifica tanto holinas que abren un poro en la membrana bacteriana como peptidoglucano hidrolasas denominadas lisinas, que rompen los enlaces de la pared bacteriana. Después en la infección, la lisina se traslada a la matriz de la pared celular en donde hidroliza rápidamente enlaces covalentes esenciales para la integridad del peptidoglucano, ocasionando lisis bacteriana y liberación concomitante de fago de progenie.

Los miembros de la familia de lisinas exhiben un diseño modular en el que el dominio catalítico está fusionado con un dominio de especificidad o unión (López, R. y col. (1997) Microb Drug Resist 3:199-211). Las lisinas pueden ser clonadas de secuencias de profago virales dentro de los genomas bacterianos y pueden usarse para tratamientos (Beres, S.B. y col. (2007) PLoS ONE 2(8):1-14). Cuando se administran externamente, las lisinas son capaces de tener acceso a los enlaces de una pared celular gram positiva (Figura 1) (Fischetti, V.A. (2008) Curr Opin Microbiol 11:393-400). Se ha demostrado que las lisinas tienen una actividad letal superior contra numerosos patógenos gram positivos (especialmente las bacterias de las que fueron clonadas), haciendo posible su 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).

Se ha establecido que las enzimas líticas de bacteriófago son útiles en la evaluación y tratamiento específico de varios tipos de infección en sujetos y a través de varias vías de administración. Por ejemplo, la patente de EE. UU. con n.º 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 con una enzima lisina semipurificada y asociada con un fago estreptocócico del grupo C. Este trabajo de la enzima se convirtió en la base de investigación adicional, llevando 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 en tejidos dérmicos. La patente de EE. UU. 6.254.866 (Fischetti y Loomis) describe un procedimiento de tratamiento de infecciones bacterianas del tubo digestivo, que comprende administrar una enzima lítica específica para las bacterias infecciosas. El vehículo para suministrar por lo menos una enzima lítica al tubo digestivo se selecciona de entre el grupo que consiste en supositorios, enemas, jarabes o píldoras con recubrimiento entérico. La patente de EE. UU. 6.264.945 (Fischetti y Loomis) describe un procedimiento y composición para el tratamiento de infecciones bacterianas, mediante la introducción parenteral (por vía intramuscular, subcutánea o intravenosa) de, por lo menos, una enzima lítica producida por una bacteria infectada con un bacteriófago específico para esa bacteria, y un vehículo apropiado para suministrar la enzima lítica a un paciente.

Las enzimas líticas asociadas con fago se han identificado y clonado de varios bacteriófagos, cada uno mostrando eficacia para destruir cepas bacterianas específicas. Las patentes de EE. UU. 7.402.309, 7.638.600 y la solicitud publicada de PCT WO2008/018854 proporcionan distintas enzimas líticas asociadas con fago, que son útiles como agentes antibacterianos para el tratamiento o reducción de infecciones de *Bacillus anthracis*. La patente de EE. UU. 7.569.223 describe la enzima lítica Pal de fago neumocócica para *Streptococcus pneumoniae*. Una lisina útil para *Enterococcus* (*E. faecalis* y *E. faecium*, incluso cepas resistentes a vancomicina) se describe en la patente de EE. UU. 7.582.291. La US 2008/0221035 describe lisinas Ply-GBS mutantes y altamente eficaces para destruir estreptococos del grupo B. Una lisina quimérica denominada ClyS, con actividad contra bacterias estafilocócicas, que incluyen *Staphylococcus aureus*, se detalla en WO 2010/002959.

La *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), un diplococo encapsulado gram positivo, es un agente etiológico primario en enfermedades humanas como bacteriemia, meningitis, neumonía, otitis media, y sinusitis. Esta bacteria es responsable de la muerte de más de 1 millón de niños menores de 5 años, anualmente y en todo el mundo (English, M (2000) Paediatr Respir Rev 1:21-5), así, la neumonía extrahospitalaria es la sexta causa más común de muerte en los EE. UU. (File, TM (2004) Am J Med 117 Suppl 3A:39S-50S). Además, la *S. pneumoniae* es una causa principal de otitis media aguda en todo el mundo, una enfermedad que afecta a más de 5 millones de niños anualmente en EE. UU. (CDC (2009) Pneumococcal diseases, p. 217-30. En W. Atkinson, y col. (ed.), Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases (11th ed), Public Health Foundation, Washington DC). Finalmente, las infecciones secundarias como resultado de la pandemia de gripe son responsables de más del 90 % de las muertes, siendo la *S. pneumoniae* la causa principal de estas muertes (Brundage, JF Shanks GD (2008) Emerg Infect Dis 14:1193-9; Brundage, JF Shanks GD (2007) J Infect Dis 196:1717-8; Morens, DM y col (2009) N Engl J Med 361:225-9; Morens, DM y col (2009) Public Health Rep 124:22-5). Las infecciones neumocócicas son, a menudo, tratadas con antibióticos, pero los fracasos en el tratamiento, confirmados bacteriológicamente, debidos al aumento de la incidencia en la resistencia (Reinert, RR (2009) Clin Microbiol Infect 15 Suppl 3:1-3) hizo informar sobre macrólidos, fluoroquinolonas, y cefalosporinas (Mandell, LA y col. (2002) Clin Infect Dis 35:721-7). El uso excesivo e indebido de los antibióticos como resultado del tratamiento de millones de casos de otitis media solo contribuyó a la

aparición de cepas resistentes (Goossens, H (2009) Clin Microbiol Infect 15 Suppl 3:12-5. En conjunto, estas observaciones han puesto de relevancia la necesidad de nuevos fármacos, que actúen mediante mecanismos totalmente diferentes, para el tratamiento y prevención de las enfermedades asociadas a neumococos.

5 Antes del descubrimiento de los antibióticos, los fagos, un importante depredador de las bacterias por naturaleza, fueron considerados como un procedimiento posible para el control de las bacterias patogénicas. En su momento, se publicaron varios informes sobre el exitoso uso del fago para tratar infecciones (Sulakvelidze, A y Barrow, P (2005) Phage therapy in animals and agribusiness, p. 335-71. En E. Kutter y A. Sulakvelidze (ed.), Bacteriophages: Biology and Applications, CRC Press, USA; Sulakvelidze, A and Kutter, E (2005) Bacteriophage therapy in humans, p. 381-
10 426. En E. Kutter y A. Sulakvelidze (ed.), Bacteriophages: Biology and Applications, CRC Press, USA), pero el advenimiento de los antibióticos en la década de los 40 condujo a un rápido declive en la investigación sobre terapias con fago en occidente. En la pasada década se ha presenciado un renovado interés en relación a la terapia con fago, así como en compuestos antibacterianos derivados de fago (Borysowski, J y col. (2006) Exp Biol Med 231:366-77; Fischetti, VA (2008) Curr Opin Microbiol 11:393-400).

15

Uno de estos productos, lisinas o endolisinas de fago, ha sido explotado por su rápida acción destructiva en las bacterias gram positivas (Borysowski, J y col. (2006) Exp Biol Med 231:366-77; Fischetti, VA (2008) Curr Opin Microbiol 11:393-400). Estas enzimas específicas se producen en un momento en el que la progenie de fago necesita escapar del huésped bacteriano. El fago neumocócico Cp-1 produce la lisina Cpl-1, una enzima de 37 kDa.

20 Esta lisina se construye como todas dichas endolisinas, poseedoras de dos dominios bien definidos y conectados por un conector flexible. La actividad catalítica se restringe al dominio del extremo N-terminal, mientras que la parte con el extremo C-terminal, que contiene 6 repeticiones de unión a colina (ChBR) y una cola de extremo C-terminal de 13 aminoácidos, es necesaria para la unión a sustrato en la pared celular neumocócica. La Cpl-1 pertenece a familia de las lisozimas que se dirigen a uniones β 1,4 entre ácido N-acetilmurámico y residuos N-acetil-D-
25 glucosamina en el peptidoglucano (Perez-Dorado, INE y col. (2007) J Biol Chem 282:24990-9). Su actividad dependiente de colina hace a la Cpl-1 altamente específica a *S. pneumoniae* (García, JL y col. (1987) J Virol 61:2573-80). El gen Cpl-1 ha sido clonado en el vector de alta expresión pinIIIAn y después sobreexpresado y purificado (Loeffler, JM y col. (2003) Infect Immun 71:6199-204).

30 La Cpl-1 ha sido probada con éxito para tratar la sepsis neumocócica (Jado, I y col. (2003) J Antimicrob Chemother 52:967-73; Loeffler, JM y Fischetti, VA (2003) Antimicrob Agents Chemother 47:375-7), endocarditis (Entenza, JM y col. (2005) Antimicrob Agents Chemother 49:4789-92), pneumococcal meningitis (Grandgirard, D y col. (2008) J Infect Dis 197:1519-22), and pneumonia (Witzenrath, M y col. (2009) Crit Care Med 37:642-9) en modelos de roedores. No obstante, las proteínas normalmente son eliminadas rápidamente *in vivo* y se han necesitado
35 inyecciones repetidas o incluso continuas de Cpl-1 en muchos estudios realizados hasta la fecha (Entenza, JM y col. (2005) Antimicrob Agents Chemother 49:4789-92. 31; Witzenrath, M y col. (2009) Crit Care Med 37:642-9).

Resch, G. y col. (2009, Abs. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. 102:1-2) describe que la PEGilación puede extender la vida media del suero de una proteína de minutos a horas, llevando a un aumento general de la eficacia. El
40 conjugado descrito retiene el 25 % de la actividad antimicrobiana de la Cpl-1 frente a la *S. pneumoniae*.

Resch, G. y col. (2011, Int. J. Antimicrob. Agents 38:516-521) describe un dímero de lisina de fago (Cpl-1) estable con aumento de la actividad antineumocócica y disminución de la eliminación de plasma.

45 Resch, G. y col. (2011, AMB Express, 1:29) describe que la PEGilación de una endolisina de bacteriófago inhibe la actividad bactericida.

Estos resultados pueden ser una deficiencia para el desarrollo clínico de la Cpl-1 y lisinas semejantes. Lo necesario en la técnica son lisinas mejoradas que puedan usarse para tratar enfermedades neumocócicas que tengan
50 actividad destructiva y parámetros mejorados clínicamente relevantes, tales como una mayor vida media o una disminución de la eliminación *in vivo*.

RESUMEN DE LA INVENCION

55 En un aspecto general, la presente invención provee lisinas mutantes, mutadas para adquirir la capacidad de dimerizar fácilmente, generando, de este modo, lisinas diméricas que poseen una actividad mejorada o una actividad destructiva bacteriana, y mayor estabilidad, que incluye mejor estabilidad a largo plazo en un animal o mamífero y capacidad destructiva bacteriana de acción prolongada en un ámbito biológica o clínicamente relevante.

60 En un aspecto, la presente invención provee lisinas de fago antibacterianas diméricas aisladas que comprenden dos

monómeros de lisina de fago específico para bacterias unidos covalentemente entre sí, donde dicho dímero posee actividad destructiva contra una o más bacterias específicas. En un aspecto, la presente invención proporciona lisinas de fago específico de *Streptococcus* diméricas y aisladas que comprenden dos monómeros de lisina de fago específico de *Streptococcus* unidos covalentemente entre sí, donde dicho dímero posee actividad destructiva contra una o más bacterias de *Streptococcus* y donde cada monómero tiene un residuo Cys que se encuentra entre 14 y 20 aminoácidos desde el extremo C-terminal, donde dichos monómeros de lisina están unidos covalentemente entre sí por un enlace disulfido y donde dichos monómeros de lisina no poseen un residuo Cys en los 45 primeros residuos.

En ciertas realizaciones, los monómeros de lisina son monómeros de Cpl-1 que tienen, al menos, un 90 % de identidad de secuencia con una Cpl-1 no mutada (SEQ ID NO: 1), y que tienen un residuo Cys que se encuentra entre 14 y 20 aminoácidos desde el extremo C-terminal, o son monómeros Pal que tienen, al menos, una identidad de secuencia del 90 % con Pal no mutada (SEQ ID NO: 5) y que tiene un residuo Cys que está entre 14 y 20 aminoácidos desde el extremo C-terminal.

En ciertas realizaciones, los monómeros de lisina tienen, al menos, un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % de identidad de secuencia con la lisina Cpl-1 no mutada tal como se expone en la Figura 1 y la 6 y la SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, los monómeros de lisina tienen, al menos, un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la lisina Pal no mutada tal como se expone en la Figura 7 y la SEQ ID NO: 5.

La presente descripción provee monómeros de lisina que están unidos covalentemente entre sí por un enlace disulfido. En ciertos aspectos ejemplares, cada monómero de lisina tiene un residuo Cys ubicado en estrecha proximidad con el extremo C-terminal, particularmente entre 14 y 20 aminoácidos desde el extremo C-terminal. La presente descripción provee monómeros de lisina que no tienen un residuo Cys entre los primeros 45 residuos. Se proveen lisinas Cpl-1 mutantes y ejemplares en el presente documento, incluidas en la Figura 6 y en la Tabla 1. En una realización particular, los monómeros de lisina tienen una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la Figura 6 o como se provee en la Tabla 1. En otra realización, los monómeros de lisina tienen una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la Figura 7. En ciertas realizaciones, los monómeros de lisina comprenden un dominio catalítico de una primera lisina de fago específica de *Streptococcus* y un dominio de unión de una segunda lisina de fago específico de *Streptococcus*.

La presente invención proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una lisina para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección causada por una infección de estreptococos donde la lisina es una lisina de fago específico de *Streptococcus* dimérica y aislada que comprende dos monómeros de lisina de fago específico de *Streptococcus* unidos covalentemente entre sí, donde dicho dímero posee actividad destructiva contra una o más bacterias de *Streptococcus* y donde cada monómero tiene un residuo Cys que se encuentra entre 14 y 20 aminoácidos desde el extremo C-terminal, donde dichos monómeros de lisina están unidos covalentemente entre sí por un enlace disulfido y donde dichos monómeros de lisina no poseen un residuo Cys en los 45 primeros residuos. En ciertas realizaciones, la infección es causada por la *Streptococcus pneumoniae*. La enfermedad o afección causada por la infección de *Streptococcus pneumoniae* puede ser, al menos, una de bacteriemia, meningitis, neumonía, otitis media o sinusitis.

La presente invención proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una lisina para uso en la descolonización de estreptococos en un mamífero que padece de o está en riesgo de contraer una enfermedad o afección causada por una infección de estreptococos donde la lisina es una lisina de fago específico de *Streptococcus* dimérica y aislada que comprende dos monómeros de lisina de fago específico de *Streptococcus* unidos covalentemente entre sí, donde dicho dímero posee actividad destructiva contra una o más bacterias de *Streptococcus* y donde cada monómero tiene un residuo de Cys que se encuentra entre 14 y 20 aminoácidos desde el extremo C-terminal, donde dichos monómeros de lisina están unidos covalentemente entre sí por un enlace disulfido y donde dichos monómeros de lisina no poseen un residuo Cys en los 45 primeros residuos. En ciertas realizaciones, la infección es causada por la *Streptococcus pneumoniae*. La enfermedad o afección causada por la infección de *Streptococcus pneumoniae* puede ser, al menos, una de bacteriemia, meningitis, neumonía, otitis media o sinusitis.

También se describe un procedimiento para destruir las bacterias gram positivas que comprende la etapa de contacto de la bacteria con una composición que comprende una cantidad de un polipéptido de lisina dimérico mutante y efectivo para destruir bacterias gram positivas, donde una lisina monomérica es modificada o alterada para ser un polipéptido de lisina dimérico que comprende dos monómeros de lisina de fago antibacterianos covalentemente unidos entre sí y efectivos para destruir bacterias gram positivas. En un aspecto particular, se proporciona un procedimiento para destruir bacterias de *Streptococcus* que comprende la etapa de contacto de la

bacteria con una composición que comprende una cantidad de un polipéptido de lisina dimérico mutante y efectivo para destruir bacterias de *Streptococcus*, donde una lisina de *Streptococcus* monomérica es modificada o alterada para ser un polipéptido de lisina dimérico que comprende dos monómeros de lisina de fago de *Streptococcus* covalentemente unidos entre sí y efectivo para destruir bacterias de *Streptococcus*.

5

Por lo tanto, también se describe un procedimiento para destruir bacterias de *Streptococcus* que comprende la etapa de poner en contacto las bacterias con una composición que comprende una cantidad de un polipéptido de lisina Cpl-1 de *Streptococcus* dimérico aislado y efectivo para destruir las bacterias de *Streptococcus*, el polipéptido de lisina aislado que comprende una lisina Cpl-1 mutante que comprende dos monómeros de lisina Cpl-1 unidos covalentemente entre sí. En un aspecto particular, se provee un procedimiento para destruir bacterias de *Streptococcus* que comprende la etapa de poner en contacto las bacterias con una composición que comprende una cantidad de un polipéptido de lisina aislado y efectivo para destruir las bacterias de *Streptococcus*, y el polipéptido de lisina aislado que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o variantes de los mismos que tienen por lo menos una homología del 80 %, una homología del 85 %, una homología del 90 % o una homología del 95 % con el polipéptido de la SEQ ID NO: 3, y efectivo para destruir las bacterias gram positivas.

También se describe un procedimiento para destruir bacterias de *Streptococcus* que comprende la etapa de poner en contacto las bacterias con una composición que comprende una cantidad de un polipéptido de lisina Pal de *Streptococcus* dimérico aislado y efectivo para destruir las bacterias de *Streptococcus*, el polipéptido de lisina aislado que comprende una lisina Pal mutante que comprende dos monómeros de lisina Pal unidos covalentemente entre sí. En un aspecto particular, se provee un procedimiento para destruir bacterias de *Streptococcus* que comprende la etapa de poner en contacto las bacterias con una composición que comprende una cantidad de un polipéptido de lisina aislado y efectivo para destruir las bacterias de *Streptococcus*, y el polipéptido de lisina aislado que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6 o variantes de los mismos que tienen por lo menos una homología del 80 %, una homología del 85 %, una homología del 90 % o una homología del 95 % con el polipéptido de la SEQ ID NO: 6, y es efectivo para destruir las bacterias gram positivas.

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de una lisina de fago específico de *Streptococcus* dimérica y aislada que comprende dos monómeros de lisina de fago específico de *Streptococcus* unidos covalentemente entre sí, donde dicho dímero posee actividad destructiva contra una o más bacterias de *Streptococcus* y donde cada monómero tiene un residuo Cys que se encuentra entre 14 y 20 aminoácidos desde el extremo C-terminal, donde dichos monómeros de lisina están unidos covalentemente entre sí por un enlace disulfido y donde dichos monómeros de lisina no poseen un residuo Cys en los 45 primeros residuos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35

La descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de una lisina dimérica que comprende dos monómeros de lisina de fago específico de *Streptococcus* unidos covalentemente entre sí, donde dicho dímero posee una actividad destructiva contra una o más bacterias de *Streptococcus* y donde dicha actividad destructiva es mayor que la actividad destructiva de uno cualquiera de los monómeros de lisina de fago específico de *Streptococcus*, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la presente invención se provee un uso de composiciones antimicrobianas con objeto de sanear o descontaminar superficies porosas o no porosas que comprenden una lisina de fago específico de *Streptococcus* dimérica y aislada que comprende dos monómeros de lisina de fago específicos de *Streptococcus* unidos covalentemente entre sí, donde dicho dímero posee actividad destructiva contra una o más bacterias de *Streptococcus* y donde cada monómero tiene un residuo Cys que se encuentra entre 14 y 20 aminoácidos desde el extremo C-terminal, donde dichos monómeros de lisina están unidos covalentemente entre sí por un enlace disulfido y donde dichos monómeros de lisina no poseen un residuo Cys en los 45 primeros residuos.

Las composiciones de la invención pueden particularmente mostrar o tener actividad destructiva contra una o más cepas de bacterias de *Streptococcus*, seleccionadas particularmente del grupo que consiste en *Streptococcus suis*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus agalactiae* (GBS), *Streptococcus pyogenes* (GAS), *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus* GES y *Streptococcus pneumoniae*.

La presente invención proporciona procedimientos para descontaminar superficies inanimadas sospechosas de contener bacterias infecciosas que comprenden el tratamiento de dichas superficies con una cantidad efectiva bacteriocidamente o bacteriostáticamente de una composición antimicrobiana que comprende una lisina de fago específico de *Streptococcus* dimérica y aislada que comprende dos monómeros de lisina de fago específico de *Streptococcus* unidos covalentemente entre sí, donde dicho dímero posee actividad destructiva contra una o más bacterias de *Streptococcus* y donde cada monómero tiene un residuo Cys que se encuentra entre 14 y 20

aminoácidos desde el extremo C-terminal, donde dichos monómeros de lisina están unidos covalentemente entre sí por un enlace disulfido y donde dichos monómeros de lisina no poseen un residuo Cys en los 45 primeros residuos.

La presente invención incluye una proteína dimérica que comprende dos dominios de unión a lisina de fago específico de *Streptococcus* y covalentemente unidos entre sí. También se describe una proteína dimérica que comprende dos dominios de unión a lisina de fago específico de *Streptococcus* covalentemente unidos entre sí, donde al menos uno de dichos dominios de unión a lisina de fago está además conjugado con una marca. Una marca puede ser cualquier molécula que produzca, o pueda ser inducida a producir, una señal detectable. Ejemplos no limitantes de marcas incluyen isótopos radioactivos, enzimas, fragmentos de enzimas, sustratos de enzimas, coenzimas, catalizadores, fluoróforos, colorantes, sustancias quimioluminiscentes, luminiscentes, o sensibilizadores; una partícula magnética o no magnética, un soporte sólido, un liposoma, un ligando, o un receptor.

La utilidad diagnóstica de la presente invención se extiende al uso de los presentes polipéptidos de lisina en ensayos para cribar la presencia de bacterias gram positivas, para cribar la presencia de bacterias gram positivas susceptibles, o para determinar la susceptibilidad de bacterias de destruirse o lisarse mediante uno o más polipéptido(s) de lisina de la invención.

Los polipéptidos de lisina que son modificados y son proteínas de fusión o quiméricas, o bien han sido marcados, se incluyen y describen en el presente documento. En una proteína de fusión o quimérica, los polipéptidos de lisina de la invención pueden unirse covalentemente a una entidad que puede proporcionar una función adicional o bien mejorar el uso o aplicación de los polipéptidos de lisina, incluyendo, por ejemplo, una etiqueta, marca, resto o ligando de diana, una célula que se una a o célula que reconozca un motivo o agente, un agente antibacteriano, un anticuerpo, un antibiótico. Las marcas ejemplares incluyen una marca radioactiva, tal como los isótopos ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , y ^{186}Re . La marca puede ser una enzima, y la detección de polipéptido de lisina marcado se puede efectuar mediante cualquiera de las técnicas conocidas, actualmente utilizadas y aceptadas de colorimetría, espectrofotometría, fluoroespectrofotometría, amperometría o gasometría.

Otros objetos y ventajas se harán evidentes para el experto en la materia a partir de una revisión de la siguiente descripción, que procede haciendo referencia a los siguientes dibujos ilustrativos.

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Alineación del programa Clustal W de la Cpl-1 (SEQ ID NO: 1) y las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de la LytA de *S. pneumoniae*. Los dos residuos catalíticos (D10 y E94) se encuentran en rojo. Los 13 aminoácidos implicados en la dimerización natural de la LytA y los aminoácidos correspondientes en la Cpl-1 se indican subrayados. El residuo D324 se indica en azul.

La Figura 2A-2C describe (A) Un gel de SDS-PAGE no reductor con tinción de Coomassie de la Cpl-1 purificada. Carril 1, marcador de peso molecular, y carril 2, Cpl-1 purificada obtenida mediante purificación de afinidad en DEAE-Sepharose. (B) Gel de SDS-PAGE no reductor con tinción de Coomassie de la mutante Cpl-1^{C45S,D324C} purificada. Carril 1, marcador de peso molecular. Carril 2, Cpl-1^{C45S,D324C} purificada obtenida mediante purificación de afinidad en DEAE-Sepharose, y carril 3, Cpl-1^{C45S,D324C} reducida con 10 mM de DTT. (C) Gel de SDS-PAGE no reductor con tinción de Coomassie de enriquecimiento de dímero mutante de Cpl-1^{C45S,D324C} purificada después de filtración de gel en Sephadex G100. Carril 1, marcador de peso molecular. Carril 2, dímero de Cpl-1^{C45S,D324C} purificada obtenido mediante filtración de gel en Sephadex G100 (primera purificación) y carril 3, dímero de Cpl-1^{C45S,D324C} purificada obtenido mediante filtración de gel en Sephadex G100 (segunda purificación).

La Figura 3 muestra actividad antibacteriana *in vitro* de Cpl-1 en una suspensión de $5 \cdot 10^8$ UFC/ml de la cepa DCC1490 de *S. pneumoniae* después de 15 minutos de incubación a 37 °C. Tipo silvestre de Cpl-1 (círculos rellenos), forma monomérica de Cpl-1^{C45S,D324C} en 1 mM de DTT (cuadrados abiertos), y dímero de Cpl-1^{C45S,D324C} (círculos abiertos). N=4 para cada enzima y condición.

Figura 4. Eliminación en plasma de enzibióticos en ratones. En ratones Balb C se inyectaron 12,16 nmoles en 100 µl PB 50 mM, pH de 7,4 de Cpl-1 (círculos rellenos) o dímero Cpl1^{C45S,D324C} (círculos abiertos), n=3 para cada punto temporal.

Figura 5. Actividad antimicrobiana *in vitro* de varios dímeros mutantes de Cpl-1 purificada en una suspensión de $5 \cdot 10^8$ UFC/ml de la cepa DCC1490 de *S. pneumoniae* a 37 °C. Tipo silvestre de Cpl-1 (círculos rellenos), dímero de Cpl-1^{C45S,Q85C} (rombos rellenos), dímero de Cpl-1^{C45S,D194C} (triángulos rellenos), dímero de Cpl-1^{C45S,N214C} (cuadrados rellenos), dímero de Cpl-1^{C45S,G216C} (triángulos abiertos), dímero de Cpl-1^{C45S,D256C} (rombos abiertos), dímero de Cpl-

¹C45S,S269C (círculos abiertos), dímero de Cpl-1^{C45S,D324C} (cuadrados abiertos). Todas las enzimas se analizaron a una concentración de 0,5 mg/ml. Cada punto representa el valor medio de 3 experimentos.

La **Figura 6** describe secuencias de aminoácidos alineadas de Cpl-1 (no mutada) (SEQ ID NO:1), y lisinas mutantes C45S (SEQ ID NO:4) y C45S, D324C (SEQ ID NO:3). Los cambios en aminoácidos de las mutantes están subrayados.

La **Figura 7** describe secuencias de aminoácidos alineadas de Cpl-1 (SEQ ID NO:1), Pal (SEQ ID NO: 5) y las secuencias de aminoácidos de LytA de *S. pneumoniae* (SEQ ID NO: 2). Los aminoácidos idénticos dentro de las tres secuencias se indican con un asterisco *. Los 13 aminoácidos implicados en la dimerización natural de la LytA y los aminoácidos análogos en la Cpl-1 y la Pal se indican subrayados y en negrita. Los correspondientes aminoácidos mutados en los mutantes de dímero ejemplares de Cpl-1 (residuo D324) y Pal (residuo D280) se indican en una caja.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En el presente documento se describen las lisinas diméricas de bacteriófago específico de *Streptococcus* con actividad destructiva contra la *S. pneumoniae*. Normalmente, las lisinas de fago diméricas contienen dos monómeros de lisina de fago específico de estreptococo unidos covalentemente entre sí, donde dicho dímero posee actividad destructiva contra una o más bacterias de estreptococo. Los monómeros de lisina del dímero de lisina pueden tener al menos una identidad de secuencia de aminoácidos del 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o de incluso al menos el 99,5 % con la Cpl-1 no mutada (Figura 1, SEQ ID NO: 1). Los monómeros de lisina del dímero de lisina pueden tener al menos una identidad de secuencia de aminoácidos del 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o de incluso al menos el 99,5 % con la Pal no mutada (Figura 7, SEQ ID NO: 5). Las lisinas diméricas estabilizadas que se proveen en el presente documento demuestran una actividad destructiva de bacterias creciente, aproximadamente el doble en la actividad antibacteriana *in vitro* en comparación a la molécula monomérica original. Las lisinas diméricas también muestran una eliminación en plasma disminuida con un factor cercano a 10 entre 5 minutos y 5 horas después de la infección, con una eliminación en plasma disminuida o bien una estabilidad aumentada en plasma o en un animal.

La Figura 1 demuestra que las secuencias de aminoácidos de las regiones de extremos C-terminal de LytA y la Cpl-1 de lisina del estreptococo son homólogas (73/142 de residuos idénticos, y con 55/69 de residuos siendo sustituciones conservativas). Los 13 aminoácidos del extremo C-terminal son responsables de la dimerización de la autolisina LytA de *Streptococcus pneumoniae*. De manera interesante, dentro de esta región, 10/13 aminoácidos son idénticos entre la Cpl-1 y la LytA. La LytA activa enteramente es un homodímero ligado a colina compuesto por la asociación de cola a cola de dos monómeros de LytA iniciados por la interacción de colina. La principal fuerza impulsora para la dimerización se proporciona mediante un núcleo hidrofóbico resultante de las interacciones hidrofóbicas e intermoleculares entre varios residuos en las regiones 6 y 7 de unión a colina del extremo C-terminal (8). Los 13 residuos de extremo C-terminal de la LytA son responsables de la formación del homodímero activo, cuya actividad es significativamente mayor que la del monómero nativo. De hecho, una forma monomérica recombinante de LytA que carece de este tramo de 13 aminoácidos (27) retiene menos del 10 % de la eficiencia catalítica de la enzima (24). La alineación de la secuencia de Cpl-1 y LytA reveló mayores similitudes, especialmente dentro de la cola del extremo C-terminal de la enzima implicada en la dimerización de LytA (Figura 1). La existencia de un umbral de filtración glomerular estimado en alcanzar aproximadamente los 60-65 kDa en humanos (17) sugiere que la forma dimérica de la Cpl-1 (PM de 74 kDa) podría mostrar una disminución significativa en la eliminación sistémica al compararla con el monómero. Un dímero de Cpl-1 compuesto por dos monómeros unidos covalentemente y estabilizados por un enlace disulfido ha sido diseñado, de este modo, en el presente documento, examinándose su actividad *in vitro*, así como su eliminación en plasma *in vivo* en comparación con la forma monomérica de Cpl-1. Además, y debido a que otras y diversas lisinas de fago han demostrado o han sido sospechosas de dimerización (25, 26), esto representa una forma general de aumento en la actividad y/o en la farmacocinética de ciertas lisinas de fago.

De acuerdo con la presente invención, pueden emplearse técnicas de biología molecular, microbiología y de ADN recombinante dentro del ámbito de la técnica. Tales técnicas se describen enteramente en la bibliografía. Véase, p. ej., Sambrook y col., *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).

60

En consecuencia, de aparecer en el presente documento, los términos siguientes tendrán las definiciones provistas y expuestas a continuación y en esta sección.

Los términos "lisina(s) de dímero/dimérica(s) de *Streptococcus*", "lisina(s) dimérica(s) de Cpl-1", "dímero(s) de Cpl-1", "Cpl-1 dimérica" y cualquier variante no mencionada específicamente, se pueden usar indistintamente en el presente documento, y tal como se usan en toda la presente solicitud y en las reivindicaciones se refiere a un material proteínico que incluye proteínas solas o múltiples, y particularmente proteínas de dímero, y que se extiende a las proteínas que tienen los datos de secuencia de aminoácidos descritos en el presente documento y presentados en la Figura 6 y en la Tabla 1 y en la SEQ ID NO: 3, y el perfil de actividades indicadas en el presente documento y en las reivindicaciones. Por consiguiente, se contemplan similarmente las proteínas que exhiben actividad sustancialmente equivalente o alterada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, modificaciones obtenidas por medio de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, como las obtenidas por medio de mutaciones en los huéspedes que son productores del complejo o sus subunidades mencionadas. También, los términos "lisina(s) de dímero/dimérica(s) de *Streptococcus*", "lisina(s) dimérica(s) de Cpl-1", "dímero(s) de Cpl-1", "Cpl-1 dimérica" incluyen dentro de su alcance las proteínas citadas específicamente en el presente documento, además de todos los análogos, fragmentos o formas truncadas sustancialmente homólogas, y las variaciones alélicas.

Los términos "lisina(s) de dímero/dimérica(s) de *Streptococcus*", "lisina(s) dimérica(s) de Pal", "dímero(s) de Pal", "Pal dimérica" y cualquier variante no mencionada específicamente, se pueden usar indistintamente en el presente documento, y tal como se usan en toda la presente solicitud y en las reivindicaciones se refiere a un material proteínico que incluye proteínas solas o múltiples, y particularmente proteínas de dímero, y que se extiende a las proteínas que tienen los datos de secuencia de aminoácidos descritos en el presente documento y presentados en la Figura 7 y en la SEQ ID NO: 5, y el perfil de actividades indicadas en el presente documento y en las reivindicaciones. Por consiguiente, se contemplan similarmente las proteínas que exhiben actividad sustancialmente equivalente o alterada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, modificaciones obtenidas por medio de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, como las obtenidas por medio de mutaciones en los huéspedes que son productores del complejo o sus subunidades mencionadas. También, los términos "lisina(s) de dímero/dimérica(s) de *Streptococcus*", "lisina(s) dimérica(s) de Pal", "dímero(s) de Pal", "Pal dimérica" incluyen dentro de su alcance las proteínas citadas específicamente en el presente documento, además de todos los análogos, fragmentos o formas truncadas sustancialmente homólogas, y las variaciones alélicas.

Polipéptidos y enzimas líticas

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

Una "enzima lítica de *Streptococcus*" incluye una enzima lítica que es capaz de destruir por lo menos una o más bacterias de *Streptococcus* bajo condiciones adecuadas y durante un período relevante.

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

Una enzima lítica es capaz de escindir específicamente los enlaces que están presentes en el peptidoglucano de las células bacterianas para desestabilizar la pared celular bacteriana. Actualmente también se postula que el peptidoglucano de la pared celular bacteriana está muy conservado entre la mayoría de las bacterias y la escisión de apenas unos pocos enlaces pueden desestabilizar 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 varias amidasas, tales como muramidásas, glucosaminidasas, endopeptidasas, o N-acetilmuramoi-L-alanina amidasas. Fischetti y col. (2008) informaron de que la enzima lisina del fago estreptocócico C1 era una amidasa. García y col. (1987, 1990) informaron de que la lisina Cpl de *S. pneumoniae* de un fago Cp-1 era una lisozima. Caldentey y Bamford (1992) informaron de que una enzima lítica del fago phi 6 de *Pseudomonas* era una endopeptidasa, partiendo el puente peptídico formado por el ácido melo-diaminopimílico y D-alanina. Las enzimas líticas de fago T1 y T6 de *E. coli* son amidasas igual que la forma 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 destruir una bacteria huésped, por ejemplo teniendo por lo 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 de una variedad de fuentes, tales como de un bacteriófago ("fago"), o se puede preparar mediante procedimientos sintéticos o recombinantes, tales como los descritos por García y col., y también los provistos en el presente documento. El polipéptido puede comprender una porción de unión de colina en el lado terminal carboxilo y puede ser caracterizado como una enzima con actividad capaz de escindir el peptidoglucano de la pared celular (como la actividad amidasa para actuar sobre enlaces de amida en el peptidoglucano) en el lado terminal amino. Se han descrito enzimas líticas que incluyen múltiples actividades enzimáticas, por ejemplo dos dominios enzimáticos, tales como la lisina PlyGBS. Hablando en términos generales, una enzima lítica puede tener un peso molecular de entre 25.000 y 35.000 Da y puede comprender una sola cadena de polipéptido; sin embargo, esto puede variar dependiendo de la cadena de la enzima. Más convenientemente, el peso molecular se puede determinar mediante un ensayo sobre electroforesis en gel desnaturizante con dodecilsulfato de sodio y en comparación con marcadores de peso molecular.

"Una enzima lítica asociada al fago con secuencia nativa" incluye un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que una enzima derivada de una bacteria. Tal enzima de secuencia nativa se puede aislar o se puede producir por medios recombinantes o sintéticos.

El término "enzima de secuencia natural" abarca formas que ocurren naturalmente (p. ej., formas con *splicing* alternativo o alteradas) y variantes que ocurren naturalmente de la enzima. En una realización de la invención, la enzima de secuencia nativa es un polipéptido maduro o de longitud completa que es codificado genéticamente por un gen de un bacteriófago específico para *Streptococcus* y en particular el de la lisina de Cpl-1 nativa o el de la lisina de Pal nativa. Desde luego, son posibles y conocidas algunas 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. USA* 85: 914-918 (1988); García y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 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)).

Una "enzima lítica de secuencia variante" incluye una enzima lítica caracterizada por una secuencia de polipéptido que es diferente de una enzima lítica, pero que retiene actividad funcional. En algunas realizaciones, la enzima lítica puede ser codificada genéticamente por un bacteriófago específico para estreptococo que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos particular con la(s) secuencia(s) de enzima lítica de este documento como se provee en la Figura 1, Figura 6 y Figura 7, incluyendo las enzimas líticas variantes de las SEQ ID NO: 3, 4, y 5. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una enzima lítica funcionalmente activa puede destruir bacterias de *Streptococcus* y otras bacterias susceptibles como se provee en este documento, o como se describe previamente y es conocido por el experto en la materia, mediante la alteración de 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 de este documento como se provee en la Figura 1, Figura 6 y Figura 7, incluyendo las enzimas líticas variantes de las SEQ ID NO: 3, 4, y 5. Tales variantes de enzima lítica asociadas a fago incluyen, por ejemplo, polipéptidos de enzimas líticas donde se añaden o suprimen uno o más residuos de aminoácido en los extremos N- o C-terminal de las secuencias de enzimas líticas de este documento. En un aspecto particular, una enzima lítica asociada a fago tendrá por lo menos aproximadamente un 80 % o un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias nativas de la enzima lítica asociada a fago, particularmente por lo menos aproximadamente el 90 % (p. ej., el 90%) de identidad de secuencia de aminoácidos. Más particularmente, una variante de enzima lítica dimérica asociada a fago tendrá por lo menos aproximadamente el 95 % (p. ej., el 95 %) de identidad de secuencia de aminoácidos con la(s) secuencia(s) nativas de la enzima lítica asociada a fago en este documento, como se indica en la Figura 1, Figura 6 y Figura 7 o en la Tabla 1 o bien en las secuencias de este documento incluidas en las SEQ ID NO: 1 o 5, o las secuencias mutantes de las SEQ ID NO: 3, 4, o 6.

El "porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos" con respecto a las secuencias de la enzima lítica asociada a fago identificada, 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 de la secuencia de enzima lítica asociada a fago, después de alinear las secuencias en el mismo marco de lectura e introduciendo espacios, si resulta necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencias, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencias.

El "porcentaje de identidad de secuencias de ácido nucleico" con respecto a las secuencias de la enzima lítica asociada a fago identificada en el presente documento se define aquí como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que es idéntico a los nucleótidos en la secuencia de enzima lítica asociada a fago, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si resulta necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de

secuencias.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (p. ej., se pueden introducir espacios en la secuencia de una primera secuencia de nucleótidos). Después 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 una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = n.º de posiciones idénticas / n.º total de posiciones x 100).

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido 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). Tal algoritmo 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 para 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. En una realización, los parámetros para comparación de secuencias se pueden poner en $W=12$. Los parámetros también se pueden variar (p. ej., $W=5$ o $W=20$). El valor "W" determina cuántos nucleótidos continuos deben ser idénticos para que el programa identifique que dos secuencias contienen regiones de identidad.

"Polipéptido" incluye una molécula de polímero comprendida de múltiples aminoácidos unidos de manera lineal. En algunas realizaciones, un polipéptido puede corresponder a moléculas codificadas por una secuencia de polinucleótido que ocurre naturalmente. El polipéptido puede incluir sustituciones conservativas en donde el aminoácido que ocurre naturalmente es reemplazado por uno que tiene propiedades similares, en donde tales sustituciones conservativas no alteran la función del polipéptido (véase, por ejemplo, Lewin "Genes V" Oxford University Press Chapter 1, pp. 9-13 1994).

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

Se ha hallado que las enzimas líticas de fago específicas para bacterias infectadas con un fago específico rompen eficaz y eficientemente la pared celular de la bacteria en cuestión. Se cree que la enzima lítica carece de actividad enzimática proteolítica y por lo tanto no es destructiva de las proteínas y tejidos de mamífero cuando está presente durante la digestión de la pared celular bacteriana. Como se muestra en Loeffler y col., "Rapid Killing of *Streptococcus pneumoniae* with a Bacteriophage Cell Wall Hydrolase," Science, 294: 2170-2172 (Dec. 7, 2001), y material complementario del mismo publicado en Internet por la revista Science, una enzima lítica de bacteriófago neumocócico purificada, tal como Pal, es capaz de destruir varios neumococos. Loeffler y col. han mostrado por medio de estos experimentos que en el transcurso de segundos después del contacto, la enzima lítica Pal es capaz de destruir cepas clínicas de *S. pneumoniae*, incluso los serogrupos aislados más frecuentemente y cepas resistentes a penicilina, *in vitro*. El tratamiento de ratones con Pal también pudo eliminar o reducir significativamente el transporte nasal del serotipo 14 de manera dependiente de la dosis. Además, como se encontró que la acción de Pal, como otras enzimas líticas de fago, pero a diferencia de los antibióticos, fue más bien específica para el patógeno diana, es probable que la flora normal permanezca esencialmente intacta. (M. J. Loessner, G. Wendlinger, S. Scherer, Mol Microbiol 16, 1231-41. (1995)). Como se demuestra en el presente documento, por ejemplo, la lisina Cpl-1 mutante, en particular la lisina dimérica, la lisina Cpl-1 dimérica, es efectiva para destruir cepas de *Streptococcus*, incluyendo *Streptococcus pneumoniae*.

Una enzima lítica o polipéptido de la invención puede ser producido por el organismo bacteriano después de ser infectado con un bacteriófago particular, ya sea como un tratamiento profiláctico para impedir que enfermen quienes han estado expuestos a otros que tengan síntomas de una infección, o como un tratamiento terapéutico para quienes ya estén enfermos por la infección. Puesto que las secuencias del polipéptido de lisina y ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de lisina se proveen en el presente documento, la(s) enzima(s)/polipéptido(s) lítico(s) se pueden producir preferiblemente mediante el gen aislado de la enzima lítica del genoma del fago, poniendo el gen en un vector de transferencia, y clonando dicho vector de transferencia en un sistema de expresión, usando los métodos estándares de la técnica que incluyen los ejemplificados en el presente documento. Las enzimas líticas o polipéptidos pueden ser truncados, quiméricos, barajados o "naturales" y pueden estar en combinación. La patente de EE. UU. con n.º 5.604.109 también es relevante. Una enzima lítica "alterada" se puede producir de varias

- maneras. En una realización preferida, un gen de una enzima lítica alterada del genoma del fago se pone en un vector de transferencia o movable, preferiblemente un plásmido, y el plásmido se clona en un vector de expresión o sistema de expresión. El vector de expresión para producir un polipéptido o enzima lisina de la invención puede ser adecuado para *E. coli*, *Bacillus*, u otras bacterias adecuadas. El sistema vector también puede ser un sistema de expresión libre de células. Todos estos procedimientos de expresión de un gen o grupo de genes son conocidos en la técnica. La enzima lítica también puede ser creada infectando *Streptococcus* con un bacteriófago específico para *Streptococcus*, donde dicha enzima lítica produce exclusivamente la lisis de la pared celular de dicha *Streptococcus*, teniendo a lo sumo mínimos efectos sobre otra flora bacteriana presente, por ejemplo bacterias naturales o comensales.
- 10 Una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" comprende todo o parte (preferentemente una parte biológicamente activa) de un polipéptido de 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 moléculas o sobre moléculas diferentes, y por lo tanto tienen el potencial de 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 un sitio, proporcionando así potencialmente una destrucción más rápida o eficaz (o sinérgica) partiendo de una sola molécula de lisina o péptido quimérico.
- 15 20 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 péptido dentro de una molécula de péptido más grande, que no se encuentran en la naturaleza en asociación con la molécula más grande. De esta manera, cuando la región heteróloga codifica un gen de mamífero, normalmente el gen estará flanqueado por ADN que no flanquea el ADN genómico de mamífero en el genoma del organismo fuente. Otro ejemplo de una secuencia heteróloga codificadora es un constructo en donde la secuencia codificadora misma no se encuentra en la naturaleza (p. ej., un ADNc en donde la secuencia codificadora genómica contiene intrones o secuencias sintéticas que tienen codones diferentes de gen nativo). Las variaciones alélicas o eventos mutacionales naturales no producen una región heteróloga del ADN o péptido como se define en este documento.
- 30 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 con el extremo N-terminal o el extremo C-terminal del polipéptido de la descripción. Las proteínas quiméricas se producen enzimáticamente o mediante síntesis química, o mediante tecnología de ADN recombinante. Se han producido y estudiado varias enzimas líticas quiméricas. El gen E-L, una lisis quimérica construida de las proteínas E y L de los bacteriófagos phi X174 y MS2, respectivamente, se sometió a supresiones internas para crear una serie de clones E-L nuevos con propiedades alteradas de lisis o destrucción. Las actividades líticas de los genes parentales E, L, E-L y las formas truncadas internas de E-L se investigaron en este estudio para caracterizar el mecanismo de lisis diferente, basándose en las diferencias de arquitectura de las diferentes membranas que abarcan los dominios. La microscopía electrónica y la liberación de enzimas marcadoras para los espacios citoplásmico y periplásmico revelaron que se pueden distinguir dos mecanismos de lisis diferentes dependiendo de la penetración de las proteínas de la membrana interna o la membrana interna y externa de *E. coli* (FEMS Microbiol. Lett. (1998) 164(1):159-67. Un ejemplo de una proteína de fusión útil es una proteína de fusión GST, en donde el polipéptido se fusiona con el extremo C-terminal de una secuencia GST. Tal proteína quimérica puede facilitar la purificación de un polipéptido recombinante de la descripción.
- 45 En otra realización, la proteína o péptido quimérico contiene una secuencia de señal heteróloga en su extremo N-terminal. Por ejemplo, la secuencia de señal nativa de un polipéptido de la descripción se puede quitar y reemplazar con una secuencia de señal de otra proteína. Por ejemplo, la secuencia secretoria gp67 de la proteína de envoltura de baculovirus se puede usar como una secuencia de señal heteróloga (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel y col., eds., John Wiley & Sons, 1992.). Otros ejemplos de secuencias de señal heterólogas eucarióticas incluyen las secuencias secretorias de melitina y fosfatasa alcalina placentaria humana (Stratagene; La Jolla, Calif.). En otro todavía ejemplo, las secuencias de señal heterólogas procarióticas útiles incluyen la señal secretoria phoA (Sambrook y col., *supra*) y la señal secretoria de la proteína A (Pharmacia Biotech; Piscataway, N.J.).
- 50 55 La proteína de fusión puede combinar un polipéptido de lisina con una proteína o polipéptido que tiene una capacidad diferente o que provee una capacidad adicional, o que añade una característica al polipéptido de lisina. La proteína de fusión puede ser una proteína de fusión de inmunoglobulina en la que una parte o todo el polipéptido de la descripción se fusiona con secuencias derivadas de un miembro de la familia de las proteínas de inmunoglobulinas. La inmunoglobulina puede ser un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo dirigido a una proteína de superficie o epítipo de una bacteria susceptible o diana. Una proteína de fusión inmunoglobulina se puede
- 60

incorporar en una composición farmacéutica y administrarse a un sujeto para inhibir una interacción entre un ligando (soluble o unido a membrana) y una proteína sobre la superficie de una célula (receptor), para suprimir, con ello, la transducción de señal *in vivo*. La proteína de fusión inmunoglobulina puede alterar la biodisponibilidad de un ligando cognado de un polipéptido de la descripción. La inhibición de la interacción ligando/receptor puede ser terapéuticamente útil tanto para tratar enfermedades y trastornos asociados con bacterias como para modular (es decir, promover o inhibir) la supervivencia celular. Además, una proteína de fusión inmunoglobulina de la descripción se puede usar como un inmunógeno para producir anticuerpos dirigidos contra un polipéptido de la descripción en un sujeto, para purificar ligandos, y en ensayos de cribado para identificar moléculas que inhiben la interacción de receptores con ligandos. Las proteínas y péptidos quiméricos y de fusión de la descripción se pueden producir por medio de técnicas estándares de ADN recombinante.

El gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales, incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Como alternativa, puede llevarse a cabo la amplificación por PCR de fragmentos génicos usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden reasociarse y reamplificarse posteriormente, generando una secuencia génica quimérica (véase, p. ej., Ausubel y col., *supra*). Además, están comercialmente disponibles muchos vectores de expresión que ya codifican un resto de fusión (p. ej., un polipéptido de GST). Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención puede clonarse en dicho vector de expresión tal que el resto de fusión esté conectado en marco con el polipéptido de la invención.

Como se usa en este documento, las proteínas o péptidos, productos de gen o péptidos barajados para más de una proteína o fragmento de proteína o péptido de fago relacionado se han escindido aleatoriamente y reensamblado en una proteína más activa o específica. Oligonucleótidos, péptidos o moléculas de fragmento de péptido barajados se criban o exploran para identificar una molécula que tiene una propiedad funcional deseada. Este procedimiento se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. de Stemmer, con n.º 6.132.970. (Method of shuffling polynucleotides); Kauffman, patente de EE. UU. n.º 5.976.862 (Evolution via Condon-based Synthesis) y Huse, patente de EE. UU. con n.º 5.808.022 (Direct Codon Synthesis). Se puede usar barajado para crear una proteína que es más activa, por ejemplo hasta 10 a 100 veces más activa que la proteína molde. La proteína molde se selecciona de entre diferentes variedades de proteínas lisinas. La proteína o péptido barajado constituye, por ejemplo, uno o más dominios de unión y uno o más dominios catalíticos. Cada dominio de unión o catalítico se deriva de un fago o proteína de fago igual o diferente. Los dominios barajados son moléculas basadas en oligonucleótido, como gen o producto de gen, que solos o en combinación con otros genes o productos de gen son traducibles en un fragmento de péptido, o son moléculas basadas en péptido. Los fragmentos de gen incluyen cualquier molécula de ADN, ARN, híbrido ADN-ARN, ARN de antisentido, ribozimas, EST, SNIP, y otras moléculas basadas en oligonucleótido que, solas o en combinación con otras moléculas, producen una molécula de oligonucleótido capaz o incapaz de traducirse en un péptido.

La(s) forma(s) modificada(s) o alterada(s) de la proteína o péptido y fragmento de péptido, como se describe en el presente documento, incluye(n) proteínas o péptidos y fragmentos de péptido que son sintetizados químicamente o preparados mediante técnicas de ADN recombinante, o ambas. Estas técnicas incluyen, por ejemplo, quimerización y barajado. Cuando la proteína o péptido se produce mediante síntesis química, preferentemente está sustancialmente libre de precursores químicos u otros compuestos químicos, es decir, está separado de los precursores químicos u otros compuestos químicos implicados en la síntesis de la proteína. Por consiguiente, tales preparaciones de la proteína tienen menos de aproximadamente el 30 %, 20 %, 10 % o 5 % (en peso seco) de precursores o compuestos químicos diferentes del polipéptido de interés.

Una secuencia señal de un polipéptido puede facilitar el movimiento transmembrana de la proteína y péptido y los fragmentos de péptido de la descripción hacia y desde las membranas mucosas, y también facilitar la secreción y aislamiento de la proteína secretada u otras proteínas de interés. Normalmente las secuencias señal se caracterizan por un núcleo de aminoácidos hidrófobos que generalmente son escindidos de la proteína madura durante la secreción, en uno o más eventos de escisión. Tales péptidos de señal contienen sitios de procesamiento que permiten la escisión de la secuencia señal de las proteínas maduras a medida que éstas pasan por la ruta secretoria. De esta manera, la descripción puede referirse a los polipéptidos descritos que tienen una secuencia señal, y también a la secuencia señal misma, y al polipéptido en ausencia de la secuencia señal (es decir, los productos de escisión). Una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia señal de la descripción se puede enlazar operativamente en un vector de expresión a una proteína de interés, tal como una proteína que normalmente no es secretada o siendo, en caso contrario, difícil de aislar. La secuencia señal dirige la secreción de la proteína, tal como de un huésped eucariota en el que se transforma el vector de expresión, y subsiguientemente o concurrentemente la secuencia señal es escindida. Después, la proteína se puede purificar fácilmente del medio extracelular mediante los procedimientos reconocidos en la técnica. Alternativamente, la secuencia señal se puede

enlazar con una proteína de interés usando una secuencia que facilita la purificación, tal como con un dominio GST.

La presente descripción también se refiere a otras variantes de los polipéptidos de la invención.

5 Tales variantes pueden tener una secuencia de aminoácidos alterada que pueden funcionar como agonistas (miméticos) o como antagonistas. Las variantes pueden ser generadas por mutagénesis, es decir, mutación puntual discreta o truncamiento. Un agonista puede retener sustancialmente las mismas actividades biológicas, o subgrupo de las mismas, de la forma natural de la proteína. Un antagonista de una proteína puede inhibir una o más actividades de la forma natural de la proteína, por ejemplo, uniéndose competitivamente a un miembro del inicio o
10 final de una cascada de señalización celular que incluye la proteína de interés. De esta manera, se pueden provocar efectos biológicos específicos por 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 natural de la proteína puede tener menos efectos secundarios en un sujeto con respecto al tratamiento con la forma natural de la proteína. Las variantes de una proteína de la descripción que funcionan como agonistas (miméticos) o como antagonistas se
15 pueden identificar cribando bibliotecas combinatoriales de mutantes, es decir, mutantes de truncamiento, de la proteína de la descripción, para determinar su actividad agonista o antagonista. En un aspecto, se genera una biblioteca abigarrada de variantes por medio de mutagénesis combinatoria en los ácidos nucleicos que es codificada por una biblioteca génica abigarrada. Una biblioteca abigarrada de variantes se puede producir, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias de gen, de tal manera que un conjunto
20 degenerado de posibles secuencias de proteína es expresable como polipéptidos individuales, o alternativamente como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (es decir, para expresión en fago). Existe una variedad de procedimientos que se pueden utilizar para producir bibliotecas de posibles variantes de los polipéptidos de la descripción a partir de una secuencia de oligonucleótido degenerada. Los procedimientos para sintetizar oligonucleótidos degenerados son conocidos en la técnica (véase, p. ej., Narang (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura y
25 col. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura y col. (1984) *Science* 198:1056; Ike y col. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477).

Además, se pueden usar bibliotecas de fragmentos de la secuencia codificadora de un polipéptido de la descripción para generar una población abigarrada de polipéptidos para cribado y subsiguiente selección de variantes,
30 fragmentos activos o truncamientos. Por ejemplo, se puede generar una biblioteca de fragmentos de secuencia codificadora tratando un fragmento de PCR de doble cadena de la secuencia codificadora de interés con una nucleasa, bajo condiciones donde ocurre corte solo aproximadamente una vez por molécula, desnaturalizando el ADN de doble cadena, renaturalizando el ADN para formar ADN de doble cadena que puede incluir pares de sentido/antisentido de diferentes productos cortados, quitando porciones de una sola cadena de los dúplex
35 reformados por tratamiento con nucleasa S1, y ligando la colección de los fragmentos resultantes en un vector de expresión. Mediante este procedimiento se puede derivar una biblioteca de expresión que codifica fragmentos de extremos N-terminal e internos de varios tamaños de la proteína de interés. Se conocen varios métodos en la técnica para el cribado de productos génicos de bibliotecas combinatoriales fabricadas mediante mutaciones o truncamientos puntuales y para el cribado de genotecas de ADNc para productos génicos que tienen una propiedad
40 seleccionada. Habitualmente, las técnicas usadas más ampliamente, que son susceptibles de análisis de alto rendimiento, para el cribado de genotecas grandes, incluyen la clonación de la genoteca en vectores de expresión replicables, la transformación de las células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante y la expresión de los genes combinatoriales en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. La mutagénesis de ensamblado recursivo (REM), una técnica
45 que incrementa la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, se puede usar en combinación con los ensayos de cribado para identificar variantes de una proteína de la descripción (Arkin y Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delgrave y col. (1993) *Protein Engineering* 6(3):327-331) las porciones inmunológicamente activas de un fragmento de proteína o péptido incluyen regiones que se unen a anticuerpos que reconocen la enzima del fago. En este contexto, la porción más pequeña de una proteína (o ácido nucleico que
50 codifica la proteína) -de acuerdo con las realizaciones- es un epítipo que es reconocible como específico para el fago que hace la proteína lisina. Por consiguiente, el polipéptido más pequeño (y ácido nucleico asociado que codifica el polipéptido) que se puede esperar que se una a un anticuerpo, y es útil en 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 aminoácidos de longitud. Aunque las secuencias pequeñas tan cortas como 8, 9, 10, 11, 12 o 15 aminoácidos de largo comprenden confiablemente
55 estructura suficiente para actuar como objetivos o epítipos, secuencias más cortas de 5, 6, o 7 aminoácidos de largo pueden exhibir estructura epitópica en algunas condiciones y son de valor en un aspecto.

Las porciones biológicamente activas de una proteína o fragmento de péptido de las realizaciones que se describen en el presente documento incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente
60 idénticas a, o derivadas de, la secuencia de aminoácidos de la proteína de fago de la descripción, que incluyen

- menos aminoácidos que la proteína de longitud completa de la proteína de fago y exhiben por lo menos una actividad de la proteína de longitud completa correspondiente. Normalmente, 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 fragmento de proteína de la descripción puede ser un polipéptido que tiene una longitud, por ejemplo, de 10, 25, 50, 100 más o menos aminoácidos. Además, se pueden preparar otras porciones biológicamente activas en las que son suprimidas o añadidas otras regiones de la proteína mediante técnicas recombinantes, y se evalúan para determinar una o más de las actividades funcionales de la forma nativa de un polipéptido de las realizaciones.
- 10 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 será apreciado por el experto en la materia. Tales moléculas pequeñas y regiones cortas de moléculas más grandes que pueden ser homólogas se consideran específicamente como realizaciones. Preferentemente la homología de tales regiones valiosas es de por lo menos el 50 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, y preferentemente al menos 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, o por lo menos el 99 % con respecto a los polipéptidos de lisina proporcionados en el presente documento, incluyendo lo señalado en las Figuras 1 y 6. Estos valores de porcentaje de homología no incluyen alteraciones debido a las sustituciones conservativas de aminoácidos.

- Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" cuando al menos aproximadamente el 70 % de los residuos de aminoácidos (preferentemente, al menos aproximadamente el 80 %, por lo menos aproximadamente el 85 %, y preferentemente al menos aproximadamente el 90 o 95 %) son idénticos, o representan sustituciones conservativas. Las secuencias de lisinas comparables, como las lisinas Cpl-1 comparables, o las lisinas de *Streptococcus* comparables, son sustancialmente homólogas cuando uno o más, o varios, o hasta el 10 %, o hasta el 15 %, o hasta el 20 % de los aminoácidos del polipéptido de lisina están sustituidos con una sustitución de aminoácidos similar o conservativa, y donde las lisinas comparables tienen el perfil de actividades, efectos antibacterianos y/o especificidades bacterianas de una lisina, como las lisinas Cpl-1, descritas en este documento.

- Los residuos de aminoácido que se describen en este documento se prefieren en la forma isomérica "L". Sin embargo, los residuos en la forma isomérica "D" pueden sustituir a cualquier residuo de L-aminoácido, siempre que la propiedad funcional deseada de unión de inmunoglobulina sea retenida por el polipéptido. NH₂ se refiere al grupo amino libre presente en el extremo terminal amino de un polipéptido COOH se refiere al grupo carboxilo libre presente en el extremo terminal carboxilo de un polipéptido. De acuerdo con la nomenclatura estándar de polipéptido, J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969), las abreviaturas de residuos de aminoácidos se muestran en la siguiente Tabla de Correspondencia:

35

TABLA DE CORRESPONDENCIA

SÍMBOLO		AMINOÁCIDO
Una letra	Tres letras	
Y	Tyr	tirosina
G	Gly	glicina
F	Phe	fenilalanina
M	Met	metionina
A	Ala	alanina
S	Ser	serina
I	Ile	isoleucina
L	Leu	leucina
T	Thr	treonina
V	Val	valina
P	Pro	prolina
K	Lys	lisina
H	His	histidina
Q	Gln	glutamina
E	Glu	ácido glutámico
W	Trp	triptófano
R	Arg	arginina
D	Asp	ácido aspártico
N	Asn	asparagina
C	Cys	cisteína

Cabe señalar que todas las secuencias de residuos de aminoácido están representadas aquí por fórmulas cuya orientación izquierda y derecha están en la dirección convencional de extremo terminal amino a extremo terminal carboxilo. Además, cabe señalar que un guion al principio o al final de una secuencia de residuos de aminoácido indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácido. La Tabla anterior se presenta para correlacionar las notaciones de tres letras y una letra que pueden aparecer alternativamente en este documento.

Se pueden hacer mutaciones en las secuencias de aminoácidos o en las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos y lisinas del presente documento, incluso en las secuencias de lisina indicadas en la Figura 1, Figura 6 o en la Figura 7, en la SEQ ID NO: 1 o 5, o en fragmentos activos o productos truncados de los mismos, de tal manera que un codón particular se cambia a un codón que codifica un aminoácido diferente, un aminoácido se sustituye por otro aminoácido, o uno o más aminoácidos se 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 manera no conservativa (por ejemplo, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a un grupo de aminoácidos que tienen un tamaño o característica particular a un aminoácido que pertenece a otro grupo), o de manera conservativa (por ejemplo, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a un grupo de aminoácidos que tienen un tamaño o característica particular a un aminoácido que pertenece al mismo grupo). Este cambio conservativo generalmente produce un cambio menor en la estructura y función de la proteína resultante. Es más probable que un cambio no conservativo altere la estructura, actividad o función de la proteína resultante. Se debe considerar que la presente invención incluye secuencias que contienen cambios conservativos que no alteran significativamente la actividad o características de unión de la proteína resultante.

El siguiente es un ejemplo de diversos agrupamientos de aminoácidos:

- 25 Aminoácidos con grupos R no polares
Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina, Prolina, Fenilalanina, Triptófano, Metionina
Aminoácidos con grupos R polares no cargados
Glicina, Serina, Treonina, Cisteína, Tirosina, Asparagina, Glutamina
30 Aminoácidos con grupos R polares cargados (cargados negativamente con pH 6,0)
Ácido aspártico, Ácido glutámico
Aminoácidos básicos (cargados positivamente con pH 6,0)
Lisina, Arginina, Histidina (con pH 6,0)
- 35 Otra agrupación puede ser aquellos aminoácidos con grupos fenilo:
Fenilalanina, Triptófano, Tirosina

Otra agrupación puede ser según su peso molecular (*es decir*, el 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 (con pH de 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

- 45 una carga positiva;
- Glu por Asp y viceversa, de tal manera que se pueda mantener

una carga negativa;
- 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 conservativas de aminoácidos ejemplares y preferidas incluyen cualquiera de:

5 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. Se puede introducir una His como un sitio particularmente "catalítico" (es decir, His puede actuar como un ácido o base y es el aminoácido más común en la catálisis bioquímica). Se puede introducir una Pro debido a su estructura particularmente plana, que induce vueltas β en la estructura de la proteína.

15

El polipéptido o epítipo que se describe en el presente documento se puede usar para generar un anticuerpo, y también se puede usar para detectar la unión a la lisina o a moléculas que reconocen la proteína lisina. Otro aspecto es una molécula tal como un anticuerpo u otro agente de unión específico, que se puede crear usando un epítipo tal como por inmunización regular o mediante un enfoque de presentación de fase en donde un epítipo se puede usar para cribar una biblioteca de agentes de unión potenciales. Tales moléculas reconocen uno o más epítopos de la proteína lisina o un ácido nucleico que codifica la proteína lisina. Un anticuerpo que reconoce un epítipo puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, o una porción de una proteína de anticuerpo. Deseablemente, la molécula que reconoce un epítipo tiene una unión específica para ese epítipo que es al menos 10 veces más fuerte que la unión de la molécula a la albúmina de suero. La unión específica puede medirse como afinidad (Km). Más deseablemente, la unión específica es por lo menos 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, más alta, o incluso más, que la unión a albúmina de suero bajo las mismas condiciones.

20

25

En un aspecto deseable, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está en una forma útil para detectar la presencia de la proteína lisina, o alternativamente para detectar la presencia de una bacteria susceptible a la proteína lisina. En un aspecto adicional, el anticuerpo se puede unir o asociar de otra manera con el polipéptido de lisina de la invención, por ejemplo en una proteína quimérica o de fusión, y puede servir para dirigir la lisina a una célula o cepa bacteriana de interés u objetivo. Alternativamente, el polipéptido de lisina puede servir para dirigir el anticuerpo o actuar en conjunto con el anticuerpo, por ejemplo para lisar parcial o totalmente la pared celular bacteriana, de tal manera que el anticuerpo se puede unir específicamente a su epítipo en la superficie o debajo de la superficie de la bacteria. Por ejemplo, una lisina de la invención puede unirse a un anticuerpo anti-estreptocócico y dirigir el anticuerpo a su epítipo.

30

35

Como apreciará el experto en la materia, se conoce una variedad de formas y procedimientos de síntesis de anticuerpo. El anticuerpo se puede conjugar (en complejo covalente) con una molécula o átomo reportero, tal como flúor, una enzima que crea una señal óptica, un quimioluminóforo, una micropartícula, o un átomo radioactivo. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede sintetizar *in vivo* después de la inmunización de un animal, por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede sintetizar mediante cultivo celular después de recombinación genética. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede preparar mediante una combinación de síntesis celular y modificación química.

40

45

Un "anticuerpo" es cualquier inmunoglobulina, que incluye anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se une a un epítipo específico. El término abarca anticuerpos policlonales, monoclonales y quiméricos, estos últimos descritos en mayor detalle en las patentes de EE. UU. con n.ºs 4.816.397y 4.816.567. El término "anticuerpo" describe una inmunoglobulina, ya sea natural o producida parcial o totalmente por síntesis. El término también abarca cualquier polipéptido o proteína que tiene un dominio de unión que es un dominio de unión de anticuerpo, o es homólogo al mismo. Este término también contempla anticuerpos injertados con CDR. Un "anticuerpo" es cualquier inmunoglobulina, que incluye anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se une a un epítipo específico. El término abarca anticuerpos policlonales, monoclonales y quiméricos, estos últimos descritos en mayor detalle en las patentes de EE. UU. con n.ºs 4.816.397y 4.816.567. El término "anticuerpo(s)" incluye una molécula de inmunoglobulina (Ig) de tipo silvestre, que comprende generalmente cuatro cadenas de polipéptido de longitud completa, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o un homólogo de Ig equivalente de la misma (p. ej., un nanoanticuerpo de camélido, que comprende solo una cadena pesada); incluso mutantes, variantes o derivados funcionales de longitud completa de los mismos, que retienen las características esenciales de unión de epítipo de una molécula de Ig, e incluyen anticuerpos doblemente específicos, biespecíficos, multiespecíficos y de doble

50

55

60

dominio variable; las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier clase (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), o subclase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2). El significado del término "anticuerpo" también incluye cualquier "fragmento de anticuerpo".

- 5 Un "fragmento de anticuerpo" significa una molécula que comprende por lo menos una cadena de polipéptido que no es de longitud completa, que incluye (i) un fragmento Fab, que es un fragmento monovalente que consiste en los dominios ligero variable (VL), pesado variable (VH), ligero constante (CL) y pesado constante 1 (CH 1); (ii) un fragmento F(ab')₂ que es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) una porción de cadena pesada de un fragmento Fab (Fd), que consiste en los dominios VH y CH 1; (iv) un fragmento variable (Fv), que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento de anticuerpo de dominio (dAb) que comprende un solo dominio variable (Ward, E.S. y col., Nature 341, 544-546 (1989)); (vi) un anticuerpo camérido; (vii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada; (viii) un fragmento Fv de una sola cadena en donde un dominio VH y un dominio VL están enlazados por un conector peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión de antígeno (Bird y col., Science, 242, 423-426, 1988; Huston y col., PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988); (ix) un dianticuerpo, que es un anticuerpo bivalente biespecífico en el cual los dominios VH y VL son expresados en una sola cadena de polipéptido, pero usando un conector que es demasiado corto para permitir el apareamiento de los dos dominios en la misma cadena, forzando así a los dominios a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión de antígeno (WO94/13804; P. Holliger y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, (1993)); y (x) un anticuerpo lineal, que comprende un par de segmentos Fv en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión de antígeno; (xi) fragmentos de anticuerpo multivalentes [dímeros, trímeros y/o tetrámeros de scFv (Power and Hudson, J Immunol. Methods 242: 193-204 9 (2000)); y (xii) otras porciones de longitud incompleta de cadenas pesadas y/o ligeras, o mutantes, variantes, o derivados de los mismos, solos o en cualquier combinación.

25 Como los anticuerpos se pueden modificar de varias maneras, se debe considerar que el término "anticuerpo" cubre cualquier miembro de unión específico o sustancia que tiene un dominio de unión con la especificidad requerida. De esta manera, este término abarca fragmentos de anticuerpo, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, que incluyen cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión de inmunoglobulina, ya sea natural o parcial o totalmente sintético. Por lo tanto, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión de inmunoglobulina, o equivalente, fusionado con otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describe en EP-A-0120694 y EP-A-0125023 y en las patentes de EE. UU. con n.^{os} 4.816.397 y 4.816.567.

- 35 Un "sitio de combinación de anticuerpo" es aquella porción estructural de una molécula de anticuerpo comprendida de regiones variables e hipervariables de cadena ligera o cadena pesada y ligera que se unen específicamente al antígeno.

40 La expresión "molécula de anticuerpo" en sus diversas formas gramaticales, como se usa en el presente documento, contempla una molécula de inmunoglobulina intacta y una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina. Las moléculas de anticuerpo ejemplares son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulinas sustancialmente intactas, y las porciones de una molécula de inmunoglobulina que contienen el paratopo, que incluye las porciones conocidas en la técnica como Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v); dichas porciones son preferidas para usarse en los métodos terapéuticos descritos en el presente documento.

45 La expresión "anticuerpo monoclonal" en sus diversas formas gramaticales se refiere a un anticuerpo que tiene solo un sitio de combinación de una especie de anticuerpo capaz de reaccionar inmunológicamente con un antígeno particular. De esta manera, un anticuerpo monoclonal normalmente presenta una sola afinidad de unión por cualquier antígeno con el cual reacciona inmunológicamente. Por lo tanto, un anticuerpo monoclonal 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).

50 El término "específico" se puede usar para hacer referencia a la situación en la que un miembro de un par de unión específico no mostrará unión significativa a moléculas diferentes de su(s) socio(s) de unión específicos. El término también es aplicable en donde, p. ej., un dominio de unión de antígeno es específico para un epítipo particular que es llevado por varios antígenos, en cuyo caso el miembro de unión específico que lleva el dominio de unión de antígeno será capaz de unirse a los diversos antígenos que llevan el epítipo.

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

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 unidos covalentemente a un producto más grande. En el caso del péptido de la invención, los expertos en la técnica apreciarán que se pueden contemplar modificaciones menores al extremo N- o C-terminal del péptido, tal como la modificación química del extremo terminal para añadir un grupo protector o similar, p. ej., la amidación del extremo C-terminal.

El término "aislado" se refiere al estado en el cual los polipéptidos de lisina de la invención, o el ácido nucleico que codifica este/os polipéptido(s), estará de acuerdo con la presente invención. Los polipéptidos y ácidos nucleicos estarán libres o sustancialmente libres del material con el cual están asociados naturalmente, tales como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los cuales se encuentran en su medio natural, o el medio en el que se preparan (p. ej., un cultivo celular) cuando esta preparación es mediante tecnología de ADN recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*. Los polipéptidos y ácidos nucleicos se pueden formular con diluentes o adyuvantes, y todavía para efectos prácticos, están aislados -por ejemplo, los péptidos normalmente se mezclarán con polímeros o mucoadhesivos u otros vehículos, o se mezclarán con vehículos o diluentes farmacéuticamente aceptables cuando se usan en diagnóstico o terapia.

Los monómeros de lisina diméricos de la invención pueden estar químicamente reticulados entre sí por un enlace covalente, incluyendo en particular un enlace covalente u otra asociación tal como entre los aminoácidos ubicados entre aproximadamente 14 y 20 aminoácidos desde el extremo C-terminal del polipéptido de lisina Cpl-1 (Figura 1 y SEQ ID NO:1) o de lisina Pal (Figura 7 y SEQ ID NO:5). Los monómeros pueden ser reticulados usando agentes químicos reticulantes. Por ejemplo, un primer monómero puede estar reticulado con un segundo monómero entre dos residuos de cisteína. Ejemplos de reactivos reticulantes reactivos a la cisteína incluyen 1,6-bismaleimidohexano (BMH), 1,3-dibromo-2-propanol (DBP), y gas mostaza (bis(2-cloroetil)sulfido; mostaza). Se conocen otros y alternativos reactivos reticulantes y pueden incluir N-hidroxisuccinimida (NHS) que unen amina a amina, maleimidas y piridilditioles que unen sulfhidrilos con sulfhidrilos. Cada uno podría incorporar espaciadores para aumentar el espacio y la flexibilidad. Los monómeros de lisina pueden asociarse o reticularse covalentemente a través de un conector peptídico fusionado con sus regiones o extremos C-terminales. Puede utilizarse cualquier medio de la técnica para dimerizar, siempre que se mantenga tanto la función de unión de colina del extremo C-terminal como la función enzimática del extremo N-terminal.

Los monómeros de lisina pueden unirse juntos mediante enlaces disulfido entre dos residuos de cisteína. En algunos aspectos los monómeros se reticulan entre sí mediante un enlace disulfido entre dos residuos Cys localizados entre 14 y 20 aminoácidos desde el extremo C-terminal de la Cpl-1 o la Pal. Los residuos de cisteína reticulada pueden estar en la misma posición sobre las cadenas de polipéptido del monómero de lisina. En algunos casos, los residuos de cisteína en los primeros 45 residuos de una lisina pueden no estar presentes. Un ejemplo de un monómero de lisina que está reticulado por residuos Cys en la posición 324 es Cpl-1^{C45S,D324C} (SEQ ID NO: 3). Un ejemplo de un monómero de lisina que está reticulado por residuos Cys en la posición 280 es Pal^{D280C} (SEQ ID NO: 6).

Normalmente, las lisinas poseen dos dominios funcionalmente distintos que consisten en un dominio catalítico para hidrólisis de peptidoglucano y un dominio de unión para el reconocimiento de restos de superficie sobre las paredes celulares de las bacterias. Los dominios catalíticos son conservados relativamente entre las lisinas. De este modo, una lisina dimérica puede ser quimérica por naturaleza y comprender un dímero de monómeros de lisina que comprenda un dominio catalítico de una primera lisina de fago específico de estreptococo y un dominio de unión de una segunda lisina de fago específico de estreptococo. En ciertas realizaciones, el dominio catalítico de una primera lisina de fago específico de estreptococo parte de la Cpl-1 o de otros dominios catalíticos de lisina de fago de *Streptococcus pneumoniae*. En otras realizaciones, el dominio de unión de una segunda lisina de fago específico de *Streptococcus pneumoniae* parte de la Cpl-1 o de otros dominios de unión de lisina de fago de *Streptococcus pneumoniae*. Ejemplos de un dominio catalítico incluyen los aminoácidos 1-190 de la Cpl-1. En ciertas realizaciones diferentes, el dominio catalítico de una primera lisina de fago específico de estreptococo parte de la Pal o de otros dominios catalíticos de lisina de fago de *Streptococcus pneumoniae*. En otras realizaciones, el dominio de unión de una segunda lisina de fago específico de *Streptococcus pneumoniae* parte de la Pal o de otros dominios de unión de lisina de fago de *Streptococcus pneumoniae*. Algunos ejemplos de dominios catalíticos son la mitad del extremo N-terminal de la lisina ClyS y la lisina PlyG, entre otras. Ejemplos de dominios de unión incluyen los aminoácidos 191-326 de la Cpl-1. Ejemplos de dominios de unión incluyen los aminoácidos 155-296 de la Pal. Algunos ejemplos de dominios de unión son la mitad del extremo C-terminal de las lisinas ClyS y PlyG, entre otras. Aquellos expertos en la técnica podrán determinar fácilmente los aminoácidos exactos que abarcan estos dominios a partir del análisis de la secuencia, así como las alineaciones de la secuencia.

Las lisinas diméricas exhiben actividad destructiva contra una o más bacterias estreptocócicas como son las

Streptococcus pneumoniae. La actividad destructiva puede determinarse mediante el uso de un ensayo de destrucción tal como el descrito en la sección de ejemplo a continuación.

Ácidos nucleicos

5 Se proveen aquí ácidos nucleicos capaces de codificar el/los polipéptido(s) de lisina dimérico(s) de la invención. Las secuencias de ácido nucleico representativas en este contexto son las secuencias de polinucleótido que codifican los monómeros de polipéptido dimérico de cualquiera de las Figuras 1, 6 y 7 y la Tabla 1, las SEQ ID NO: 3 o 6, y las secuencias que se hibridan, bajo condiciones rigurosas, con secuencias complementarias de secuencia(s) de ácido
10 nucleico. También se contemplan variantes adicionales de estas secuencias, y secuencias de ácidos nucleicos que se hibridan con las que se muestran en las Figuras, para usarse en la producción de las enzimas lisinas de acuerdo con la descripción, que incluyen las variantes naturales que se pueden obtener. Una gran variedad de secuencias de ácido nucleico aisladas o secuencias de ADNc que codifican enzimas lisinas asociadas a fago, y secuencias parciales que se hibridan con estas secuencias de gen, son útiles para la producción recombinante de la(s)
15 enzima(s) lisina(s) o 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.

20 Un "vector" es un replicón, tal como un plásmido, fago o cósmido, al que se le puede unir otro segmento de ADN a fin de producir la replicación del segmento añadido.

Una "molécula de ADN" se refiere a la forma polimérica de los desoxirribonucleótidos (adenina, guanina, timina o citosina) en su forma de una sola cadena o de hélice de doble cadena. Este término se refiere sólo a la estructura
25 primaria y secundaria de la molécula y no se limita a cualquier forma terciaria particular. De esta manera, este término incluye ADN de doble cadena encontrado, entre otras partes, en moléculas de ADN lineales (p. ej., fragmentos de restricción), virus, plásmidos y cromosomas. Al tratar la estructura de moléculas particulares de ADN de doble cadena, las secuencias se pueden describir aquí de acuerdo con la convención normal de dar solamente la secuencia en dirección 5' a 3' a lo largo de la cadena no transcrita de ADN (es decir, la cadena que tiene una
30 secuencia homóloga al ARNm).

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

Una "secuencia codificadora" de ADN es una secuencia de ADN de doble cadena que es transcrita y traducida a un
35 polipéptido *in vivo* cuando se pone bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificadora son determinados por un codón de iniciación en el extremo 5' (amino) y un codón de detención de traducción en el extremo 3' (carboxilo). Una secuencia codificadora puede incluir, sin limitación, secuencias procarióticas, ADNc de ARNm eucariótico, secuencias de ADN genómico de ADN eucariótico (p. ej., de mamífero), e incluso secuencias de ADN sintéticas. Una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de transcripción
40 normalmente estarán localizadas en dirección 3' a la secuencia codificadora.

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

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

55 Una "secuencia de control de 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 de transcripción y traducción en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia codificadora en ARNm, que es entonces traducido a la proteína codificada por la secuencia codificadora.
60

Una "secuencia señal" se puede incluir antes de la secuencia codificadora. Esta secuencia codifica un péptido señal, de extremo N-terminal al polipéptido, que se comunica con la célula huésped para dirigir al polipéptido a la superficie celular o secretar el polipéptido hacia el medio, y este péptido señal es cortado por la célula huésped antes de que la proteína deje la célula. Las secuencias de señal pueden encontrarse asociadas con una variedad de proteínas nativas para procariotas y eucariotas.

El término "oligonucleótido", como se usa en este documento al hacer referencia a la sonda de la presente invención, se define como una molécula que comprende 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 final del oligonucleótido.

El término "cebador", como se usa en este documento, se refiere a un oligonucleótido, ya sea natural como en un producto de digestión de restricción purificado o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como un punto de inicio de síntesis cuando se pone bajo condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador, que es complementario a una cadena de ácido nucleico, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente inductor como ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados. El cebador puede ser de una cadena o de doble cadena, y debe ser suficientemente grande para iniciar la síntesis del producto de extensión deseado en presencia del agente inductor. La longitud exacta del cebador dependerá de muchos factores que incluyen la temperatura, la fuente del cebador y el uso del procedimiento. Por ejemplo, para aplicaciones diagnósticas dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, el oligonucleótido cebador normalmente contiene 15-25 nucleótidos o más, aunque puede contener menos nucleótidos.

Los cebadores del presente documento se seleccionan para ser "sustancialmente" complementarios a diferentes cadenas de una secuencia de ADN diana particular. Esto significa que los cebadores deben ser suficientemente complementarios para hibridarse con sus cadenas respectivas. Por lo tanto, la secuencia de cebador no necesita reflejar la secuencia exacta del molde. Por ejemplo, se puede unir un fragmento de nucleótido no complementario al extremo 5' del cebador, y con el resto de la secuencia del cebador siendo complementaria a la cadena. Alternativamente, en el cebador se pueden intercalar bases no complementarias o secuencias más grandes, siempre que la secuencia del cebador tenga suficiente complementariedad con la secuencia de la cadena por hibridar con la misma, y forme así el molde para la síntesis del producto de extensión.

Tal como se usan en este documento, los términos "endonucleasas de restricción" y "enzimas de restricción" se refieren a enzimas bacterianas, cada una de las cuales corta ADN de doble cadena en, o cerca de, una secuencia de nucleótidos específica.

Una célula ha sido "transformada" por ADN exógeno o heterólogo cuando dicho ADN ha sido introducido en la célula. El ADN transformante puede o no ser integrado (enlazado covalentemente) al ADN cromosómico que forma el genoma de la célula. En procariotas, levaduras y células de mamífero, por ejemplo, el ADN transformante se puede mantener sobre un elemento episómico tal como un plásmido. Con respecto a las células eucariotas, una célula transformada establemente es aquella 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 es demostrada por la capacidad de la célula eucariota para establecer líneas o clones de células comprendidos de una población de células hijas que contienen el ADN transformante. Un "clon" es una población de células derivadas de una sola célula o ancestro común mediante mitosis. Una "línea celular" es un clon de una célula primaria que es capaz de tener un crecimiento estable *in vitro* durante muchas generaciones.

Dos secuencias de ADN son "sustancialmente homólogas" cuando por lo menos aproximadamente el 75 % (preferentemente por lo menos aproximadamente el 80 %, y con la máxima preferencia por lo menos aproximadamente el 90 o 95 %) de los nucleótidos concuerdan sobre la longitud definida de las secuencias de ADN. Las secuencias que son sustancialmente homólogas se pueden identificar comparando las secuencias y usando el *software* estándar disponible en los bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación de *Southern*, por ejemplo bajo condiciones rigurosas definidas 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., *supra*; DNA Cloning, Vols. I & II, *supra*; Nucleic Acid Hybridization, *supra*.

Muchas de las moléculas de ADN variantes contempladas en el presente documento incluyen las creadas por técnicas estándares de mutagénesis de ADN, tal como mutagénesis de cebador M13. Detalles de estas técnicas se proporcionan en Sambrook y col. (1989) en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y. Usando estas técnicas se pueden crear variantes que difieren menormente de aquellas descritas. La descripción contempla moléculas de ADN y secuencias de nucleótidos que son derivadas de las que se describen aquí

específicamente, y que difieren de las descritas por la supresión, adición o sustitución de nucleótidos, pero que todavía codifican una proteína que posee las características funcionales de los polipéptidos de lisina. También se incluyen moléculas de ADN pequeñas que se derivan de las moléculas de ADN descritas. Estas moléculas de ADN pequeñas incluyen oligonucleótidos adecuados para usarse como sondas de hibridación o cebadores de reacción en cadena de polimerasa (PCR). Por lo tanto, estas moléculas de ADN pequeñas comprenderán por lo menos un segmento de una enzima lítica codificada genéticamente por un bacteriófago de *Streptococcus*, y para los fines de la PCR, comprenderán por lo 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 se derivan de las moléculas del ADN descrito que se describe anteriormente también se pueden definir como secuencias de ADN que se hibridan bajo condiciones rigurosas con las secuencias de ADN descritas, o fragmentos de las mismas.

Las condiciones de hibridación que corresponden a grados particulares de rigurosidad varían dependiendo de la naturaleza del procedimiento de hibridación de elección, así como de la composición y longitud del ADN hibridante utilizado. Generalmente, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica del tampón de hibridación (especialmente la concentración del ion sodio) determinarán la rigurosidad de la hibridación. Los cálculos con respecto a las condiciones de hibridación requeridas para alcanzar grados particulares de rigor se tratan en Sambrook y col. (1989), en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., capítulos 9 y 11.

Un ejemplo de este cálculo es como sigue. Un experimento de hibridación se puede efectuar por hibridación de una molécula de ADN (por ejemplo, una variación natural de la enzima lítica codificada genéticamente por un bacteriófago específico para *Bacillus anthracis*) a una molécula de ADN diana. Un ADN diana, por ejemplo, puede ser el ADNc correspondiente que se ha sometido a electroforesis en un gel de agarosa y transferido a una membrana de nitrocelulosa por *Southern blot* (Southern (1975). *J. Mol. Biol.* 98:503), una técnica muy conocida y descrita en Sambrook y col. (1989) en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y. La hibridación con una sonda diana marcada con dCTP de P³² isotópico se efectúa en una solución de fuerza iónica alta, tal como SSC x6 a una temperatura que es 20-25 grados Celsius menor que la temperatura de fusión, T_m (que se describe *infra*). Para estos experimentos de hibridación de *Southern* en donde la molécula de ADN diana en el *Southern blot* contiene 10 ng de ADN o más, la hibridación se efectúa por 6-8 horas usando una sonda radiomarcada a 1-2 ng/ml (de actividad específica igual a 109 CPM/μg o mayor). Después de la hibridación, el filtro de nitrocelulosa se lava para eliminar la hibridación de fondo. Las condiciones de lavado son tan rigurosas como sea posible para eliminar la hibridación de fondo pero al mismo tiempo reteniendo una señal de hibridación específica. El término "T_m" representa la temperatura por arriba de la cual, bajo las condiciones iónicas predominantes, la molécula de sonda radiomarcada no se hibrida con su molécula de ADN diana. La T_m de esta molécula hibrida puede ser calculada a partir de la siguiente ecuación: $T_m = 81,5^\circ\text{C} - 16,6(\log_{10} \text{ de la concentración de ion sodio}) + 0,41(\% \text{ G+C}) - 0,63(\% \text{ formamida}) - (600/l)$, en donde l = a la longitud del híbrido en pares de bases. Esta ecuación es válida para concentraciones de ion sodio en la escala de 0,01 M a 0,4 M, y menos exacta para cálculos de T_m en soluciones de concentración de ion sodio más altas (Bolton and McCarthy (1962) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:1390). La ecuación también es válida para ADN que tiene un contenido de G+C dentro del 30 % al 75 %, y también se aplica a híbridos de longitud mayor de 100 nucleótidos. El comportamiento de las sondas de oligonucleótido se describe en detalle en el capítulo 11 de Sambrook y col. (1989), en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y. Las condiciones ejemplificadas preferidas descritas en este documento se contemplan particularmente para usarse en la selección de variaciones del gen lítico.

En aspectos preferidos de la presente descripción, las condiciones rigurosas se pueden definir como aquellas bajo las cuales las moléculas de ADN con más del 25 % de variación de secuencia (también denominada "discordancia") no se hibridarán. En un aspecto muy preferido, las condiciones rigurosas son aquellas bajo las cuales las moléculas de ADN con más del 15 % de discordancia no se hibridarán, y todavía más preferentemente las condiciones rigurosas son aquellas bajo las cuales las secuencias de ADN con más del 10 % de discordancia no se hibridarán. Preferentemente, las condiciones rigurosas son aquellas bajo las cuales las secuencias de ADN con más del 6 % de discordancia no se hibridarán.

La degeneración del código genético amplía adicionalmente el alcance, ya que permite variaciones mayores de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN, manteniendo al mismo tiempo la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. Por ejemplo, un residuo de aminoácido representativo es la alanina. Esta puede ser codificada en el ADNc por el triplete de codón de nucleótidos GCT. Debido a la degeneración del código genético, otros tres tripletes de codón de nucleótidos --GCT, GCC y GCA- también codifican alanina. De esta manera, 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 de los codones de nucleótidos para aminoácidos particulares son muy conocidos para el experto en la materia. Basándose en la degeneración del código genético, se pueden derivar moléculas de ADN variantes a

partir de las moléculas de ADNc descritas en el presente documento usando las técnicas estándares de mutagénesis de ADN que se describen anteriormente, o por síntesis de secuencias de ADN. Las secuencias de ADN que no se hibridan bajo condiciones rigurosas con las secuencias de ADNc descritas, en virtud de la variación de secuencia basada en la degeneración del código genético, están incluidas aquí por esta descripción.

5 También se describen las secuencias de ADN que codifican una lisina en la presente invención, que incluyen lisinas Cpl-1 y/o Pal diméricas, cuyas secuencias codifican un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos provista en las Figuras y en la Tabla 1, pero que son degeneradas para las mismas. Por "degeneradas" se entiende que se usa un codón de tres letras diferente para especificar un aminoácido particular.

10 Aunque el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos puede ser predeterminado, no es necesario predeterminar la mutación *per se*. Por ejemplo, para optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se puede realizar mutagénesis aleatoria en el codón o región diana, y las variantes de proteína expresadas se criban para determinar la combinación óptima de actividad deseada. Las técnicas para hacer mutaciones de
15 sustitución en sitios predeterminados del ADN que tiene una secuencia conocida como se describe anteriormente son muy conocidas.

Normalmente las sustituciones de aminoácidos son de residuos individuales, o pueden ser de aproximadamente de 1 a 10 residuos de aminoácidos; y las supresiones variarán aproximadamente de 1 a 30 residuos. Las supresiones o
20 inserciones pueden ser en una forma individual, pero preferentemente se hacen 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. Obviamente, las mutaciones que se hacen en el ADN que codifica la proteína no deben poner la secuencia fuera del marco de lectura, y preferentemente no crean regiones complementarias que pudieran producir una estructura secundaria de ARNm (EP
25 75.444A).

Las variantes de sustitución son aquellas en las que por lo menos un residuo de la secuencia de aminoácidos se ha eliminado y un residuo diferente se inserta en su lugar. Estas sustituciones se pueden hacer para no generar un efecto significativo sobre las características de la proteína, o cuando se desea modular finamente las características
30 de la proteína. Los aminoácidos que se pueden sustituir por un aminoácido original en una proteína y que se consideran como sustituciones conservativas se describen arriba y serán reconocidos por el experto en la materia.

Se pueden hacer cambios sustanciales en la función o identidad inmunológica, seleccionando sustituciones que son menos conservativas, por ejemplo seleccionando residuos que difieren más significativamente en su efecto sobre el
35 mantenimiento de: (a) la estructura del esqueleto de polipéptido en el área de sustitución, por ejemplo, una conformación de lámina o helicoidal; (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana; o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Las sustituciones que en general se espera que produzcan los cambios más grandes en las propiedades de la proteína serán aquellos en los que: (a) un residuo hidrófilo, p. ej., serilo o treonilo, es sustituido por un residuo hidrófobo, p. ej., leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina es sustituida
40 por cualquier otro residuo; (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, p. ej., lisilo, arginilo o histadilo, es sustituido por un residuo electronegativo, p. ej., glutamilo o aspartilo; o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, p. ej., fenilalanina, es sustituido por uno que no tiene una cadena lateral, p. ej., glicina.

Los efectos de estas sustituciones o supresiones o adiciones de aminoácidos se pueden evaluar para derivados o
45 variantes del/los polipéptido(s) lítico(s) analizando la capacidad de las proteínas derivadas o variantes para lisar o destruir las bacterias susceptibles, o para complementar la sensibilidad a los agentes de reticulación de ADN exhibida por los fagos en huéspedes bacterianos infectados. Estos ensayos se pueden efectuar transfectando moléculas de ADN que codifican las proteínas derivadas o variantes en las bacterias como se describe anteriormente, o incubando bacterias con las proteínas expresadas de huéspedes transfectedos con las moléculas
50 de ADN que codifican las proteínas derivadas o variantes.

Aunque el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos puede ser predeterminado, no es necesario predeterminar la mutación *per se*. Por ejemplo, para optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se puede realizar mutagénesis aleatoria en el codón o región diana, y las variantes de proteína expresadas se
55 criban para determinar la combinación óptima de actividad deseada. Las técnicas para hacer mutaciones de sustitución en sitios predeterminados del ADN que tiene una secuencia conocida como se describe anteriormente son muy conocidas.

Otra característica de esta invención es la expresión de las secuencias de ADN que codifican lisinas diméricas
60 descritas en el presente documento. Como es bien conocido en la técnica, las secuencias de ADN se pueden

expresar ligándolas operativamente a una secuencia de control de expresión en un vector de expresión apropiado y, después, utilizar ese vector de expresión para transformar un huésped unicelular apropiado. Este enlazamiento operativo de una secuencia de ADN de esta descripción a una secuencia de control de expresión, desde luego, incluye, si todavía no es parte de la secuencia de ADN, la provisión de un codón de iniciación, ATG, en el marco de lectura correcto en dirección de la secuencia de ADN. Se puede utilizar una extensa variedad de combinaciones de huésped/vector de expresión para expresar las secuencias de ADN de esta descripción. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas. Los vectores adecuados incluyen derivados de SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, p. ej., los plásmidos *E. coli*, colEI, pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos tales como RP4; ADN de fago, p. ej., los muchos derivados del fago λ , p. ej., NM989, y otro ADN de fago, p. ej., M13 y ADN de fago filamentoso de una sola cadena; plásmidos de levadura tales como el plásmido 2: o derivados de los mismos; vectores útiles en células eucariotas, tales como vectores útiles en células de insecto o mamífero; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, tales como plásmidos que han sido modificados para utilizar ADN de fago u otras secuencias de control de expresión; y similares.

En estos vectores, se puede usar cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión -- secuencias que controlan la expresión de una secuencia de ADN operativamente enlazadas a ella-- para expresar secuencias de ADN de esta descripción. Tales secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos o tardíos del SV40, CMV, vaccinia, polioma o adenovirus, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC, el sistema TRC, el sistema LTR, las regiones importantes de operador y promotor del fago λ , las regiones de control de la proteína de cubierta fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida (p. ej., Pho5) los promotores de los factores α de apareamiento de la levadura, y otras secuencias conocidas para el control de la expresión de genes de células procariotas y eucariotas o sus virus y diversas combinaciones de los mismos.

Una amplia variedad de células huésped unicelulares también son útiles para expresar las secuencias de ADN de esta descripción. Estos huéspedes pueden incluir huéspedes eucariotas y procariotas muy conocidos, tales como cepas de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, hongos tales como levaduras y células de animal, tales como células CHO, R1.1, B-W y L-M, células de riñón de mono verde africano (p. ej., COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 y BMT10), células de insecto (p. ej., Sf9) y células humanas y células de plantas en cultivo de tejido.

Se entenderá que no todos los vectores, secuencias de control de expresión y huéspedes funcionarán igualmente bien para expresar las secuencias de ADN de la descripción. Tampoco todos los huéspedes funcionarán igualmente bien con el mismo sistema de expresión. Sin embargo, el experto en la materia será capaz de seleccionar los vectores, secuencias de control de expresión y huéspedes adecuados sin mayor experimentación para obtener la expresión deseada.

Se pueden usar bibliotecas de fragmentos de la secuencia codificadora de un polipéptido para generar una población abigarrada de polipéptidos para cribado y subsiguiente selección de variantes. Por ejemplo, se puede generar una biblioteca de fragmentos de secuencia codificadora tratando un fragmento de PCR de doble cadena de la secuencia codificadora de interés con una nucleasa, bajo condiciones donde ocurre corte solo aproximadamente una vez por molécula, desnaturalizando el ADN de doble cadena, renaturalizando el ADN para formar ADN de doble cadena que puede incluir pares de sentido/antisentido de diferentes productos cortados, quitando porciones de una sola cadena de los dúplex reformados por tratamiento con nucleasa S1, y ligando la colección de los fragmentos resultantes en un vector de expresión. Mediante este procedimiento se puede derivar una biblioteca de expresión que codifica fragmentos de extremos N-terminales e internos de varios tamaños de la proteína de interés.

Se conocen varios procedimientos en la técnica para el cribado de productos génicos de bibliotecas combinatoriales fabricadas mediante mutaciones o truncamientos puntuales y para el cribado de genotecas de ADNc para productos génicos que tienen una propiedad seleccionada. Habitualmente, las técnicas usadas más ampliamente, que son susceptibles de análisis de alto rendimiento, para el cribado de genotecas grandes incluyen la clonación de la genoteca en vectores de expresión replicables, la transformación de las células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante y la expresión de los genes combinatoriales en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. La mutagénesis de ensamblado recursivo (REM), una técnica que incrementa la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, se puede usar en combinación con los ensayos de cribado para identificar variantes de una proteína (Arkin y Yourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Delgrave y col. (1993) Protein Engineering 6(3):327-331).

Composiciones

60

De acuerdo con la invención se proporcionan composiciones terapéuticas o farmacéuticas que comprenden la(s) enzima(s)/polipéptido(s) lítico(s) dimérico(s) de la invención, así como también procedimientos de uso y procedimientos de fabricación relacionados. Las composiciones terapéuticas o farmacéuticas pueden comprender uno o más polipéptidos líticos diméricos, y opcionalmente incluyen enzimas líticas truncadas, quiméricas o barajadas, combinadas opcionalmente con otros componentes tales como un vehículo, polipéptido, polinucleótido, proteína(s) holina, uno o más antibióticos o excipientes, o vehículos adecuados. La descripción provee composiciones terapéuticas o composiciones farmacéuticas de las lisinas de la invención, que incluyen Cpl-1 diméricas, y Cpl-1^{C45S,D324C} de realización, para usarse en la destrucción, alivio, descolonización, profilaxis o tratamiento de bacterias gram positivas, que incluyen infecciones bacterianas o afecciones relacionadas. También se describen composiciones terapéuticas o composiciones farmacéuticas de las lisinas de la invención, que incluyen Pal diméricas, y Pal^{D280C} de realización, para usarse en la destrucción, alivio, descolonización, profilaxis o tratamiento de bacterias gram positivas, que incluyen infecciones bacterianas o afecciones relacionadas. Las composiciones que comprenden lisinas diméricas, particularmente Pal dimérica o Cpl-1 dimérica, o combinaciones de las mismas, incluyendo productos truncados o variantes de las mismas, tal como se provee en este documento para usarse en la destrucción, alivio, descolonización, profilaxis o tratamiento de bacterias gram positivas, que incluyen infecciones bacterianas o afecciones relacionadas, en particular de *Streptococcus*.

La invención proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una lisina para uso en el tratamiento de un mamífero que padece una enfermedad o afección causada por una infección de estreptococos o para la descolonización de estreptococos en un mamífero que padece de o está en riesgo de contraer una enfermedad o afección causada por una infección de estreptococos donde la lisina es una lisina de fago específico de *Streptococcus* dimérica y aislada que comprende dos monómeros de lisina de fago específico de *Streptococcus* unidos covalentemente entre sí, donde dicho dímero posee actividad destructiva contra una o más bacterias de *Streptococcus* y donde cada monómero tiene un residuo Cys que se encuentra entre 14 y 20 aminoácidos desde el extremo C-terminal, donde dichos monómeros de lisina están unidos covalentemente entre sí por un enlace disulfido y donde dichos monómeros de lisina no poseen un residuo Cys en los 45 primeros residuos.

La(s) enzima(s) o polipéptido(s) incluidos en las composiciones terapéuticas pueden ser una o más de, o cualquier combinación de, enzima(s) lítica(s) dimérica(s) asociada(s) con fago, polipéptidos líticos diméricos truncados, polipéptido(s) lítico(s) dimérico(s) variantes, y enzimas líticas diméricas y quiméricas y/o barajadas. Adicionalmente se pueden utilizar diferentes polipéptidos líticos codificados genéticamente por un fago diferente para el tratamiento de la misma bacteria. Estas enzimas líticas pueden ser también cualquier combinación de enzimas o polipéptidos líticos diméricos "no alterados", polipéptido(s) lítico(s) dimérico(s) truncado(s), polipéptido(s) lítico(s) dimérico(s) variantes, y enzimas líticas diméricas quiméricas y barajadas. El/las/la(s) enzima(s)/polipéptido(s) lítico(s) en una composición terapéutica o farmacéutica para bacterias gram positivas, que incluyen *Streptococcus*, se pueden usar solos o en combinación con antibióticos o agentes bactericidas o bacteriostáticos o, si hay otros organismos bacterianos invasores por tratar, en combinación con otras enzimas líticas asociadas a fago específico para otras bacterias diana. La enzima lítica, enzima truncada, enzima variante, enzima quimérica, y/o enzima lítica barajada se puede usar en conjunto 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 las enzimas o polipéptidos, con o sin la presencia de lisostafina. Se puede incluir más de una enzima o polipéptido lítico en la composición terapéutica.

La composición farmacéutica también puede incluir una o más enzimas líticas diméricas, que incluyen isozimas, análogos o variantes de las mismas, producidas mediante síntesis química o técnicas de ADN recombinante. En particular, la proteína lítica alterada se puede producir por 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 diméricas y una o más proteínas líticas truncadas, variantes, quiméricas o barajadas. La composición farmacéutica también puede contener un péptido o fragmento de péptido de por lo menos una proteína lítica dimérica derivada 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.

La presente descripción provee lisinas diméricas bacterianas, particularmente lisinas diméricas generadas de forma recombinante de lisinas monoméricas naturales que incluyen una variante de polipéptido de lisina Cpl-1 que posee actividad destructiva bacteriana. La invención describe mutantes de lisina Cpl-1 que contienen cisteínas mutantes para la dimerización y la retención de la actividad antibacteriana gram positiva. Se provee aquí una composición que comprende una lisina de *Streptococcus* dimérica, que incluye una lisina mutante Cpl-1 dimérica, que tiene una actividad destructiva igual o mayor contra las células de *Streptococcus*, en comparación con la proteína lisina Cpl-1 no mutada y monomérica, que incluye las lisinas Cpl-1 y Cpl-1^{C45S,D342C} diméricas.

60

La presente descripción provee lisinas diméricas bacterianas, particularmente lisinas diméricas generadas de forma recombinante de lisinas monoméricas naturales que incluyen una variante de polipéptido de lisina Pal que posee actividad destructiva bacteriana. La invención describe mutantes de lisina Pal que contienen cisteínas mutantes para la dimerización y la retención de la actividad antibacteriana gram positiva. Se provee aquí una composición que comprende una lisina de *Streptococcus* dimérica, que incluye una lisina mutante Pal dimérica, que tiene una actividad destructiva igual o mayor contra las células de *Streptococcus*, en comparación con la proteína lisina Pal no mutada y monomérica, que incluye las lisinas Pal y Pal^{D280C} diméricas.

La composición terapéutica también puede comprender una proteína holina. Las proteínas holinas (u "holinas") son proteínas que producen agujeros en la membrana celular. Las proteínas holinas pueden formar lesiones letales de la membrana que interrumpen la respiración celular de las bacterias. Igual que las proteínas líticas, las proteínas holinas son codificadas y transportadas por un fago. De hecho, es muy común para el código genético de la proteína holina estar junto al código de la proteína lítica del fago, o incluso dentro del mismo. La mayoría de las secuencias de proteína holina son cortas y en general de naturaleza hidrófoba, con un dominio carboxi-terminal muy hidrófilo. En muchos casos, la proteína holina putativa es codificada en un marco de lectura diferente dentro del dominio enzimáticamente activo del fago. En otros casos, la proteína holina es codificada en el ADN adyacente o cercano al ADN que codifica la proteína lítica de pared celular. Las proteínas holinas son sintetizadas frecuentemente durante la última etapa de la infección del fago y se encuentran en la membrana citoplásmica en donde causan lesiones de la membrana. Las holinas se pueden agrupar en dos clases generales basándose en un análisis de la estructura primaria. Las holinas de clase I son normalmente de 95 residuos o más grandes y pueden tener tres dominios de transmembrana potenciales. Las holinas de clase II normalmente son más pequeñas, aproximadamente 65-95 residuos, con la distribución de residuos cargados e hidrófobos indicando dos dominios TM (Young, y col. Trends in Microbiology v. 8, No. 4, March 2000). Por lo menos para los fagos de los huéspedes gram positivos, sin embargo, el sistema de lisis de componente doble puede no ser universal. Aunque la presencia de las holinas ha sido mostrada o sugerida para varios fagos, todavía no se han encontrado genes que codifican holinas putativas para todos los fagos. Se ha demostrado que las holinas están presentes en varias bacterias que incluyen, por ejemplo, bacteriófago lactocócico Tuc2009, lactocócico NLC3, bacteriófago neumocócico EJ-1, bacteriófago de *Lactobacillus gasseri* Nadh, bacteriófago de *Staphylococcus aureus* Towrt, bacteriófagos de *Listeria monocytogenes*, fago neumocócico Cp-1, fago de *Bacillus subtilis* M29, lisina LL-H de bacteriófago de *Lactobacillus delbrueckii*, y bacteriófago N 11 de *Staphylococcus aureus*. (Loessner, y col., Journal of Bacteriology, August 1999, p. 4452-4460).

Por ejemplo, las proteínas holinas se pueden usar en conjunto con las enzimas líticas para acelerar la velocidad y eficiencia a la que son destruidas las bacterias. Las proteínas holinas también pueden estar en forma de enzimas quiméricas y/o barajadas. Las proteínas holinas también se pueden usar solas en el tratamiento de infecciones bacterianas de acuerdo con algunos aspectos.

La composición farmacéutica puede contener un agente complementario que incluye uno o más agentes antimicrobianos y/o uno o más antibióticos convencionales. Para acelerar el tratamiento de la infección, el agente terapéutico puede incluir adicionalmente por lo menos un agente complementario que también puede potenciar la actividad bactericida de la enzima lítica. Los antimicrobianos actúan principalmente alterando la estructura o función de una célula bacteriana por inhibición de la síntesis de la pared celular, inhibición de la función de la membrana celular, y/o inhibición de las funciones metabólicas, incluso la síntesis de proteína y ADN. Los antibióticos se pueden subclasificar ampliamente en los que afectan a la biosíntesis de peptidoglucano 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, que incluyen penicilina y antibióticos similares, interrumpen la pared celular externa rígida de tal manera que la célula relativamente sin soporte se hincha y finalmente se rompe. Los antibióticos que afectan a la biosíntesis de peptidoglucano de la pared celular incluyen: glicopéptidos que inhiben la síntesis de peptidoglucano impidiendo la incorporación de ácido N-acetilmurámico (NAM) y subunidades de N-acetilglucosamina (NAG) de péptido a la matriz de peptidoglucano. Los glicopéptidos disponibles incluyen vancomicina y teicoplanina; que actúan inhibiendo la formación de reticulaciones de peptidoglucano. El grupo funcional de penicilinas, el resto β -lactama, se une a la DD-transpeptidasa que enlaza las moléculas de peptidoglucano en las bacterias, y la inhibe. Las enzimas hidrolíticas continúan rompiendo la pared celular, causando citólisis o muerte debido a la presión osmótica. Las penicilinas comunes incluyen oxacilina, ampicilina y cloxacilina; y polipéptidos que alteran la desfosforilación de la C₅₅-isopenilpírofosfato, una molécula que lleva bloques de construcción de peptidoglucano fuera de la membrana plasmática. Un polipéptido que tiene impacto sobre la pared celular es la bacitracina.

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 las mismas en cantidades que son eficaces para mejorar sinérgicamente el efecto terapéutico de la enzima lítica. El antibiótico o agente(s) bactericida(s) o bacteriostático(s) pueden estar en concentraciones o en cantidades con el fin de provocar

- la viabilidad o crecimiento bacteriano o pueden tener sub-MIC o bien estar por debajo de la concentración inhibitoria mínima que alcanza o a la que asciende. Virtualmente se puede usar cualquier otro antibiótico con la enzima lítica alterada y/o no alterada. Similarmente, se pueden incluir otras enzimas líticas en el vehículo para tratar otras infecciones bacterianas. Se pueden usar suplementos de antibióticos virtualmente en todos los usos de la enzima
- 5 cuando se tratan diferentes enfermedades. La composición farmacéutica también puede contener un péptido o un fragmento de péptido de por lo menos una proteína lítica, una proteína holina, o por lo menos una proteína holina y una lítica, cada una de estas proteínas lítica y holina derivada de las mismas especies bacterianas o de diferentes, con la adición opcional de agentes complementarios y un vehículo o diluyente adecuado.
- 10 También se proveen 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 polipéptido lítico dimérico o un fragmento de péptido de un polipéptido lítico dimérico *in vivo*. También se proveen cultivos celulares que contienen estas moléculas de ácido nucleico, polinucleótidos y vectores que llevan y expresan estas moléculas *in vitro* e *in vivo*.
- 15 Las composiciones terapéuticas o farmacéuticas pueden comprender polipéptidos líticos diméricos, incluso uno o más polipéptido(s) de lisina dimérico(s) dirigidos contra las mismas, diferentes, o solapadas bacterias susceptibles, combinados con una variedad de vehículos para tratar las enfermedades causadas por las bacterias gram positivas susceptibles. El vehículo contiene adecuadamente cantidades menores de aditivos, tales como sustancias que
- 20 mejoran la estabilidad e isotonicidad química. Estos materiales son inocuos para los receptores, a las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones como fosfato, citrato, succinato, ácido acético y otros ácidos orgánicos o sus sales; antioxidantes como ácido ascórbico; polipéptidos de peso molecular bajo (menos de aproximadamente diez residuos), p. ej., poliarginina o tripéptidos; proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; glicina; aminoácidos como ácido glutámico,
- 25 ácido aspártico, histidina o arginina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen celulosa o sus derivados, glucosa, manosa, trehalosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; alcoholes de azúcar como manitol o sorbitol; contraiones como sodio; agentes tensioactivos no iónicos como polisorbatos, poloxámeros o polietilenglicol (PEG); y/o sales neutras, p. ej., NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, y otras. La glicerina o glicerol (1,2,3-propanotriol) está disponible comercialmente para uso farmacéutico. Se puede diluir en agua estéril para inyección,
- 30 o inyección de cloruro de sodio, u otro fluido inyectable acuoso farmacéuticamente aceptable, y se usa a concentraciones del 0,1 al 100 % (v/v), preferentemente del 1,0 al 50 %, más preferentemente a aproximadamente el 20 %. El DMSO es un disolvente aprótico con una capacidad notable para incrementar la penetración de muchos fármacos aplicados localmente. El DMSO se puede diluir en agua estéril para inyección, o inyección de cloruro de sodio, u otro fluido inyectable acuoso farmacéuticamente aceptable, y se usa a concentraciones del 0,1 al 100 %
- 35 (v/v). El vehículo también puede incluir solución de Ringer, una solución tamponada, y solución de dextrosa, particularmente cuando se prepara una solución intravenosa.
- Cualquiera de los vehículos para los polipéptidos líticos diméricos se puede fabricar mediante los medios convencionales. Sin embargo, se prefiere que cualquier enjuague bucal o producto de tipo similar no contenga
- 40 alcohol para impedir la desnaturalización del polipéptido/enzima. Similarmente, en el procedimiento de fabricación de pastillas para la tos, chicle, caramelo o pastilla disoluble con el polipéptido lítico, la introducción de éste se debe hacer antes del endurecimiento de la pastilla o caramelo pero después de que la pastilla o caramelo se ha enfriado un poco, para evitar la desnaturalización por calor de la enzima.
- 45 Un polipéptido lítico dimérico se puede añadir a estas sustancias en forma líquida o en un estado liofilizado, después de lo cual se solubilizará al encontrar los fluidos corporales como la saliva. Los polipéptidos/enzimas también pueden estar en una micela o liposoma.
- Las escalas de dosis o cantidades efectivas de un polipéptido/enzima lítica dimérica para tratar la infección
- 50 dependerán en parte de si la enzima/polipéptido lítico dimérico se usará de manera terapéutica o profiláctica, la duración de exposición del receptor a la bacteria infecciosa, el tamaño y peso del individuo, etc. La duración del uso de la composición que contiene la enzima/polipéptido también depende de si el uso es para fines profilácticos, en donde el uso puede ser cada hora, cada día o cada semana, durante un periodo breve; o si el uso es para fines terapéuticos, donde el uso puede ser necesario en un régimen de uso más intenso de la composición, de tal manera que el uso puede durar por horas, días o semanas, y/o en una periodicidad diaria, o a intervalos regulares durante el
- 55 día. Cualquier forma de dosis utilizada debe proveer un número mínimo de unidades para una cantidad mínima de tiempo. La concentración de las unidades activas de enzima que se cree proveen una cantidad o dosis eficaz de enzima puede estar en la escala de aproximadamente 100 unidades/ml a aproximadamente 500.000 unidades/ml de fluido en el medio húmedo o mojado de los conductos nasales y orales, y posiblemente en la escala de
- 60 aproximadamente 100 unidades/ml a aproximadamente 50.000 unidades/ml. Más específicamente, el tiempo de

exposición a la enzima/polipéptido activo puede afectar la concentración deseada de las unidades de enzima activa por ml. Los vehículos que se clasifican como vehículos de liberación "prolongada" o "retardada" (tal como por ejemplo algunos aerosoles nasales o pastillas) podrían tener o proveer una concentración más baja de unidades de ingrediente activo (enzima) por ml, pero durante un periodo más largo, mientras que un vehículo de liberación "corta" o "rápida" (tal como, por ejemplo un gargarismo) podría tener o proveer una concentración alta de unidades de ingrediente activo (enzima) por ml, pero durante un periodo más corto. La cantidad de unidades activas por ml y el tiempo de exposición dependen de la naturaleza de la infección, de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico, y de otras variables. Existen situaciones en donde puede ser necesario tener una dosis de unidades/ml mucho más alta, o una dosis de unidades/ml más baja.

La enzima/polipéptido lítico dimérico estaría en un medio que tiene un pH que permita la actividad de la enzima/polipéptido lítico dimérico. Por ejemplo, si un individuo humano se expone a otro humano con un trastorno respiratorio superior bacteriano, la enzima/polipéptido lítico dimérico residirá en el revestimiento de la mucosa e impedirá cualquier colonización de la bacteria infecciosa. Antes de poner la enzima lítica dimérica en el sistema vehículo o modo de administración oral, se prefiere que la enzima esté en un medio tamponado estabilizador para mantener el pH en una escala de entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 9,0, más preferentemente entre 5,5 y aproximadamente 7,5.

Un tampón estabilizador puede permitir la actividad óptima de la enzima lisina/polipéptido dimérico. El tampón puede contener un reactivo reductor, tal como ditiotreitól. El tampón estabilizador también puede ser, o incluir, un reactivo quelante de metal, tal como la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético, o también puede contener un tampón de fosfato o citrato-fosfato, o cualquier otro tampón. El ADN que codifica estos fagos y otros fagos puede ser alterado para permitir que una enzima recombinante ataque una pared celular en más de dos sitios, para permitir que la enzima recombinante corte la pared celular de más de una especie de bacterias, para permitir que la enzima recombinante ataque otras bacterias, o cualquier combinación de las mismas. El tipo y número de alteraciones de una enzima recombinante producida por bacteriófago son incalculables.

Se puede incluir un agente tensioactivo suave en una composición terapéutica o farmacéutica, en una cantidad eficaz para potenciar el efecto terapéutico de la enzima/polipéptido lítico dimérico, que se pueda usar en una composición. Los agentes tensioactivos suaves adecuados incluyen, entre otros, ésteres de polioxitilensorbitán y ácidos grasos (la 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 agentes tensioactivos que se dan biológicamente, p.ej., ácidos grasos, glicéridos, monoglicéridos, desoxicolato y ésteres de desoxicolato.

En esta invención también se pueden usar conservantes, y comprenden preferentemente y aproximadamente del 0,05 % al 0,5 % en peso de la composición total. El uso de conservantes asegura que, si el producto se contamina microbianamente, la formulación impedirá o disminuirá el crecimiento del microorganismo. Algunos conservantes útiles en esta invención incluyen alcohol bencilico, metilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, cloroxilenol, benzoato sódico, DMDM hidantoína, carbamato de 3-yodo-2-propilbutilo, sorbato de potasio, digluconato de clorhexidina, o una combinación de los mismos.

Los agentes o sustancias farmacéuticas para uso en todos los aspectos de la invención incluyen agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, agentes antivirales, agentes anestésicos locales, corticosteroides, agentes de terapia destructiva, antimicóticos y antiandrógenos. En el tratamiento del acné, los agentes farmacéuticos activos que se pueden usar incluyen agentes antimicrobianos, especialmente los que tienen propiedades antiinflamatorias, tales como dapsona, eritromicina, minociclina, tetraciclina, clindamicina y otros agentes antimicrobianos. Los porcentajes en peso preferidos de los antimicrobianos son de 0,5 % a 10 %.

Los anestésicos locales incluyen tetracaína, clorhidrato de tetracaína, lidocaína, clorhidrato de lidocaína, diclonina, clorhidrato de diclonina, clorhidrato de dimetisoquín, dibucaína, clorhidrato de dibucaína, butambenpicrato y clorhidrato de pramoxina. Una concentración preferida de anestésicos locales es de 0,025 % a 5 % en peso de la composición total. También se pueden usar anestésicos como benzocaína, a una concentración preferida de aproximadamente 2 % a 25 % en peso.

Los corticosteroides que se pueden usar incluyen dipropionato de betametasona, fluocinolona actinida, valerato de betametasona, triamcinolona actinida, propionato de clobetasol, desoximetasona, diacetato de diflorasona, amcinonida, flurandrenolida, valerato de hidrocortisona, y butirato de hidrocortisona, y desonida; se recomiendan a concentraciones de aproximadamente 0,01 % a 1,0 % en peso. Las concentraciones preferidas de corticosteroides como hidrocortisona o acetato de metilprednisolona son de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 5,0 % en peso.

Adicionalmente, la composición terapéutica puede comprender otras enzimas, tales como la enzima lisostafina, para el tratamiento de cualquier bacteria de *Staphylococcus aureus* presente junto con las bacterias gram positivas susceptibles. Se ha sugerido que péptidos mucolíticos tales como lisostafina son eficaces en el tratamiento de infecciones de *S. aureus* en humanos (Schaffner y col., Yale J. Biol. & Med., 39:230 (1967). La lisostafina, un producto génico de *Staphylococcus simulans*, ejerce un efecto bacteriostático y bactericida sobre *S. aureus* degradando enzimáticamente las retículas de poliglicina de la pared celular (Browder y col., Res. Comm., 19: 393-400 (1965)). La patente de EE. UU. con n.º 3.278.378 describe procedimientos de fermentación para producir lisostafina a partir de medio de cultivo de *S. staphylolyticus*, más tarde renombrada *S. simulans*. Otros procedimientos para producir lisostafina se describen adicionalmente en las patentes de EE. UU. n.º 3.398.056 y n.º 3.594.284. El gen de lisostafina se clonó y secuenció subsiguientemente (Recsei y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 1127-1131 (1987)). La proteína bactericida mucolítica recombinante, tal como r-lisostafina, puede superar potencialmente los problemas asociados con la terapia de antibiótico actual debido a su especificidad dirigida, baja toxicidad y posible reducción de residuos biológicamente activos. Además, la lisostafina también es activa contra células que no están en división, mientras que la mayoría de antibióticos requieren células que se dividen activamente para mediar sus efectos [Dixon y col., Yale J. Biology and Medicine, 41: 62-68 (1968)]. La lisostafina, en combinación con la enzima lítica alterada, pueden usarse en presencia o ausencia de antibióticos. Existe un grado de importancia añadida en el uso tanto de lisostafina como de la enzima lisina en el mismo agente terapéutico. Frecuentemente, cuando un humano tiene una infección bacteriana, la infección de un género de bacterias debilita al cuerpo humano o cambia la flora bacteriana del cuerpo, permitiendo que otras bacterias potencialmente patógenas infecten el cuerpo. Una de las bacterias que algunas veces infecta conjuntamente el cuerpo es *Staphylococcus aureus*. Muchas cepas de *Staphylococcus aureus* producen penicilinasa, de tal manera que *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y otras cepas bacterianas gram positivas no serán destruidas con los antibióticos estándares. Consecuentemente, el uso de la lisina y lisostafina, posiblemente en combinación con antibióticos, puede servir como el tratamiento más rápido y efectivo en las infecciones bacterianas. Una composición terapéutica también puede incluir mutanolisina y lisozima. Una composición antibacteriana o terapéutica puede comprender combinaciones de péptidos líticos diméricos, tales como combinaciones de dímero Cpl-1 y dímero Pal.

Los medios de aplicación de la composición terapéutica que comprende una enzima/polipéptido lítico dimérico incluyen, pero sin limitación, medios directos, indirectos, de vehículo, y especiales, o cualquier combinación de los medios. La aplicación directa de la enzima/polipéptido lítico dimérico puede ser mediante cualquier procedimiento adecuado para llevar directamente el polipéptido en contacto con el sitio de infección o colonización bacteriana, tal como el área nasal (por ejemplo, aerosoles nasales), aplicaciones dérmicas o cutáneas (por ejemplo ungüentos o formulaciones tópicas), 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 utilizando pastillas para la garganta, enjuagues bucales o gargarismos, o utilizando ungüentos aplicables en las fosas nasales o la cara, o cualquier combinación de estos procedimientos de aplicación y otros similares. Las formas en las que la enzima lítica dimérica se puede administrar incluyen, pero sin limitación, pastillas, pastillas disolubles, caramelos, inyectables, gomas de mascar, comprimidos, polvos, líquidos pulverizados, líquidos, ungüentos y aerosoles.

Cuando la enzima/polipéptido lítico dimérico se introduce directamente utilizando aerosoles, gotas, ungüentos, lavados, inyecciones, taponamientos e inhaladores, preferentemente la enzima está en un medio líquido o gel, con el líquido actuando como el vehículo. Una versión anhidra seca de la enzima alterada se puede administrar por medio del inhalador y aerosol bronquial, aunque se prefiere una forma líquida de administración.

Una composición que comprende una enzima/polipéptido lítico dimérico se puede administrar en forma de un caramelo, goma de mascar, pastilla, pastilla que se disuelve, comprimido, polvo, aerosol, líquido, aerosol líquido o pasta de dientes, para la prevención o tratamiento de infecciones bacterianas asociadas con enfermedades del aparato respiratorio superior. La pastilla, comprimido o goma de mascar en la que se agrega la enzima/polipéptido lítico dimérico puede contener azúcar, jarabe de maíz, una variedad de colorantes, edulcorantes diferentes del azúcar, saborizantes, cualquier aglutinante, o combinaciones de los mismos. Similarmente, cualquier producto basado en goma de mascar puede contener acacia, cera carnauba, ácido cítrico, almidón de maíz, colorantes de alimentos, saborizantes, edulcorantes diferentes del azúcar, gelatina, glucosa, glicerina, base de goma, goma laca, sacarina de sodio, azúcar, agua, cera blanca, celulosa, otros aglutinantes, y combinaciones de los mismos. Las pastillas pueden contener también sacarosa, almidón de maíz, acacia, goma de tragacanto, anetol, aceite de linaza, oleoresina, aceite mineral y celulosa, otros aglutinantes y combinaciones de los mismos. También se pueden usar sustitutos de azúcar en lugar de dextrosa, sacarosa, u otros azúcares.

Las composiciones que comprenden las enzimas líticas diméricas o sus fragmentos de péptido dimérico se pueden

dirigir al revestimiento de la mucosa en donde, en residencia, destruirán las bacterias colonizadoras de la enfermedad. El revestimiento de la mucosa, como se divulga y describe en el presente documento, incluye por ejemplo el aparato respiratorio superior e inferior, el ojo, la cavidad bucal, la nariz, recto, vagina, cavidad periodontal, intestinos y colon. Debido a los mecanismos naturales de eliminación o limpieza de los tejidos mucosales, las formas de dosis convencionales no son retenidas en el sitio de aplicación durante un tiempo significativo.

Puede ser conveniente tener materiales que exhiban adhesión a los tejidos mucosales, para ser administrados con una o más enzimas de fago y otros agentes complementarios durante un tiempo. Los materiales que tienen capacidad de liberación controlada son particularmente convenientes, y el uso de mucoadhesivos de liberación sostenida ha recibido una atención considerable. J. R. Robinson (la patente de EE. UU. con n.º 4.615.697) ofrece una buena revisión de las diversas composiciones poliméricas de liberación controlada usadas en el suministro mucosal de fármacos. La patente describe una composición para tratamiento de liberación controlada que incluye un bioadhesivo y una cantidad efectiva de agente de tratamiento. El bioadhesivo es un polímero reticulado, carboxi-funcional, fibroso, hinchable en agua pero insoluble en la misma, que contiene (a) una pluralidad de unidades repetidas de las cuales por lo menos aproximadamente el 80 por ciento contienen al menos una funcionalidad carboxilo, y (b) aproximadamente del 0,05 a aproximadamente el 1,5 por ciento de agente de reticulación sustancialmente libre de poliéter de polialqueno. Aunque los polímeros de Robinson son hinchables pero insolubles en agua, están reticulados, no son termoplásticos y no son fáciles de formular con agentes activos y en las diversas formas de dosis como los sistemas de copolímero de la presente solicitud. También se pueden usar micelas y micelas multilaminares para controlar la liberación de la enzima.

Se conocen otras propuestas que incluyen mucoadhesivos que son la combinación de materiales hidrófilos e hidrófobos. Orahesive^{RTM} de E.R. Squibb & Co es un adhesivo formado por una combinación de pectina, gelatina y carboximetilcelulosa de sodio en un polímero de hidrocarburo viscoso, para adherirse a la mucosa oral. Sin embargo, estas mezclas físicas de componentes hidrófilos e hidrófobos finalmente se separan. En contraste, los dominios hidrófilo e hidrófobo en esta solicitud producen un copolímero insoluble. La patente de EE. UU. con n.º 4.948.580 describe un sistema de suministro oral de fármaco de bioadhesivo. La composición incluye una mezcla de polímero liofilizada formada del copolímero poli(éter metilvinílico/anhídrido maleico) y gelatina, disperso en una base de ungüento como aceite mineral que contiene polietileno disperso. La patente de EE. UU. con n.º 5.413.792 describe preparaciones de tipo pasta que comprenden (A) una base de tipo pasta que comprende un poliorganosiloxano y un material polimérico soluble en agua, que está presente preferentemente en una relación en peso de 3:6 a 6:3, y (B) un ingrediente activo. La patente de EE. UU. con n.º 5.554.380 reivindica un sistema de suministro de fármaco semisólido bioadherente, ingerible oralmente, que contiene un sistema de agua en aceite que tiene por lo menos dos fases. Una fase comprende de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 75 % en volumen de una fase hidrófila interna, y la otra fase comprende de aproximadamente el 23 % a aproximadamente el 75 % en volumen de una fase hidrófoba externa, donde la fase hidrófoba externa está comprendida de tres componentes: (a) un emulsionante, (b) un éster de glicérido, y (c) un material de cera. La patente de EE. UU. con n.º 5.942.243 describe algunos materiales de liberación representativos útiles para administrar agentes antibacterianos.

Las composiciones terapéuticas o farmacéuticas también pueden contener mucoadhesivos poliméricos que incluyen un copolímero de injerto, que comprende una cadena principal hidrófila y cadenas de injerto hidrófobas para la liberación controlada de agentes biológicamente activos. El copolímero de injerto es un producto de reacción de (1) un macromonómero de poliestireno que tiene un grupo funcional etilénicamente insaturado, y (2) por lo menos un monómero de ácido hidrófilo que tiene un grupo funcional etilénicamente insaturado. La cadena de injerto consiste esencialmente en poliestireno, y la cadena de polímero principal de restos monoméricos hidrófilos, algunos de los cuales tienen funcionalidad ácida. El porcentaje en peso del macromonómero de poliestireno en el copolímero de injerto es entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 20 %, y el porcentaje en peso del total de monómero hidrófilo en el copolímero de injerto es entre el 80 % y el 99 %, y donde por lo menos el 10 % de dicho total de monómero hidrófilo es ácido, dicho copolímero de injerto cuando está completamente hidratado tiene un contenido de agua en equilibrio de por lo menos el 90 %. Las composiciones que contienen los copolímeros se hidratan gradualmente por sorción de fluidos de tejido en el sitio de la aplicación para producir una masa de tipo gelatina muy suave que exhibe adhesión a la superficie de la mucosa. Durante el periodo en que la composición se adhiere a la superficie de la mucosa, provee la liberación sostenida del agente farmacológicamente activo, que es absorbido por el tejido mucosal.

Las composiciones de esta solicitud pueden contener opcionalmente otros materiales poliméricos, tales como plastificantes de poli(ácido acrílico), poli(vinilpirrolidona), y plastificantes de carboximetilcelulosa de sodio, y otros excipientes farmacéuticamente aceptables en cantidades que no causan efecto nocivo sobre la mucoadhesividad de la composición.

60

Las formas de dosis de las composiciones de esta invención se pueden preparar mediante los procedimientos convencionales. En los casos en donde la inyección intramuscular es el modo de administración elegido, preferentemente se usa una formulación isotónica. Generalmente, los aditivos de isotonicidad pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En algunos casos, se prefieren soluciones isotónicas como solución salina tamponada de fosfato. Los estabilizadores incluyen gelatina y albúmina. Se puede agregar un agente de vasoconstricción a la formulación. Las preparaciones farmacéuticas de acuerdo con esta solicitud se proveen estériles y libres de pirógenos.

Una enzima/polipéptido lítico dimérico de la invención también se puede administrar por vía parenteral. Por ejemplo, la enzima/polipéptido lítico dimérico se puede administrar por vía intramuscular, intratecal, subdérmica, subcutánea o intravenosa para tratar infecciones por bacterias gram positivas. En los casos en donde la inyección parenteral es el modo de administración elegido, preferentemente se usa una formulación isotónica. Generalmente, los aditivos de isotonicidad pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En algunos casos, se prefieren soluciones isotónicas como solución salina tamponada de fosfato. Los estabilizadores incluyen gelatina y albúmina. Se puede agregar un agente de vasoconstricción a la formulación. Las preparaciones farmacéuticas de acuerdo con esta solicitud se proveen estériles y libres de pirógenos.

Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz se puede calcular inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos de animal, normalmente ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal también se usa para obtener una escala de concentración y vía de administración convenientes. Esta información se puede usar para determinar las dosis y vías de administración útiles para los humanos. La dosis exacta es elegida por el médico individual en vista del paciente a tratar. La dosis y la administración se ajustan para proporcionar suficientes niveles del resto activo o para mantener el efecto deseado. Factores adicionales que se pueden tener en cuenta incluyen la gravedad del estado patológico, la edad, peso y género del paciente; la dieta, duración deseada del tratamiento, procedimiento de administración, tiempo y frecuencia de administración, la combinación de fármacos, la sensibilidad 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 vida media y la velocidad de eliminación de la formulación particular.

Las escalas o cantidades de dosis eficaces de la enzima/polipéptido lítico dimérico por administrar parenteralmente, 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 que están infectados, la profundidad de la infección y una variedad de otras variables. La composición se puede aplicar en cualquier parte, desde una a varias veces al día, y se puede aplicar durante un periodo corto o largo. El uso puede durar días o semanas. Cualquier forma de dosis utilizada debe proveer un número mínimo de unidades para una cantidad mínima de tiempo. Se cree que la concentración de las unidades activas de enzimas provee una cantidad o dosis eficaz de enzimas que puede seleccionarse según sea apropiado. La cantidad de unidades activas por ml y la duración del tiempo de exposición dependen de la naturaleza de la infección y la cantidad de contacto que el vehículo le permite a la enzima/polipéptido lítico.

Procedimientos y ensayos

La capacidad de destrucción bacteriana y, de hecho, la estabilidad significativamente mejorada, así como la disminución de la eliminación en plasma exhibida por los polipéptidos de lisina de la invención, proveen varios procedimientos basados en la eficiencia antibacteriana de los polipéptidos de la invención. De esta manera, la presente invención contempla procedimientos antibacterianos que incluyen la lisina de la invención para su uso en procedimientos para destruir bacterias gram positivas, para reducir una población de bacterias gram positivas, para tratar o aliviar una infección bacteriana, para tratar a un sujeto humano expuesto a una bacteria patógena, y para tratar a un sujeto humano en riesgo de dicha exposición. Las bacterias susceptibles pueden rápidamente ser determinadas o confirmadas por el experto en la materia, demostrándose también aquí que se incluyen las bacterias de las que derivan originalmente las enzimas de fago de la invención, *Streptococcus pneumoniae*, así como también otras cepas bacterianas estreptococas. También se describe la lisina de la invención para uso en procedimientos para tratar diversas afecciones, lo que incluye procedimientos de tratamientos profilácticos de infecciones de estreptococos, tratamientos de infecciones de estreptococos, reduciendo la población o el transporte de estreptococos, tratando infecciones del aparato respiratorio inferior, tratando infecciones de oídos, tratando otitis media, tratando endocarditis, y mediante el tratamiento o la prevención de otras afecciones o infecciones sistémicas o locales.

En un aspecto de la descripción, esta invención también puede usarse para tratar la septicemia, particularmente en humanos. Para el tratamiento de una infección septicémica, tal como neumonía o meningitis bacteriana, debe haber

un flujo intravenoso continuo del agente terapéutico en la corriente sanguínea. La concentración de las enzimas para el tratamiento de septicemia depende del conteo bacteriano en la sangre y del volumen de la sangre.

También se describe al menos una enzima/polipéptido lítico dimérico de la invención para uso en un procedimiento para tratar una infección, transporte o población de estreptococos, en particular una lisina Cpl-1 dimérica que se incluye como se describe particularmente en este documento. Más específicamente, la enzima/polipéptido lítico dimérico, capaz de lisar la pared celular de cepas bacterianas de estreptococos, es producida del material genético de un bacteriófago específico para *Streptococcus* o de uno o más plásmidos, vectores, u otros medios recombinantes. En un aspecto de la descripción, los polipéptidos de lisina diméricos de la presente invención, que incluyen lisina dimérica Cpl-1, son útiles y productivos en procedimientos profilácticos y de tratamiento dirigidos contra bacterias gram positivas, particularmente en infecciones o colonización bacteriana de estreptococos. Las cepas de bacterias susceptibles y relevantes como objetivos de los procedimientos de la invención, incluyen y pueden seleccionarse de entre *Streptococcus suis*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus agalactiae* (GBS), *Streptococcus pyogenes* (GAS), *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus* GES y *Streptococcus pneumoniae*.

La descripción incluye la lisina de la invención para uso en procedimientos de descolonización, tratamiento o alivio de infecciones o afecciones relacionadas con estreptococos, que incluyen bacterias resistentes a antibióticos, donde la bacteria o un sujeto humano infectado o expuesto a la bacteria particular, o en sospecha de haber estado expuesto o en riesgo, se pone en contacto con, o se le administra, una cantidad del polipéptido de lisina aislado de la invención, eficaz para destruir la bacteria particular. De esta manera, una o más Cpl-1 diméricas, que incluyen dichos polipéptidos tal como se provee aquí en la Figura 6 y la Tabla 1, y en la SEQ ID NO: 3, se ponen en contacto o se administran para ser eficaces para destruir las bacterias relevantes, descolonizar las bacterias relevantes, o aliviar de otra manera o bien tratar la infección bacteriana. En un aspecto adicional, una o más Pal diméricas, que incluyen dichos polipéptidos se proveen aquí y en la Figura 7 y la SEQ ID NO: 6, se ponen en contacto o se administran para ser eficaces para destruir las bacterias relevantes o aliviar de otra manera o bien tratar la infección bacteriana.

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

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

El término 'ensayo' significa cualquier proceso usado para medir una propiedad específica de un compuesto. Un 'ensayo de cribado' significa un proceso usado para caracterizar o seleccionar compuestos de una biblioteca de compuestos, basándose en su actividad.

El término 'prevenir' o 'prevención' se refiere a una reducción del riesgo de adquirir o desarrollar una enfermedad o trastorno (es decir, que hace que por lo 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 inicio de la enfermedad.

El término 'profilaxis' está relacionado con el término 'prevención' y es abarcado por el mismo, y se refiere a una medida o procedimiento cuyo propósito es prevenir, en lugar de tratar o curar una enfermedad. Ejemplos no limitativos de medidas profilácticas pueden incluir la administración de vacunas; la administración de heparina de peso molecular bajo en pacientes de hospital en riesgo de trombosis debido a, por ejemplo, inmovilización; y la administración de un agente contra la malaria tal como cloroquina, con antelación a una visita a una región geográfica en donde la malaria sea endémica, o el riesgo de contraer la malaria sea alto.

'Cantidad terapéuticamente efectiva' significa aquella cantidad de un fármaco, compuesto, agente antimicrobiano, anticuerpo, polipéptido o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o médica de un sujeto que es buscada por un doctor especialista u otro médico. En particular, con respecto a infecciones bacterianas gram positivas y el crecimiento de bacterias gram positivas, el término 'cantidad efectiva' incluye una cantidad efectiva de un compuesto o agente que produce una disminución biológicamente significativa de la cantidad o magnitud de infección de bacterias gram positivas, que incluye un efecto bactericida y/o bacteriostático. La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva", se usa aquí para indicar una cantidad suficiente para prevenir, y preferentemente reducir por lo menos aproximadamente el 30 por ciento, más preferentemente por lo menos el 50 por ciento, con la máxima preferencia por lo menos el 90 por ciento un cambio clínicamente significativo en el crecimiento o cantidad de

bacterias infecciosas, u otra característica de patología tal como, por ejemplo, fiebre elevada o conteo de leucocitos que puedan acompañar a su presencia y actividad.

5 El término 'tratar' o 'tratamiento' de cualquier enfermedad o infección se refiere, en un aspecto, a mitigar la enfermedad o infección (es decir, detener la enfermedad o crecimiento del agente infeccioso o bacterias o reducir la manifestación, extensión o gravedad de por lo menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otro aspecto, 'tratar' o 'tratamiento' se refiere a mejorar por lo menos un parámetro físico, que puede no ser discernible por el sujeto. En todavía otro aspecto, 'tratar' o 'tratamiento' se refiere a modular la enfermedad o infección, ya sea físicamente (p. ej., estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (p. ej., estabilización de un parámetro físico), o ambos. En aspecto adicional, 'tratar' o 'tratamiento' se refiere a retardar el avance de una enfermedad o reducir una infección.

15 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y normalmente no producen reacción secundaria alérgica o similar, tal como malestar gástrico, mareos, etc., cuando se administran a un humano.

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

20 Los términos "bacterias gram positivas", "gram positivas", y cualquier variante no mencionada específicamente, se pueden usar aquí indistintamente, y como se usa en toda la presente solicitud y las reivindicaciones, se refieren a bacterias gram positivas que son conocidas y/o pueden ser identificadas por la presencia de ciertas características en la pared celular y/o membrana celular y/o por tinción con colorante de Gram. Las bacterias gram positivas son conocidas y pueden ser identificadas fácilmente y se pueden seleccionar, pero sin limitación, de entre 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.

30 El término "bactericida" se refiere a la capacidad de destruir células bacterianas.

El término "bacteriostático" se refiere a la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano, que incluye inhibir el crecimiento de células bacterianas.

35 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y normalmente no producen reacción secundaria alérgica o similar, tal como malestar gástrico, mareos, etc., cuando se administran a un humano.

40 La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva", se usa aquí para indicar una cantidad suficiente para prevenir, y preferentemente reducir por lo menos aproximadamente el 30 por ciento, más preferentemente por lo menos el 50 por ciento, con la máxima preferencia por lo menos el 90 por ciento un cambio clínicamente significativo en la actividad de la fase S de una masa celular objetivo, u otra característica de patología tal como, por ejemplo, presión sanguínea elevada, fiebre o conteo de leucocitos que puedan acompañar a su presencia y actividad.

45 Las enfermedades o afecciones causadas por una infección de estreptococos (tales como las causadas por *Streptococcus pneumoniae*) pueden tratarse mediante la administración de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una lisina dimérica a un mamífero que padece de una enfermedad o afección. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección es bacteriemia, meningitis, neumonía, otitis media o sinusitis.

50 La descripción proporciona la lisina de la invención para uso en un procedimiento para tratar infecciones bacterianas de tejidos o sistémicas causadas por la bacteria *Streptococcus*, que comprende el tratamiento parenteral de la infección con un agente terapéutico que comprende una cantidad efectiva de uno o más polipéptidos de lisina dimérica de la invención, particularmente Cpl-1 dimérica que incluye dichos polipéptidos como se provee en el presente documento en la Figura 6 y en la Tabla 1, y/o una Pal dimérica que incluye polipéptidos como se provee en el presente documento en la Figura 7 y la SEQ ID NO: 6, y un vehículo apropiado. Un número de otros procedimientos diferentes puede usarse para introducir las/los enzimas/polipéptidos líticos/as diméricos/as. Estos procedimientos incluyen introducir las/los enzimas/polipéptidos líticos/as diméricos/as por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratecal y subdérmica. El experto en la materia, que incluye el personal médico, será capaz de evaluar y reconocer el modo o medio de administración más apropiado y los polipéptidos que serían más beneficiosos para el tratamiento de meningitis bacteriana.

60

Las infecciones también se pueden tratar inyectando en el tejido infectado del paciente humano un agente terapéutico que comprende la enzima/polipéptido lítico dimérico apropiado y un vehículo para la enzima. El vehículo puede estar comprendido de agua destilada, solución salina, albúmina, un suero, o cualquier combinación de los mismos. Más específicamente, se pueden preparar soluciones para infusión o inyección de la manera convencional, p. ej., agregando conservantes tales como p-hidroxibenzoatos, o estabilizadores tales como sales de metal alcalino de ácido etilendiaminotetraacético, y luego pueden ser transferidas a recipientes de fusión, viales de inyección o ampollas. Alternativamente, el compuesto para inyección se puede liofilizar con o sin los otros ingredientes, y se puede solubilizar en una solución tamponada o agua destilada, según sea apropiado, en el momento de uso. Vehículos no acuosos tales como aceites fijos, liposomas y oleato de etilo también son útiles en el presente documento. Se pueden incluir en la composición otras enzimas líticas asociadas a fago junto con una proteína holina.

La lisina de la invención tal como Cpl-1 dimérica o lisina Pal dimérica, o combinaciones de las mismas que se ejemplifican aquí, pueden ser usadas en varios procedimientos de tratamiento como un tratamiento profiláctico para eliminar o reducir el transporte de bacterias susceptibles, impidiendo que enfermen los humanos que han estado expuestos a otros que tienen los síntomas de una infección, o como un tratamiento terapéutico para aquellos que estuvieran ya enfermos por la infección. Similarmente, las enzimas/polipéptidos líticos diméricos se pueden usar para tratar o aliviar, por ejemplo, enfermedades del aparato respiratorio inferior, particularmente utilizando aerosoles bronquiales o mediante administración intravenosa de la enzima. Por ejemplo, se puede usar una enzima lítica para el tratamiento profiláctico y terapéutico de infecciones del ojo, tales como conjuntivitis. El procedimiento de tratamiento, tal como se describe, comprende administrar gotas oftálmicas o un lavado oftálmico que comprende una cantidad efectiva de por lo menos un polipéptido lítico de la invención y un vehículo capaz de ser aplicado con seguridad al ojo, el vehículo conteniendo las enzimas líticas. Las gotas oftálmicas o lavado oftálmico preferentemente están en forma de una solución isotónica. El pH de la solución se debe ajustar de tal manera que no haya irritación del ojo, que a su vez resultaría en posible infección con otros organismos y posible daño en el ojo. Mientras que la escala de pH sería la misma escala que para otras enzimas líticas, el pH óptimo estará en la escala que se muestra y provee en el presente documento. Similarmente, también se pueden usar tampones de la clase anteriormente descrita para otras enzimas líticas. Otros antibióticos que son adecuados para usarse en gotas oftálmicas se pueden agregar a la composición que contiene las enzimas. También se pueden agregar bactericidas y bacteriostáticos. La concentración de la(s) enzima(s) en la solución puede estar en la escala de aproximadamente 100 unidades/ml a aproximadamente 500.000 unidades/ml, con una escala más preferida de aproximadamente 100 a aproximadamente 5.000 unidades/ml, y de aproximadamente 100 a aproximadamente 50.000 unidades/ml. Las concentraciones pueden ser más altas o más bajas que las escalas provistas.

Los polipéptidos líticos diméricos de la invención también se pueden usar en una solución de lentes de contacto, para el enjuague y limpieza de las lentes de contacto. Esta solución, que normalmente es una solución isotónica, puede contener, además de la enzima, cloruro de sodio, manitol y otros alcoholes de azúcar, borato, conservantes y similares. Una enzima/polipéptido lítico de la invención también se puede administrar en el oído de un paciente. De esta manera, por ejemplo, un polipéptido lítico dimérico de la invención se puede usar para tratar infecciones del oído, por ejemplo causadas por *Streptococcus pneumoniae*. La otitis media es una inflamación del oído medio caracterizada por síntomas tales como otalgia, pérdida auditiva y fiebre. Una de las causas principales de estos síntomas es una acumulación de fluido (efusión) en el oído medio. Las complicaciones incluyen pérdida de audición permanente, perforación de la membrana timpánica, colesteatoma adquirido, mastoiditis y otitis adhesiva. Los niños que desarrollan otitis media en los primeros años de su vida están en riesgo de enfermedad aguda o crónica recurrente. Una de las causas principales de la otitis media es *Streptococcus pneumoniae*. La enzima/polipéptido lítico se puede aplicar a un oído infectado suministrando la enzima en un vehículo apropiado al canal auditivo. El vehículo puede comprender soluciones o suspensiones acuosas u oleosas estériles. La enzima lítica se puede agregar al vehículo, que también puede contener conservantes adecuados y preferentemente un agente tensioactivo. Los agentes bactericidas y fungicidas incluidos preferentemente en las gotas son nitrato o acetato fenilmercúrico (0,002 %), cloruro de benzalconio (0,01 %) y acetato de clorhexidina (0,01 %). Los disolventes adecuados para la preparación de una solución oleosa incluyen glicerol, alcohol diluido y propilenglicol. Adicionalmente se puede usar cualquiera de varios vehículos para gotas óticas. Las concentraciones y conservantes usados para el tratamiento de la otitis media y otras infecciones óticas similares son las mismas mencionadas para infecciones del ojo, y el vehículo en el que va la enzima es similar o idéntico a los vehículos para el tratamiento de las infecciones del ojo. Adicionalmente, el vehículo incluye normalmente vitaminas, minerales, carbohidratos, azúcares, aminoácidos, materiales proteínicos, ácidos grasos, fosfolípidos, antioxidantes, compuestos fenólicos, soluciones isotónicas, soluciones basadas en aceite, suspensiones basadas en aceite, y combinaciones de los mismos.

Las posibilidades y aplicaciones diagnósticas, profilácticas y terapéuticas que surgen por el reconocimiento y

generación de los polipéptidos de lisina diméricos de la invención derivan del hecho de que los polipéptidos de la invención causan efectos directos y específicos (p. ej., destrucción) en bacterias susceptibles. De esta manera, los polipéptidos de la invención se pueden usar para eliminar, caracterizar o identificar las bacterias relevantes y susceptibles.

5

De esta manera, también se describe la lisina de la invención para uso en un procedimiento diagnóstico en donde el procedimiento diagnóstico puede comprender examinar una muestra o medio celular con la finalidad de determinar si contiene bacterias susceptibles, o si las bacterias de la muestra o medio son susceptibles, por medio de un ensayo que incluye una cantidad efectiva de uno o más polipéptidos de lisina diméricos y medios para caracterizar una o más células en la muestra, o para determinar si ha ocurrido o está ocurriendo o no lisis celular. Los pacientes susceptibles de beneficiarse de este procedimiento incluyen los que padecen una infección no determinada, una infección bacteriana reconocida, o con sospecha de exposición o transporte de una bacteria particular. Un fluido, alimento, dispositivo médico, composición u otra de tales muestras que estará en contacto con un sujeto o paciente, se puede examinar para detectar bacterias susceptibles, o bien puede ser limpiado de las bacterias relevantes. En uno de tales aspectos, un fluido, alimento, dispositivo médico, composición u otra de esta clase de muestras se puede esterilizar o tratar de otra manera para eliminar o quitar cualquier bacteria relevante potencial por incubación o exposición a uno o más polipéptidos líticos de la invención.

Los procedimientos y su aplicación son familiares para los expertos en la materia y se pueden utilizar consecuentemente dentro del alcance de la presente invención. En un aspecto, los polipéptidos líticos de la invención forman complejos o se unen o se asocian de otra manera con bacterias relevantes o susceptibles en una muestra, y un miembro del complejo se marca con una marca detectable. El hecho de que se haya formado un complejo y, si se desea, la cantidad del mismo puede determinarse mediante los procedimientos conocidos y aplicables a la detección de marcas. Las marcas utilizadas más comúnmente para estos estudios son elementos radioactivos, enzimas, sustancias químicas que son fluorescentes cuando se exponen a la luz ultravioleta, y otros. Se conocen varios materiales fluorescentes y se pueden utilizar como marcas. Estos incluyen, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, auramina, rojo de Texas, azul AMCA y amarillo Lucifer. La marca radioactiva puede ser detectada mediante cualquiera de los procedimientos de conteo actualmente disponibles. El isótopo preferido se puede seleccionar de ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , y ^{186}Re . Similarmente son útiles las marcas de enzima y pueden ser detectadas mediante cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas, amperométricas o gasométricas actualmente utilizadas. La enzima se conjuga con la partícula seleccionada por reacción con moléculas de formación de puente, tales como carbodiimidas, diisocianatos, glutaraldehído, y similares. Muchas enzimas que se pueden usar en estos procedimientos son conocidas y se pueden utilizar. Las preferidas son peroxidasa, β -glucuronidasa, β -D-glucosidasa, β -D-galactosidasa, ureasa, glucosa oxidasa más peroxidasa y fosfatasa alcalina. Las patentes de EE. UU. con n.^{os} 3.654.090; 3.850.752; y 4.016.043 son referidas a manera de ejemplo por su descripción de materiales y procedimientos de marcación alternativos.

La invención se puede entender mejor haciendo referencia a los siguientes ejemplos, no limitativos, que se proporcionan como ejemplares de la invención. Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención, y de ninguna manera se deben considerar, sin embargo, como limitativos del amplio alcance de la invención.

EJEMPLO 1

45

DÍMERO (Cpl-1) DE LISINA DE FAGO ESTABLE CON ACTIVIDAD ANTI-NEUMOCÓCICA AUMENTADA

Los bacteriófagos (fagos) producen endolisinas (lisinas) como parte de su ciclo lítico para degradar la capa de peptidoglucano de las bacterias infectadas con el fin de liberar la progenie de fago. Debido a que estas enzimas mantienen su actividad letal y lítica contra las bacterias gram positivas cuando son añadidas extrínsecamente a las células, dichas enzimas han sido explotadas activamente como novedosos antiinfecciosos y a veces denominados enzibióticos. Como otros relativamente pequeños péptidos, un problema en su desarrollo clínico ha resultado ser su rápida inactivación a través de degradación proteolítica, bloqueo intestinal, o eliminación renal. La lisina Cpl-1 antineumocócica ha demostrado escapar tanto a la proteólisis como al bloqueo inmunológico. Sin embargo, su corta vida media en plasma (20,5 min en ratones) puede representar un inconveniente para su utilidad clínica. Aquí presentamos la construcción de un dímero de Cpl-1 en vista del aumento tanto de la actividad antineumocócica como de la vida media en plasma de Cpl-1. La dimerización se ha logrado mediante la introducción de residuos de cisteína específicos en el extremo C-terminal de la enzima, favoreciendo, de este modo, el enlace disulfido. En comparación a los monómeros nativos, el dímero construido demostró un incremento del doble en la actividad antineumocócica específica y, además, casi 10 veces más de aumento en la vida media en plasma (es decir, 0,028

60

frente a $0,27 \text{ ml/min}^{-1}$). Como varias lisinas son sospechosas de dimerizar en contacto con sus sustratos de pared celular para resultar totalmente activas, las enzimas pre-dimerizadas estables pueden representar una alternativa más eficiente frente al monómero nativo.

- 5 El *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) es un diplococo encapsulado gram positivo responsable de una amplia variedad de infecciones en humanos. Es la primera causa de otitis media y afecta a más de 5 millones de niños cada año en EE. UU. (4), siendo también una causa común de sinusitis, neumonía extrahospitalaria, bacteriemia y meningitis (13). Es responsable de más de 1 millón de muertes al año entre los niños menores de 5 años a nivel mundial (5), permaneciendo, la neumonía neumocócica, como la sexta causa más común de muerte en
- 10 EE. UU. y en todos los grupos de edad (8). Es también el patógeno bacteriano principal responsable de superinfección tras la infección respiratoria de la gripe A, una complicación responsable de más del 90 % de muertes durante las pandemias de gripe (2, 3, 20, 21).

Las infecciones neumocócicas son normalmente tratadas con antibióticos. Sin embargo, su abuso en el tratamiento

15 de millones de casos leves de otitis y sinusitis, en su mayoría de origen viral, ha planteado una gran presión en la selección de resistencia a fármacos (11). Por ello, en la actualidad se ha informado extensamente de fracasos en tratamientos bacteriológicamente confirmados, debido a un aumento en la resistencia a numerosos tipos de fármacos, que incluyen los comúnmente usados beta-lactámicos, macrólidos y fluoroquinolonas (19, 23). Así, se hacen muy necesarios nuevos fármacos que actúen mediante mecanismos totalmente diferentes.

20 Los fagos, que constituyen el principal depredador de las bacterias por naturaleza, fueron considerados como agentes antibacterianos potenciales décadas antes del desarrollo de los antibióticos (28, 29). No obstante, la complejidad en el desarrollo de los fagos nativos para los productos industriales susceptibles, llevó a los países occidentales a abandonar su desarrollo a partir de los años 40 del siglo pasado. En la actualidad, sin embargo, la

25 problemática expansión de la resistencia a antibióticos justifica un renovado interés en la contribución de moléculas derivadas de fagos como compuestos antibacterianos clínicamente útiles (9, 27).

Uno de estos tipos de compuestos, es decir, las lisinas de fago, ha sido explotado por su rápida acción destructiva de las bacterias gram positivas (1, 9). Las lisinas de fago son producidas oportunamente cuando la progenie del fago

30 necesita escapar del huésped bacteriano. El fago neumocócico Cp-1 produce la lisina Cpl-1, una enzima de 37 kDa que hidroliza específicamente peptidoglucano neumocócico. Esta lisina se construye como todas dichas endolisinas, ya que tienen dos dominios bien definidos y conectados por un conector flexible. La actividad catalítica se restringe al dominio del extremo N-terminal, mientras que la parte con extremo C-terminal, que contiene 6 repeticiones de unión a colina (ChBR) y una cola de extremo C-terminal de 13 aminoácidos, es necesaria para la unión a sustrato en

35 la pared celular neumocócica (10). La Cpl-1 pertenece a familia de las lisozimas que se dirigen a uniones β 1,4 entre ácido N-acetilmurámico y residuos N-acetil-D-glucosamina en el peptidoglucano (22). Nuestro laboratorio clonó el gen Cpl-1 en el vector de alta expresión pinIIIa logrando, después, su sobreexpresión y purificación (15). La Cpl-1 purificada trató con éxito sepsis neumocócica (14, 16), endocarditis (6), meningitis (12), y neumonía (31) en modelos de roedores. Sin embargo, esta Cpl-1 fue rápidamente eliminada de la sangre *in vivo*, y se necesitaron inyecciones

40 repetidas o se realizó infusión continua para optimizar la actividad en algunos modelos de la infección (6, 31). Esta corta vida media puede ser una deficiencia para el desarrollo clínico de la Cpl-1 y lisinas semejantes.

Para desarrollar una Cpl-1 más eficaz, aprovechamos los avances recientes sobre la dimerización de lisina. Para resultar totalmente activa, la principal autolisina neumocócica (LytA) necesita una dimerización previa, que se inicia

45 mediante la interacción de sus dominios de unión a colina del extremo C-terminal con colina, llevando a la formación de un homodímero que es significativamente más activo que el monómero nativo (7, 26, 30). La alineación de la secuencia de Cpl-1 y LytA reveló amplias similitudes, especialmente dentro de la cola del extremo C-terminal de la enzima implicada en la dimerización. Así, se hipotetizó que la Cpl-1 puede tener el mismo requisito de dimerización que el de LytA para lograr total actividad. Además, la forma dimérica de Cpl-1 podría tener una disminución

50 significativa con la eliminación renal debido a que su peso molecular (74 kDa frente a 37 kDa para el monómero) es mayor de 60-65 kDa, el umbral para la filtración glomerular en humanos (18).

En este trabajo desarrollamos un homodímero de Cpl-1 estable unido al extremo C-terminal mediante un enlace disulfido, y examinamos su eliminación en plasma respecto a su actividad *in vitro* e *in vivo*, comparándolo con el

55 monómero parental. Los resultados proporcionan la base para mayores estudios de bioactividad en este tipo de dímero en modelos de infección.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

60 Reactivos

El kit de Minipreps de plásmido era de Qiagen (Valencia, EE. UU.), mientras que el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange II pertenecía a Stratagene (Cedar Creek, EE. UU.). La columna de nivel de preparación HiLoad 16/60 Superdex™ 200 de filtración de gel y DEAE-Sepharose fueron obtenidos de GE Healthcare Bio-Sciences Corporation (Piscataway, EE. UU.). Los cebadores mutagénicos fueron sintetizados por Fisher Scientific (Pittsburgh, EE. UU.). El resto de sustancias químicas se adquirieron de Sigma-Aldrich (Saint Louis, EE. UU.). El reactivo colorante Quick Start Bradford y los estándares de gamma globulina bovina (BGG) para las mediciones de concentración de proteínas provenían de Biorad (Hercules, EE. UU.). Los dispositivos ultracentrífugos Amicon se adquirieron de Millipore (Billerica, EE. UU.) mientras que los filtros de jeringa Acrodisc de 0,45 µm fueron adquiridos de Pall (Ann Arbor, EE. UU.).

Construcción de mutantes de Cpl-1

Todos los mutantes se construyeron usando el kit de mutagénesis dirigida a sitio QuickChange II con los cebadores apropiados para introducir las mutaciones deseadas, y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se verificó la presencia de mutaciones mediante la secuenciación de ADN realizada en Genewiz (South Plainfield, NJ, EE. UU.).

Producción y purificación de lisinas de Cpl-1 y de la mutante de Cpl-1

Los ADN de plásmido de clones seleccionados que llevaban los genes de Cpl-1 mutado y los de tipo silvestre fueron aislados para después transformarlos en la cepa DH5α de *E. coli* con el objetivo de sobreexpresar las proteínas correspondientes. La proteína de Cpl-1 de tipo silvestre se obtuvo a partir de la expresión de pJML6 en las células de *E. coli* de la cepa DH5α. La producción y purificación de las lisinas fue siguiente al procedimiento que se describe en otra parte (15). Brevemente, las cepas se desarrollaron durante una noche a 37 °C en Luria-Broth en agitación a 225 rpm. La expresión de la proteína se indujo en una noche con 20 g/l de lactosa. Después de la recolección y resuspensión en tampón de enzimas (tampón fosfato de 50 mM, y pH a 7,4), las células se sometieron a ondas sonoras en hielo (Sonopuls, Bandelin electronics, Berlín, Alemania). Los restos celulares se sedimentaron por centrifugación (15.000 rpm, durante 1 hora a 37 °C) y los sobrenadantes se trataron con 20 unidades (20U) de ADNasa I durante 1 hora a temperatura ambiente. Los sobrenadantes filtrados de 0,45 µm se aplicaron a una columna de flujo rápido DEAE-Sepharose previamente equilibrada con tampón de enzimas. Después de la fase de lavado con tampón de enzimas que contenía NaCl 1M, las enzimas se eluyeron con tampón de enzimas que contenía un 10 % de colina. Después de una amplia diálisis (MWCO entre 12-14.000) en tampón de enzimas, las enzimas purificadas se liofilizaron y almacenaron a -20 °C.

35 Aislamiento de los dímeros mutantes de Cpl-1

Todos los dímeros fueron además aislados en una columna Hiloal 16/60 Superdex conectada al aparato AKTA Prime (GE Healthcare Bio-Sciences Corporation, Piscataway, EE. UU.). Brevemente, para cada mutante, la mezcla de monómeros y dímeros obtenida espontáneamente después de la sobreexpresión, mediante inducción de lactosa (ver anteriormente), fue aplicada a 1 ml/min a la columna equilibrada previamente con tampón de enzimas. Las fracciones que contenían los dímeros fueron agrupadas y concentradas con unidades de filtro ultracentrífugo Amicon (MWCO de 30.000, Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se realizó una segunda etapa de purificación en la Hiloal 16/60 Superdex con la muestra concentrada. Las fracciones finales que contenían los dímeros fueron agrupadas, concentradas a 1 mg/ml, y almacenadas a -20°C hasta uso posterior.

45

Ensayo de destrucción *in vitro*

El ensayo de destrucción se realizó usando la cepa DCC1490 de *S. pneumoniae*, habiéndose descrito en otra parte (17). Brevemente, la DCC1490 se desarrolló hasta una fase de crecimiento logarítmico (DO_{595nm} de 0,3) en Brain Heart Infusion (BHI). Después de la centrifugación y resuspensión de las células en el tampón de enzimas a una concentración de aproximadamente 10^9 UFC/ml, se añadieron directamente las diluciones en serie de lisinas a la suspensión bacteriana (concentración final de aproximadamente $5,10^8$ UFC/ml) en placas de 96 pocillos. La cinética de reacción se obtuvo con la medición de la DO_{595nm} a 37 °C durante un período de 15 minutos con un lector de placas de 96 pocillos EL808 (Biotek Instruments, Lucerna, Suiza). 1 U de enzima se definió como la cantidad de enzima necesaria para lograr una disminución a la mitad de la DO_{595nm} (que corresponde a 1 log de reducción en la UFC/ml) de una solución con $5,10^8$ UFC/ml de la DCC1490 de *S. pneumoniae* tras 15 minutos a 37 °C.

55

Medición de la eliminación de lisina en plasma de ratón

Todos los experimentos en animales se llevaron a cabo de conformidad con las directrices federales e

60

institucionales. En ratones macho Balb C con un peso medio de 22 g, obtenidos de Charles River Laboratories (Wilmington, EE. UU.), se inyectó vía intravenosa (i.v.) en la vena lateral de la cola la misma cantidad de moles de tanto la enzima Cpl-1 dimérica, como de la enzima de tipo silvestre. Así, el bolo único (100 µl) de tanto la Cpl-1 (4,5 mg/ml) como el dímero Cpl-1^{C45S,D324C} (9 mg/ml) fueron administrados en dos grupos distintivos de 15 ratones. Tras la anestesia, se recogieron muestras de sangre mediante punción cardíaca a los 5, 30, 60, 180 y 300 min después de la administración, y se colocaron directamente en hielo.

Se preparó el plasma a partir de muestras de sangre heparinizadas y enfriadas en hielo mediante centrifugación a 3000 x g durante 10 min, a 4 °C. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Las concentraciones de plasma de la Cpl-1 y el dímero Cpl-1^{C45S,D324C} se determinaron mediante un ensayo ELISA sándwich indirecto. Se cubrieron las placas de 96 pocillos con una solución de 5 µg/ml de anticuerpo anti-Cpl1 monoclonal en solución salina tamponada con fosfato IX (PBS IX), con pH a 7,4 (3 horas a 37 °C y después una noche a 4 °C). Después de 5 lavados con 200 µl de tampón de lavado (PBS IX, 150 mM NaCl, Brij-35 al 0,05 %, azida sódica al 0,02 %, pH a 7,4), 100 µl de muestras de plasma y estándares diluidos en tampón de dilución (PBS 1X, NaCl 0,5 M, Brij-35 al 0,25 %, azida sódica al 0,02 %, pH a 7,4) fueron añadidos a los pocillos y placas incubados durante 3 horas a 37 °C. Las placas además se lavaron 5 veces con 200 µl de tampón de lavado, y 100 µl/pocillo de anticuerpo primario (anticuerpo anti-Cpl-1 policlonal de conejo) diluido en 2 µg/ml en tampón de dilución fueron añadidos a los pocillos, y las placas se incubaron durante otras 3 horas a 37 °C. Después de 5 lavados adicionales con 200 µl de tampón de lavado, las placas se incubaron una noche a temperatura ambiente en presencia de 100 µl/pocillo del anticuerpo secundario (conjugado de fosfatasa alcalina de cabra anti-IgG de conejo) diluido en proporción 1/1000 en tampón de dilución. A la mañana siguiente, los pocillos se lavaron 5 veces con 200 µl de tampón de lavado, y la actividad enzimática se midió a 405 nm mediante detección colorimétrica con 200 µl del sustrato de fosfatasa alcalina (1 mg/ml en dietanolamina al 10 %, 1 mM de MgCl₂) a temperatura ambiente. Se usó un lector de placas Spectra Max 5^e (Molecular Devices, Sunnyvale, EE. UU.), y los resultados fueron analizados con el *software* SoftMax Pro.

Debido a que las formas monoméricas y diméricas de la Cpl-1 reaccionan diferentemente con los anticuerpos específicos de Cpl-1, se hizo necesario utilizar dos estándares diferentes en el ensayo ELISA. Los monómeros de Cpl-1 purificados de concentraciones conocidas se usaron en los experimentos con la enzima nativa y los dímeros de Cpl-1^{C45S,D324C} purificados de concentraciones conocidas se usaron para los experimentos con el dímero de Cpl-1^{C45S,D324C}.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Se comprobó que las secuencias de aminoácidos de las regiones del extremo C-terminal de LytA y Cpl-1 eran homólogas (73/142 de residuos idénticos, y 55/69 residuos siendo sustituciones conservativas), y que los 13 aminoácidos del extremo C-terminal eran responsables de la dimerización de LytA (Figura 1). De manera interesante, dentro de esta región, 10/13 aminoácidos son idénticos entre la Cpl-1 y la LytA. Así, hemos especulado que la Cpl-1 podría también dimerizar hasta ser totalmente activa.

40 Construcción y purificación del dímero Cpl-1^{C45S,D324C}

Nuestra estrategia para crear una enzima predimerizada se centró en la formación de un puente disulfido entre dos monómeros. La enzima Cpl-1 de tipo silvestre contiene tres residuos de cisteína en las posiciones 45, 108 y 239. Gracias al uso del servidor Accpro en el sitio web del predictor de proteínas SCRATCH (scratch.proteomics.ics.uci.edu/index), únicamente la cisteína 45 (C45) se previó accesible al disolvente. De este modo, para evitar posibles interacciones con este residuo de cisteína, diseñamos la Cpl-1^{C45S} mutante. Esta mutante era soluble y completamente activa en comparación a la Cpl-1 nativa (datos no disponibles).

Para construir la forma predimerizada de Cpl-1, mutamos además la Cpl-1^{C45S} en Cpl-1^{C45S,D324C}. Introducimos específicamente el nuevo residuo de cisteína antes del tramo del aminoácido 13 en la cola del extremo C-terminal de la Cpl-1 para impedir alteraciones de la estructura clave en esta región. La mutación fue confirmada mediante secuenciación de ADN. La Cpl-1 y la Cpl-1^{C45S,D324C} se sobreexpresaron con éxito en las células de la cepa DH5α de *E. coli* y se purificaron para lograr homogeneidad en la columna DEAE-Sepharose (Figura 2A, carril 2, y Figura 2B, carril 2). Tal como se predijo para Cpl-1^{C45S,D324C}, apareció espontáneamente una banda a 74 kDa en el gel de SDS-PAGE no reductor con tinción de Coomassie (Figura 2B, carril 2). La reducción de esta muestra con 10 mM de ditioneitol (DTT), llevó a la desaparición total de la banda de 74 kDa (Figura 2B, carril 3), lo que confirmó que la forma dimérica relacionada con el enlace disulfido para Cpl-1^{C45S,D324C} resultó reducible. La purificación adicional en homogeneidad (~94 %) del dímero de Cpl-1^{C45S,D324C} se logró mediante un proceso de purificación en dos etapas en el Sephadex G-100, (Figura 2C, carriles 2 y 3).

60

Actividad antimicrobiana *in vitro* de los monómeros de Cpl-1^{C45S,D324C}

Hallamos que 1 mM de DTT resultó suficiente para lograr la reducción completa del dímero Cpl-1^{C45S,D324C} en monómeros (datos no disponibles). En este experimento, la actividad antimicrobiana de la forma monomérica purificada de Cpl-1^{C45S,D324C} fue, por consiguiente, cuantificada en presencia de 1 mM de DTT. De acuerdo con esta condición, la enzima mutante retuvo el 100 % de la actividad antibacteriana *in vitro* en comparación con la Cpl-1 nativa. Como se observó en la Figura 3, mediante el ensayo de destrucción *in vitro*, se logró una disminución del 50 % de la DO_{595nm} en *S. pneumoniae* después de 15 minutos con 0,5 nmol/ml y para ambos monómeros de Cpl-1 y Cpl-1^{C45S,D324C}. Las actividades específicas calculadas fueron de 6,7 U/nmol de enzima en ambos casos. Puede concluirse que el reemplazo de un ácido aspártico por una cisteína dentro de la región del extremo C-terminal no posee efectos significativos en la actividad de Cpl-1^{C45S,D324C}. Con la sustitución localizada justo antes de la cola de 13 aminoácidos necesaria para la dimerización nativa de LytA (y posiblemente de Cpl-1), se puede, por consiguiente, concluir que el nuevo residuo de cisteína no interfiere con el proceso de dimerización nativa de Cpl-1 sospechosa y que es necesario para una actividad completa. Finalmente, especulamos que la Cpl-1^{C45S,D324C}, cuando se convierte en monómeros mediante un tratamiento con DTT, se reasocia con la misma eficacia en dímeros al interactuar con la colina en la pared celular.

Actividad antimicrobiana *in vitro* de dímeros de Cpl-1^{C45S,D324C}

En nuestro ensayo *in vitro* de dímeros de Cpl-1^{C45S,D324C} purificada (Figura 2C, carril 3) se demostró un aumento de la actividad antibacteriana con un factor de 2 al compararlo con la Cpl-1 [se logró una disminución del 50 % de la DO_{595nm} en 0,25 frente a 0,5 nmol/ml, para el dímero Cpl-1^{C45S,D324C} y Cpl-1, respectivamente (Figura 3)]. Las actividades específicas calculadas fueron de 13,33 y 6,67 U/nmol, para los dímeros de Cpl-1^{C45S,D324C} y Cpl-1, respectivamente. Este resultado no resulta sorprendente dado que, de acuerdo a la característica de mol a mol, se necesitan el doble de moléculas de monómeros para producir un número fijo de dímeros. Además, los dímeros contienen dos sitios activos (frente a uno en los monómeros) y se espera, por ello, que tengan el doble de actividad que los monómeros. Finalmente, este resultado nos indica la evidencia de que la dimerización del extremo C-terminal no impide la actividad de la Cpl-1, es decir, si se da una dimerización en la naturaleza semejante a la de LytA para el caso de la Cpl-1, aquella no impediría la actividad enzimática.

Únicamente el dímero de Cpl-1^{C45S,D324C} es totalmente activo

Trece (13) mutantes de Cpl-1^{C45S} fueron diseñados por separado para tener una cisteína adicional en 13 posiciones diferentes dentro de la secuencia de proteínas. Entre ellos, 6/13 de los mutantes mostraron la misma actividad antimicrobiana que la Cpl-1 nativa al analizarlos en su estado monomérico y en presencia de 1 mM de DTT en el ensayo de destrucción *in vitro* de la cepa DCC1490 de *S. pneumoniae* (Tabla 1). Respecto a todos los mutantes de Cpl-1 que contenían una cisteína expuesta, se dio la dimerización espontánea tras la inducción de lactosa de las 6 correspondientes lisinas mutantes. Purificamos los dímeros correspondientes y analizamos sus actividades antimicrobianas en nuestro ensayo de destrucción *in vitro* (Figura 5). Con 0,5 mg/ml, todos los dímeros (excepto Cpl-1^{C45S,D324C}) mostraron una reducción $\geq 87,5$ % en sus actividades antimicrobianas. Así, la dimerización en otras posiciones diferentes al extremo más distante de la parte C-terminal impide marcadamente la actividad enzimática de la Cpl-1. Estas observaciones revelaron la importancia de una posición óptima del nuevo residuo de cisteína implicado en la formación del puente disulfido entre dos monómeros.

TABLA 1

Actividades antimicrobianas de los mutantes de Cpl-1 con 0,5 mg/ml			
Nombre del mutante	% de actividad para monómeros mutantes	% de actividad para dímeros mutantes purificados	
Cpl-1 ^{C45S;Q85C}	100	0	
Cpl-1 ^{C45S;D194C}	100	<1	
Cpl-1 ^{C45S;S206C}	25	ND	
Cpl-1 ^{C45S;N214C}	100	5	
Cpl-1 ^{C45S;G216C}	100	3	
Cpl-1 ^{C45S;F217C}	25	ND	
Cpl-1 ^{C45S;E249C}	75	ND	
Cpl-1 ^{C45S;D256C}	100	12,5	
Cpl-1 ^{C45S;S269C}	100	3	
Cpl-1 ^{C45S;M301C}	18,75	ND	
Cpl-1 ^{C45S;G310C}	75	ND	

Cpl-1 ^{C45S;N319C}	50	ND
Cpl-1 ^{C45S;D324C}	100	100
TS: tipo silvestre, ND: no determinado		

Eliminación en plasma de Cpl-1 y dímeros Cpl-1^{C45S,D324C} en ratones

Se inyectó a ratones Balb C en la vena lateral de la cola un bolo de 100 μ l de tanto la Cpl-1 nativa a 4,5 mg/ml (12,16 nmoles/100 μ l) como los dímeros Cpl-1^{C45S,D324C} con una concentración de 9 mg/ml (12,16 nmoles/100 μ l). Las muestras de sangre se tomaron a los 5, 30, 60, 180, y 300 minutos tras la inyección. Gracias a un ensayo ELISA sándwich, se halló que la concentración de dímeros de Cpl-1^{C45S,D324C} era significativamente más elevada que el monómero de control en cada punto temporal (Figura 4). Por ejemplo, en comparación con el monómero Cpl-1, se detectaron 20,32 veces más de moléculas de dímero en el plasma 30 minutos después de la inyección (4.764,32 \pm 788,55 frente a 234,5 \pm 48,93 pmol/ml para el dímero Cpl-1^{C45S,D324C} y el Cpl-1, respectivamente). Después de 5 horas, la diferencia fue de 7,76 (116,8 \pm 22,85 frente a 15,05 \pm 1,82 pmol/ml, para el dímero Cpl-1^{C45S,D324C} y el Cpl-1, respectivamente). El área calculada bajo la curva (AUC) que representó la lisina residual en plasma durante el transcurso del experimento fue de 44,417 nmol/min⁻¹/ml⁻¹ para el monómero frente a 435,026 nmol/min⁻¹/ml⁻¹ para el dímero. De este modo, para la dosis inyectada de 12,16 nmoles, se encontraron valores de eliminación de 0,274 ml/min⁻¹ para el monómero Cpl-1 en comparación a 0,028 ml/min⁻¹ para el dímero Cpl-1^{C45S,D324C}, haciendo que la eliminación de los dímeros estabilizados disminuyera con un factor de \sim 9,8 sobre el monómero.

Se halló que la duplicación del tamaño del Cpl-1 mediante dimerización tuvo un efecto significativo en la eliminación de la enzima a partir del plasma de ratones, lo que sugiere que la filtración renal podría tener un papel sustancial en su eliminación. Nuestros hallazgos indican que el dímero Cpl-1^{C45S,D324C} resulta una molécula intravenosa mucho más potente en comparación con el monómero de Cpl-1 nativa previamente analizado en un modelo de ratón con septicemia neumocócica y habiendo mostrado 20,5 minutos de vida media (12, 15). Además, existe una mayor cantidad de dímero disponible en la sangre para distribución sistémica y, de este modo, se espera que el dímero Cpl-1^{C45S,D324C} muestre efectos terapéuticos mejorados en otras enfermedades asociadas a *S. pneumoniae*. Por ejemplo, en una publicación reciente, la forma monomérica de Cpl-1 se usó para curar la neumonía en ratones mediante el suministro de lisina por vía intraperitoneal cada 12 horas (31). La efectividad de este tratamiento a pesar de la corta vida media de la lisina sugiere que la forma dimérica podría demostrar ser significativamente más eficaz al tratar infecciones similares. Huelga decir que la biodisponibilidad del dímero en el sitio de la infección tiene que evaluarse en un entorno *in vivo*.

En resumen, en el presente documento indicamos que la construcción de una lisina dimérica estabilizada es el doble de activa *in vitro* que el monómero original (en una relación molar de 1/1), y cuenta además aproximadamente con 10 veces más de biodisponibilidad en sangre. También presentamos evidencia de la gran importancia de la elección de la posición en la cual la nueva cisteína introducida e implicada en la dimerización tiene que introducirse. Una lisina de Cpl-1 de acción prolongada podría representar una novedosa alternativa contra tanto los neumococos susceptibles como los resistentes a los antibióticos. Además, y debido a que otras y diversas lisinas de fago han demostrado o han sido sospechosas de dimerización (7, 24, 25), esta estrategia podría representar una forma general de aumento en la actividad y/o en la farmacocinética de ciertas lisinas de fago.

40 REFERENCIAS

1. Borysowski, J., B. Weber-Dabrowska, y A. Gorski. 2006. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp Biol Med* (Maywood) 231:366-77.
2. Brundage, J. F., y G. D. Shanks. 2008. Deaths from bacterial pneumonia during 1918-19 influenza pandemic. *Emerg Infect Dis* 14:1193-9.
3. Brundage, J. F., y G. D. Shanks. 2007. What really happened during the 1918 influenza pandemic? The importance of bacterial secondary infections. *J Infect Dis* 196:1717-8; author reply 1718-9.
4. CDC. 2009. Pneumococcal diseases, p. 217-30. En W. Atkinson, S. Wolfe, J. Hamborsky, y L. McIntyre (ed.), *Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases* (The Pink Book), 11th ed. Public Health Foundation, Washington DC.
5. English, M. 2000. Impact of bacterial pneumonias on world child health. *Paediatr Respir Rev* 1:21-5.
6. Entenza, J. M., J. M. Loeffler, D. Grandgirard, V. A. Fischetti, y P. Moreillon. 2005. Therapeutic effects of bacteriophage Cpl-1 lysin against *Streptococcus pneumoniae* endocarditis in rats. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4789-92.
7. Fernández-Tornero, C., E. García, R. López, G. Giménez-Gallego, y A. Romero. 2002. Two new crystal forms of the choline-binding domain of the major pneumococcal autolysin: insights into the dynamics of the active homodimer. *J Mol Biol* 321:163-73.

8. File, T. M., Jr. 2004. Streptococcus pneumoniae and community-acquired pneumonia: a cause for concern. *Am J Med* 117 Suppl 3A:39S-50S.
9. Fischetti, V. A. 2008. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr Opin Microbiol* 11:393-400.
10. García, J. L., E. García, A. Arraras, P. García, C. Ronda, y R. López. 1987. Cloning, purification, and biochemical characterization of the pneumococcal bacteriophage Cp-1 lysin. *J Virol* 61:2573-80.
- 5 11. Goossens, H. 2009. Antibiotic consumption and link to resistance. *Clin Microbiol Infect* 15 Suppl 3:12-5.
12. Grandgirard, D., J. M. Loeffler, V. A. Fischetti, y S. L. Leib. 2008. Phage lytic enzyme Cpl-1 for antibacterial therapy in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 197:1519-22.
13. Jacobs, M. R. 2004. Streptococcus pneumoniae: epidemiology and patterns of resistance. *Am J Med* 117 Suppl 10 3A:3S-15S.
14. Jado, I., R. López, E. García, A. Fenoll, J. Casal, y P. García. 2003. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant Streptococcus pneumoniae infection in a murine sepsis model. *J Antimicrob Chemother* 52:967-73.
15. Loeffler, J. M., S. Djurkovic, y V. A. Fischetti. 2003. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infect Immun* 71:6199-204.
16. Loeffler, J. M., y V. A. Fischetti. 2003. Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant Streptococcus pneumoniae strains. *Antimicrob Agents Chemother* 47:375-7.
17. Loeffler, J. M., D. Nelson, y V. A. Fischetti. 2001. Rapid killing of Streptococcus pneumoniae with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* 294:2170-2.
- 20 18. Maack, T., V. Johnson, S. T. Kau, J. Figueiredo, y D. Sigulem. 1979. Renal filtration, transport, and metabolism of low-molecular-weight proteins: a review. *Kidney Int* 16:251-70.
19. Mandell, L. A., L. R. Peterson, R. Wise, D. Hooper, D. E. Low, U. B. Schaad, K. P. Klugman, y P. Courvalin. 2002. The battle against emerging antibiotic resistance: should fluoroquinolones be used to treat children? *Clin Infect Dis* 35:721-7.
- 20 20. Morens, D. M., J. K. Taubenberger, y A. S. Fauci. 2009. The persistent legacy of the 1918 influenza virus. *N Engl J Med* 361:225-9.
21. Morens, D. M., J. K. Taubenberger, G. K. Folkers, y A. S. Fauci. 2009. An historical antecedent of modern guidelines for community pandemic influenza mitigation. *Public Health Rep* 124:22-5.
22. Pérez-Dorado, I., N. E. Campillo, B. Monterroso, D. Heseck, M. Lee, J. A. Páez, P. García, M. Martínez-Ripoll, J. L. García, S. Mobashery, M. Menéndez, y J. A. Hermoso. 2007. Elucidation of the molecular recognition of bacterial cell wall by modular pneumococcal phage endolysin CPL-1. *J Biol Chem* 282:24990-9.
- 30 23. Reinert, R. R. 2009. The public health ramifications of pneumococcal resistance. *Clin Microbiol Infect* 15 Suppl 3:1-3.
24. Romero, P., R. López, y E. García. 2004. Characterization of LytA-like N-acetylmuramoyl-L-alanine amidases from two new Streptococcus mitis bacteriophages provides insights into the properties of the major pneumococcal autolysin. *J Bacteriol* 186:8229-39.
- 35 25. Romero, P., R. López, y E. García. 2007. Key role of amino acid residues in the dimerization and catalytic activation of the autolysin LytA, an important virulence factor in Streptococcus pneumoniae. *J Biol Chem* 282:17729-37.
- 40 26. Sánchez-Puelles, J. M., J. L. García, R. López, y E. García. 1987. 3'-end modifications of the Streptococcus pneumoniae lytA gene: role of the carboxy terminus of the pneumococcal autolysin in the process of enzymatic activation (conversion). *Gene* 61:13-9.
27. Sulakvelidze, A., Z. Alavidze, y J. G. Morris, Jr. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 45:649-59.
- 45 28. Sulakvelidze, A., y P. Barrow. 2005. Phage therapy in animals and agribusiness, p. 335-71. En E. Kutter y A. Sulakvelidze (ed.), *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press, USA.
29. Sulakvelidze, A., y E. Kutter. 2005. Bacteriophage therapy in humans, p. 381-426. En E. Kutter y A. Sulakvelidze (ed.), *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press, USA.
30. Varea, J., J. L. Saiz, C. López-Zumel, B. Monterroso, F. J. Medrano, J. L. Arrondo, I. Iloro, J. Laynez, J. L. García, y M. Menéndez. 2000. Do sequence repeats play an equivalent role in the choline-binding module of pneumococcal LytA amidase? *J Biol Chem* 275:26842-55.
- 50 31. Witzernath, M., B. Schmeck, J. M. Doehn, T. Tschernig, J. Zahlten, J. M. Loeffler, M. Zemlin, H. Muller, B. Gutbier, H. Schutte, S. Hippenstiel, V. A. Fischetti, N. Suttrop, y S. Rosseau. 2009. Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med* 37:642-9.

55

EJEMPLO 2

ESTUDIOS *IN VIVO* EN ANIMALES

- 60 **Eficacia destructiva intravenosa.** Se infectó a ratones hembra C3H/HeJ de cuatro a seis semanas de edad a

través de la vena de la cola con 3×10^7 UFC de serotipo 14 de *S. pneumoniae* en fase logarítmica (cepa DCC1490, susceptible a la penicilina) y fueron tratados con diferentes concentraciones (100-2000 ug) Cpl-1 en 100 ul o el mismo volumen (100 ul) de tampón vía intravenosa a las 10 horas tras la infección. Se extrajeron muestras de sangre previamente y a los 15 y 120 minutos tras el tratamiento, y se determinaron los títulos bacterianos mediante dilución en serie y en placas en agar de sangre. La presencia de *S. pneumoniae* en colonias alfa-hemolíticas fue confirmada con el uso de discos de optochin.

EJEMPLO 3

10 ENZIMA PAL DIMERIZADA

Pal es una lisina estreptocócica aislada a partir de un bacteriófago neumocócico que digiere específicamente la pared celular neumocócica en segundos (Loeffler, JM y col. (2001) Science 294: 2170-2172; Patente de EE. UU. n.º 7.569.223). Pal es una proteína lítica de 296 aminoácidos con una masa molecular de 34 kDa y es una amidasa, que escinde el peptidoglucano entre ácido N-acetilmurámico y L-alanina. Cpl-1, descrita anteriormente, es una proteína de 339 aminoácidos y es una lisozima, que escinde el enlace glicosídico entre ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina (García, P y col (1997) Microb Drug Resist 3:165-176). Mientras que ambas enzimas poseen muy diferentes sitios catalíticos de extremo N-terminal, estas comparten un sitio similar de unión a la pared celular del extremo C-terminal, que las une a colina. Se ha descrito la eficacia destructiva mejorada de una combinación de Pal y Cpl-1 para *S. Pneumoniae*, que incluye cepas resistentes a penicilina (Loeffler, JM y Fischetti, VA (2003) Antimicrob Agents and Chemoth 47(1):375-377; PublishedPCT WO2004/058182).

Como en la Cpl-1, la región del extremo C-terminal de la enzima Pal incluye repeticiones de unión a colina y aminoácidos de extremo C-terminal con correspondencia a LytA, de hecho 11 de los 14 aminoácidos del extremo C-terminal de Pal son idénticos a los de la secuencia de LytA. Al comparar Pal con Cpl-1, 9 de los 14 aminoácidos del extremo C-terminal de Pal resultan idénticos a Cpl-1. Pal muestra una similitud global con Cpl-1 y LytA en su región del extremo C-terminal, en particular, a partir de los aminoácidos 155 a 296, donde 60 de estos 142 aminoácidos son idénticos entre Pal, Cpl-1 y LytA. La Figura 7 representa las secuencias de aminoácidos de Cpl-1, Pal y LytA y evidencia las regiones del extremo C-terminal homólogas en estas tres enzimas.

Mediante un enfoque comparable al descrito anteriormente para Cpl-1, el dímero Pal compuesto de dos monómeros covalentemente unidos y estabilizados por un enlace disulfido es diseñado y construido. La formación de un puente disulfido entre dos monómeros de la enzima Pal se usa, como en la Cpl-1, para generar la enzima Pal predimerizada ejemplar.

La enzima Cpl-1 de tipo silvestre contiene tres residuos de cisteína en las posiciones de aminoácido 34, 113 y 250. Gracias al uso del servidor Accpro en el sitio web del predictor de proteínas SCRATCH (scratch.proteomics.ics.uci.edu/index), ninguno de los residuos de cisteína de Pal se previó accesible al disolvente. Así, no se consideró necesario diseñar un mutante de Pal que careciera de cualquiera de las cisteínas de enzima nativa antes de proceder a predimerizar Pal. Para construir la forma predimerizada de Pal, los aminoácidos de la región del extremo C-terminal son mutados en Cys. El nuevo residuo de cisteína se introduce específicamente antes del tramo del aminoácido 14 en la cola del extremo C-terminal de la Pal para impedir alteraciones de cualquier estructura clave en esta región homóloga. La mutación se confirma mediante secuenciación de ADN y la Pal mutante de tipo silvestre es sobreexpresada en las células de la cepa DH5 α de *E. coli* y purificada para lograr homogeneidad en una columna DEAE-Sepharose. La Pal mutante predimerizada es confirmada mediante una segunda banda que aparece a aproximadamente 70 kDa en el gel SDS-PAGE no reductor con tinción de Coomassie. La reducción con 10 mM de ditioneitol (DTT) llevó a la desaparición de la banda más alta de kDa, lo que confirma que la forma dimérica relacionada con el enlace disulfido para Pal es reducible. La Pal^{D280C} que cuenta con el aminoácido 280 mutado en cisteína se construye, confirma y analiza para establecer la producción de la enzima Pal predimerizada. El mutante de Pal^{D280C} es análogo a Cpl-1^{C45S,D324C} al ser predimerizado en una ubicación comparable y adyacente a los 14 aminoácidos del extremo C-terminal análogos a LytA de Pal. Las pruebas *in vitro* e *in vivo* en relación con la actividad y eficacia destructiva de la Pal dimerizada mutante se realizaron tal como se describe anteriormente para la Cpl-1 con el fin de demostrar la actividad antineumocócica de la Pal dimerizada mutante.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad Rockefeller,
Fischetti, Vincent A

<120> Lisinas de bacteriófago diméricas

ES 2 683 035 T3

<130> 3268-1-008PCT
 <140> No asignado
 <141> 05/10/2012
 <150>US 61/543.803
 5 <151> 05/10/2011
 <160> 6
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 339
 10 <212> PRT
 <213> Streptococcus pneumoniae
 <400> 1

```

Met Val Lys Lys Asn Asp Leu Phe Val Asp Val Ser Ser His Asn Gly
 1          5          10          15

Tyr Asp Ile Thr Gly Ile Leu Glu Gln Met Gly Thr Thr Asn Thr Ile
      20          25          30

Ile Lys Ile Ser Glu Ser Thr Thr Tyr Leu Asn Pro Cys Leu Ser Ala
      35          40          45

Gln Val Glu Gln Ser Asn Pro Ile Gly Phe Tyr His Phe Ala Arg Phe
      50          55          60

Gly Gly Asp Val Ala Glu Ala Glu Arg Glu Ala Gln Phe Phe Leu Asp
65          70          75          80

Asn Val Pro Met Gln Val Lys Tyr Leu Val Leu Asp Tyr Glu Asp Asp
      85          90          95

Pro Ser Gly Asp Ala Gln Ala Asn Thr Asn Ala Cys Leu Arg Phe Met
      100         105         110

Gln Met Ile Ala Asp Ala Gly Tyr Lys Pro Ile Tyr Tyr Ser Tyr Lys
      115         120         125

Pro Phe Thr His Asp Asn Val Asp Tyr Gln Gln Ile Leu Ala Gln Phe
      130         135         140
    
```

15

ES 2 683 035 T3

Pro Asn Ser Leu Trp Ile Ala Gly Tyr Gly Leu Asn Asp Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Asn Phe Glu Tyr Phe Pro Ser Met Asp Gly Ile Arg Trp Trp Gln Tyr
 165 170 175

Ser Ser Asn Pro Phe Asp Lys Asn Ile Val Leu Leu Asp Asp Glu Glu
 180 185 190

Asp Asp Lys Pro Lys Thr Ala Gly Thr Trp Lys Gln Asp Ser Lys Gly
 195 200 205

Trp Trp Phe Arg Arg Asn Asn Gly Ser Phe Pro Tyr Asn Lys Trp Glu
 210 215 220

Lys Ile Gly Gly Val Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser Lys Gly Tyr Cys Leu
 225 230 235 240

Thr Ser Glu Trp Leu Lys Asp Asn Asp Lys Trp Tyr Tyr Leu Lys Asp
 245 250 255

Asn Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Val Leu Val Gly Ser Glu Trp Tyr
 260 265 270

Tyr Met Asp Asp Ser Gly Ala Met Val Thr Gly Trp Val Lys Tyr Lys
 275 280 285

Asn Asn Trp Tyr Tyr Met Thr Asn Glu Arg Gly Asn Met Val Ser Asn
 290 295 300

Glu Phe Ile Lys Ser Gly Lys Gly Trp Tyr Phe Met Asn Thr Asn Gly
 305 310 315 320

Glu Leu Ala Asp Asn Pro Ser Phe Thr Lys Glu Pro Asp Gly Leu Ile
 325 330 335

Thr Val Ala

<210> 2

<211> 318

5 <212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 2

Met Glu Ile Asn Val Ser Lys Leu Arg Thr Asp Leu Pro Gln Val Gly

ES 2 683 035 T3

1	5	10	15
Val Gln Pro Tyr Arg Gln Val His Ala His Ser Thr Gly Asn Pro His	20	25	30
Ser Thr Val Gln Asn Glu Ala Asp Tyr His Trp Arg Lys Asp Pro Glu	35	40	45
Leu Gly Phe Phe Ser His Ile Val Gly Asn Gly Cys Ile Met Gln Val	50	55	60
Gly Pro Val Asp Asn Gly Ala Trp Asp Val Gly Gly Gly Trp Asn Ala	65	70	75
Glu Thr Tyr Ala Ala Val Glu Leu Ile Glu Ser His Ser Thr Lys Glu	85	90	95
Glu Phe Met Thr Asp Tyr Arg Leu Tyr Ile Glu Leu Leu Arg Asn Leu	100	105	110
Ala Asp Glu Ala Gly Leu Pro Lys Thr Leu Asp Thr Gly Ser Leu Ala	115	120	125
Gly Ile Lys Thr His Glu Tyr Cys Thr Asn Asn Gln Pro Asn Asn His	130	135	140
Ser Asp His Val Asp Pro Tyr Pro Tyr Leu Ala Lys Trp Gly Ile Ser	145	150	155
Arg Glu Gln Phe Lys His Asp Ile Glu Asn Gly Leu Thr Ile Glu Thr	165	170	175
Gly Trp Gln Lys Asn Asp Thr Gly Tyr Trp Tyr Val His Ser Asp Gly	180	185	190
Ser Tyr Pro Lys Asp Lys Phe Glu Lys Ile Asn Gly Thr Trp Tyr Tyr	195	200	205
Phe Asp Ser Ser Gly Tyr Met Leu Ala Asp Arg Trp Arg Lys His Thr	210	215	220
Asp Gly Asn Trp Tyr Trp Phe Asp Asn Ser Gly Glu Met Ala Thr Gly	225	230	235
Trp Lys Lys Ile Ala Asp Lys Trp Tyr Tyr Phe Asn Glu Glu Gly Ala	245	250	255

ES 2 683 035 T3

Met Lys Thr Gly Trp Val Lys Tyr Lys Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp
 260 265 270

Ala Lys Glu Gly Ala Met Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp
 275 280 285

Gly Thr Gly Trp Tyr Tyr Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp Lys
 290 295 300

Pro Glu Phe Thr Val Glu Pro Asp Gly Leu Ile Thr Val Lys
 305 310 315

<210> 3

<211> 339

5 <212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<220>

<221> VARIANTE

<222> (45)..(45)

10 <223> serina por cisteína

<220>

<221> VARIANTE

<222> (324)..(324)

<223> cisteína por ácido aspártico

15 <400> 3

Met Val Lys Lys Asn Asp Leu Phe Val Asp Val Ser Ser His Asn Gly
 1 5 10 15

Tyr Asp Ile Thr Gly Ile Leu Glu Gln Met Gly Thr Thr Asn Thr Ile
 20 25 30

Ile Lys Ile Ser Glu Ser Thr Thr Tyr Leu Asn Pro Ser Leu Ser Ala
 35 40 45

Gln Val Glu Gln Ser Asn Pro Ile Gly Phe Tyr His Phe Ala Arg Phe
 50 55 60

Gly Gly Asp Val Ala Glu Ala Glu Arg Glu Ala Gln Phe Phe Leu Asp
 65 70 75 80

Asn Val Pro Met Gln Val Lys Tyr Leu Val Leu Asp Tyr Glu Asp Asp
 85 90 95

Pro Ser Gly Asp Ala Gln Ala Asn Thr Asn Ala Cys Leu Arg Phe Met

ES 2 683 035 T3

100 105 110
 Gln Met Ile Ala Asp Ala Gly Tyr Lys Pro Ile Tyr Tyr Ser Tyr Lys
 115 120 125
 Pro Phe Thr His Asp Asn Val Asp Tyr Gln Gln Ile Leu Ala Gln Phe
 130 135 140
 Pro Asn Ser Leu Trp Ile Ala Gly Tyr Gly Leu Asn Asp Gly Thr Ala
 145 150 155 160
 Asn Phe Glu Tyr Phe Pro Ser Met Asp Gly Ile Arg Trp Trp Gln Tyr
 165 170 175
 Ser Ser Asn Pro Phe Asp Lys Asn Ile Val Leu Leu Asp Asp Glu Glu
 180 185 190
 Asp Asp Lys Pro Lys Thr Ala Gly Thr Trp Lys Gln Asp Ser Lys Gly
 195 200 205
 Trp Trp Phe Arg Arg Asn Asn Gly Ser Phe Pro Tyr Asn Lys Trp Glu
 210 215 220
 Lys Ile Gly Gly Val Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser Lys Gly Tyr Cys Leu
 225 230 235 240
 Thr Ser Glu Trp Leu Lys Asp Asn Asp Lys Trp Tyr Tyr Leu Lys Asp
 245 250 255
 Asn Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Val Leu Val Gly Ser Glu Trp Tyr
 260 265 270
 Tyr Met Asp Asp Ser Gly Ala Met Val Thr Gly Trp Val Lys Tyr Lys
 275 280 285
 Asn Asn Trp Tyr Tyr Met Thr Asn Glu Arg Gly Asn Met Val Ser Asn
 290 295 300
 Glu Phe Ile Lys Ser Gly Lys Gly Trp Tyr Phe Met Asn Thr Asn Gly
 305 310 315 320
 Glu Leu Ala Cys Asn Pro Ser Phe Thr Lys Glu Pro Asp Gly Leu Ile
 325 330 335
 Thr Val Ala

<210> 4

<211> 339

5 <212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

ES 2 683 035 T3

<220>

<221> VARIANTE

<222> (45)..(45)

<223> serina por cisteína

5 <400> 4

Met Val Lys Lys Asn Asp Leu Phe Val Asp Val Ser Ser His Asn Gly
1 5 10 15

Tyr Asp Ile Thr Gly Ile Leu Glu Gln Met Gly Thr Thr Asn Thr Ile
20 25 30

Ile Lys Ile Ser Glu Ser Thr Thr Tyr Leu Asn Pro Ser Leu Ser Ala
35 40 45

Gln Val Glu Gln Ser Asn Pro Ile Gly Phe Tyr His Phe Ala Arg Phe
50 55 60

Gly Gly Asp Val Ala Glu Ala Glu Arg Glu Ala Gln Phe Phe Leu Asp
65 70 75 80

Asn Val Pro Met Gln Val Lys Tyr Leu Val Leu Asp Tyr Glu Asp Asp
85 90 95

Pro Ser Gly Asp Ala Gln Ala Asn Thr Asn Ala Cys Leu Arg Phe Met
100 105 110

Gln Met Ile Ala Asp Ala Gly Tyr Lys Pro Ile Tyr Tyr Ser Tyr Lys
115 120 125

Pro Phe Thr His Asp Asn Val Asp Tyr Gln Gln Ile Leu Ala Gln Phe
130 135 140

Pro Asn Ser Leu Trp Ile Ala Gly Tyr Gly Leu Asn Asp Gly Thr Ala
145 150 155 160

Asn Phe Glu Tyr Phe Pro Ser Met Asp Gly Ile Arg Trp Trp Gln Tyr
165 170 175

Ser Ser Asn Pro Phe Asp Lys Asn Ile Val Leu Leu Asp Asp Glu Glu
180 185 190

ES 2 683 035 T3

Asp Asp Lys Pro Lys Thr Ala Gly Thr Trp Lys Gln Asp Ser Lys Gly
 195 200 205

Trp Trp Phe Arg Arg Asn Asn Gly Ser Phe Pro Tyr Asn Lys Trp Glu
 210 215 220

Lys Ile Gly Gly Val Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser Lys Gly Tyr Cys Leu
 225 230 235 240

Thr Ser Glu Trp Leu Lys Asp Asn Asp Lys Trp Tyr Tyr Leu Lys Asp
 245 250 255

Asn Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Val Leu Val Gly Ser Glu Trp Tyr
 260 265 270

Tyr Met Asp Asp Ser Gly Ala Met Val Thr Gly Trp Val Lys Tyr Lys
 275 280 285

Asn Asn Trp Tyr Tyr Met Thr Asn Glu Arg Gly Asn Met Val Ser Asn
 290 295 300

Glu Phe Ile Lys Ser Gly Lys Gly Trp Tyr Phe Met Asn Thr Asn Gly
 305 310 315 320

Glu Leu Ala Asp Asn Pro Ser Phe Thr Lys Glu Pro Asp Gly Leu Ile
 325 330 335

Thr Val Ala

<210> 5

<211> 296

5 <212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 5

Met Gly Val Asp Ile Glu Lys Gly Val Ala Trp Met Gln Ala Arg Lys
 1 5 10 15

Gly Arg Val Ser Tyr Ser Met Asp Phe Arg Asp Gly Pro Asp Ser Tyr
 20 25 30

Asp Cys Ser Ser Ser Met Tyr Tyr Ala Leu Arg Ser Ala Gly Ala Ser
 35 40 45

10

ES 2 683 035 T3

Ser Ala Gly Trp Ala Val Asn Thr Glu Tyr Met His Ala Trp Leu Ile
50 55 60

Glu Asn Gly Tyr Glu Leu Ile Ser Glu Asn Ala Pro Trp Asp Ala Lys
65 70 75 80

Arg Gly Asp Ile Phe Ile Trp Gly Arg Lys Gly Ala Ser Ala Gly Ala
85 90 95

Gly Gly His Thr Gly Met Phe Ile Asp Ser Asp Asn Ile Ile His Cys
100 105 110

Asn Tyr Ala Tyr Asp Gly Ile Ser Val Asn Asp His Asp Glu Arg Trp
115 120 125

Tyr Tyr Ala Gly Gln Pro Tyr Tyr Tyr Val Tyr Arg Leu Thr Asn Ala
130 135 140

Asn Ala Gln Pro Ala Glu Lys Lys Leu Gly Trp Gln Lys Asp Ala Thr
145 150 155 160

Gly Phe Trp Tyr Ala Arg Ala Asn Gly Thr Tyr Pro Lys Asp Glu Phe
165 170 175

Glu Tyr Ile Glu Glu Asn Lys Ser Trp Phe Tyr Phe Asp Asp Gln Gly
180 185 190

Tyr Met Leu Ala Glu Lys Trp Leu Lys His Thr Asp Gly Asn Trp Tyr
195 200 205

Trp Phe Asp Arg Asp Gly Tyr Met Ala Thr Ser Trp Lys Arg Ile Gly
210 215 220

Glu Ser Trp Tyr Tyr Phe Asn Arg Asp Gly Ser Met Val Thr Gly Trp
225 230 235 240

Ile Lys Tyr Tyr Asp Asn Trp Tyr Tyr Cys Asp Ala Thr Asn Gly Asp
245 250 255

Met Lys Ser Asn Ala Phe Ile Arg Tyr Asn Asp Gly Trp Tyr Leu Leu
260 265 270

Leu Pro Asp Gly Arg Leu Ala Asp Lys Pro Gln Phe Thr Val Glu Pro
275 280 285

Asp Gly Leu Ile Thr Ala Lys Val
290 295

5 <210> 6
<211> 296

ES 2 683 035 T3

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<220>

<221> VARIANTE

5 <222> (280)..(280)

<223> cisteína por ácido aspártico

<400> 6

Met Gly Val Asp Ile Glu Lys Gly Val Ala Trp Met Gln Ala Arg Lys
1 5 10 15

Gly Arg Val Ser Tyr Ser Met Asp Phe Arg Asp Gly Pro Asp Ser Tyr
20 25 30

Asp Cys Ser Ser Ser Met Tyr Tyr Ala Leu Arg Ser Ala Gly Ala Ser
35 40 45

Ser Ala Gly Trp Ala Val Asn Thr Glu Tyr Met His Ala Trp Leu Ile
50 55 60

Glu Asn Gly Tyr Glu Leu Ile Ser Glu Asn Ala Pro Trp Asp Ala Lys
65 70 75 80

Arg Gly Asp Ile Phe Ile Trp Gly Arg Lys Gly Ala Ser Ala Gly Ala
85 90 95

Gly Gly His Thr Gly Met Phe Ile Asp Ser Asp Asn Ile Ile His Cys
100 105 110

Asn Tyr Ala Tyr Asp Gly Ile Ser Val Asn Asp His Asp Glu Arg Trp
115 120 125

Tyr Tyr Ala Gly Gln Pro Tyr Tyr Tyr Val Tyr Arg Leu Thr Asn Ala
130 135 140

Asn Ala Gln Pro Ala Glu Lys Lys Leu Gly Trp Gln Lys Asp Ala Thr
145 150 155 160

Gly Phe Trp Tyr Ala Arg Ala Asn Gly Thr Tyr Pro Lys Asp Glu Phe
165 170 175

Glu Tyr Ile Glu Glu Asn Lys Ser Trp Phe Tyr Phe Asp Asp Gln Gly

10

ES 2 683 035 T3

180	185	190
Tyr Met Leu Ala Glu Lys Trp Leu Lys His Thr Asp Gly Asn Trp Tyr 195	200	205
Trp Phe Asp Arg Asp Gly Tyr Met Ala Thr Ser Trp Lys Arg Ile Gly 210	215	220
Glu Ser Trp Tyr Tyr Phe Asn Arg Asp Gly Ser Met Val Thr Gly Trp 225	230	235
Ile Lys Tyr Tyr Asp Asn Trp Tyr Tyr Cys Asp Ala Thr Asn Gly Asp 245	250	255
Met Lys Ser Asn Ala Phe Ile Arg Tyr Asn Asp Gly Trp Tyr Leu Leu 260	265	270
Leu Pro Asp Gly Arg Leu Ala Cys Lys Pro Gln Phe Thr Val Glu Pro 275	280	285
Asp Gly Leu Ile Thr Ala Lys Val 290	295	

REIVINDICACIONES

1. Una lisina de fago específico de *Streptococcus* dimérica y aislada que comprende dos monómeros de lisina de fago específico de *Streptococcus* unidos covalentemente entre sí, donde dicho dímero posee actividad destructiva contra una o más bacterias de *Streptococcus* y donde cada monómero tiene un residuo Cys que se encuentra entre 14 y 20 aminoácidos desde el extremo C-terminal, donde dichos monómeros de lisina están unidos covalentemente entre sí por un enlace disulfido, y donde dichos monómeros de lisina no poseen un residuo Cys en los 45 primeros residuos.
2. La lisina de la reivindicación 1, donde dichos monómeros de lisina son monómeros de Cpl-1 que tienen, al menos, un 90 % de identidad de secuencia con una Cpl-1 no mutada (SEQ ID NO: 1), y que tienen un residuo Cys que se encuentra entre 14 y 20 aminoácidos desde el extremo C-terminal, o son monómeros Pal que tienen, al menos, una identidad de secuencia del 90 % con Pal no mutada (SEQ ID NO: 5) y que tiene un residuo Cys que está entre 14 y 20 aminoácidos desde el extremo C-terminal.
3. La lisina de la reivindicación 1, donde dichos monómeros de lisina son seleccionados de entre (a) lisinas de Cpl-1 que comprenden una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y que tienen un residuo Cys que está entre 14 y 20 aminoácidos desde el extremo C-terminal, tal como lisinas de Cpl-1 mutante que comprenden una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 y (b) lisinas de Pal mutante que comprenden una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y que tienen un residuo Cys que se encuentra entre 14 y 20 aminoácidos desde el extremo C-terminal, tales como lisinas de Pal mutante que comprenden una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.
4. La lisina de la reivindicación 1, donde dichos monómeros de lisina comprenden un dominio catalítico de una primera lisina de fago específico de *Streptococcus* y un dominio de unión de una segunda lisina de fago específico de *Streptococcus*.
5. La lisina de la reivindicación 4, donde el dominio catalítico de una primera lisina de fago específico de *Streptococcus* es el dominio catalítico de la Cpl-1 (SEQ ID NO: 1), el dominio catalítico de una Cpl-1 mutante (SEQ ID NO:3), el dominio catalítico de Pal (SEQ ID NO:5) o el dominio catalítico de una Pal mutante (SEQ ID NO:6) y el dominio de unión de una segunda lisina de fago específico de *Streptococcus* es el dominio de unión de Cpl-1 (SEQ ID NO:1) y tiene un residuo Cys que está entre 14 y 20 aminoácidos desde el extremo C-terminal, tal como el dominio de unión de la Cpl-1 mutante (SEQ ID NO:3) o el dominio de unión de Pal (SEQ ID NO:5), y tiene un residuo Cys que está entre 14 y 20 aminoácidos desde el extremo C-terminal, tal como el dominio de unión de la Pal mutante (SEQ ID NO:6).
6. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una lisina de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para uso en el tratamiento de un mamífero que padece una enfermedad o afección causada por una infección de estreptococos, o para la descolonización de estreptococos en un mamífero que padece o está en riesgo de contraer una enfermedad o afección causada por una infección de estreptococos.
7. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicha infección está causada por la *Streptococcus pneumoniae*.
8. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicha enfermedad o afección es una o más enfermedades o afecciones seleccionadas de entre el grupo de bacteriemia, meningitis, neumonía, otitis media y sinusitis.
9. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una lisina dimérica de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y un vehículo aceptable farmacéuticamente.
10. Uso de una composición antimicrobiana que comprende una lisina de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para sanear o descontaminar superficies porosas o no porosas.
11. Un procedimiento para descontaminar superficies inanimadas sospechosas de contener bacterias infecciosas, que comprende el tratamiento de dichas superficies con una cantidad bacteriocidante o bacteriostáticamente efectiva de una composición antimicrobiana que comprende una lisina de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
12. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, donde la composición comprende

además uno o más antibióticos.

FIGURA 1

```

Cpl-1  MVKKNDFVQVSSHNGYDITGILEQMGTNTNIIKISESTTYLNPCLSAQVEQSNPIGFYH 60
LytA    -----MEINVS-----KLRTDLPQVGVPYRQVHAHSTG--NPHSTVQNEAD-----YH 42
          : : : **      . :      * * : * .      : . **      **      : . * * .      **

Cpl-1  FARFGGDVAEAEAREAQFFLDNVPMQVKYLVLVDYEDDPSPGDAQANTNACLRFMQMIADAGY 120
LytA    WRKD----PELGFSSHIVGNGCIMOVG-PVDNGAWDVGGGWAETAAVELIESHSTKEE 97
          : :      . *      : : : . :      * * *      * :      * . * . : * : * * . : : : : : : : :

Cpl-1  KPIYYSYKPFTHDNVDYQQILAQFPNSLWLAGYGLNDGTANFEYFSPMDGIRWWQYSSNP 180
LytA    FMTDYRLYIELLRNLADEAGLPKTLDTGSLAGIKTHEYCTNNQPNNHSDHVDPPYLAK- 156
          *      * :      : * . : :      : : * *      : :      : * :      * :      : * : :

Cpl-1  FDKNIVLLDDEEDDKPKTAGTWKQDSKGWVFRNRNNGSFPYKWEKIGGVWYYFDSKGYCL 240
LytA    WGISREQFKHDIENGLTIETGWQKNDTGYWYVHSDGSYPKDKFEKINGTWYYFDSGGYML 216
          : . .      : : : : : :      .      * : : : . * : * : : : : * : * : * * * . * . * * * * * . * * *

Cpl-1  TSEWLKDND-KWYYLKDNGAMATGWVLVGS EWYYMDDSGAMVTGWVKYKNNWYYMTNERG 299
LytA    ADRWRKHTDGNWYWFDNSGEMATGWKKIADKWYYFNEEGAMKTGWVKYKDTWYYLDAKEG 276
          : . . * * . * * : * : : : . * * * * *      : . . : * * : : : . * * * * * * * * * : . * *

Cpl-1  NMVSNEFIK--SGKGWYFMNTNGELADNP SFTKEPDGLITVA 339
LytA    AMVSNAFIQSADGTGWYYLKPDGTLADKP EFTVEPDGLITVK 318
          * * * * * * * : . * . * * * : : : : * * * * * : * * * * * * * * * * * * *
    
```

FIGURA 2

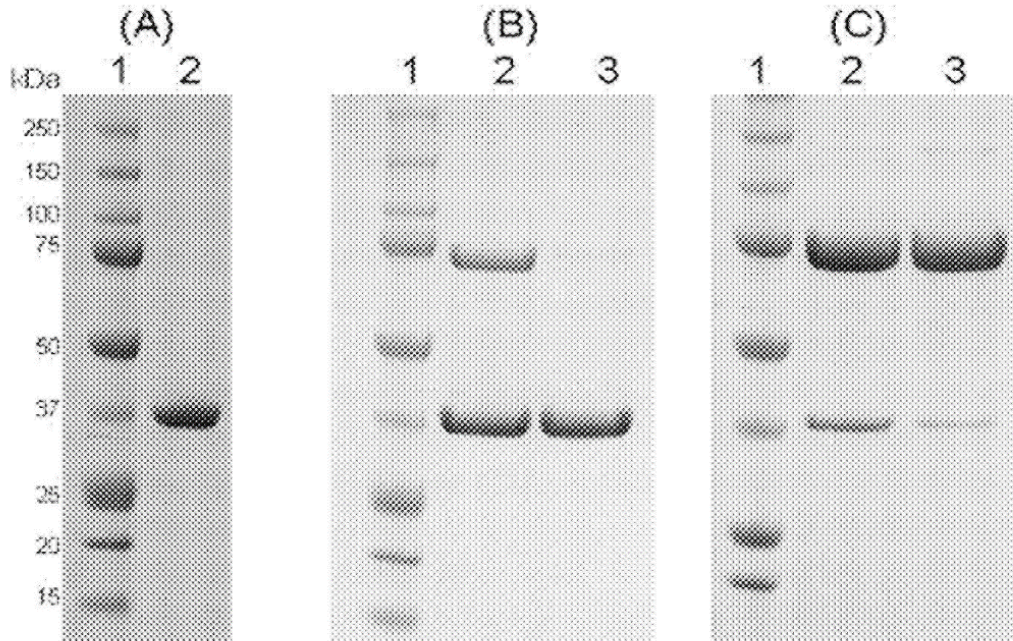


FIGURA 3

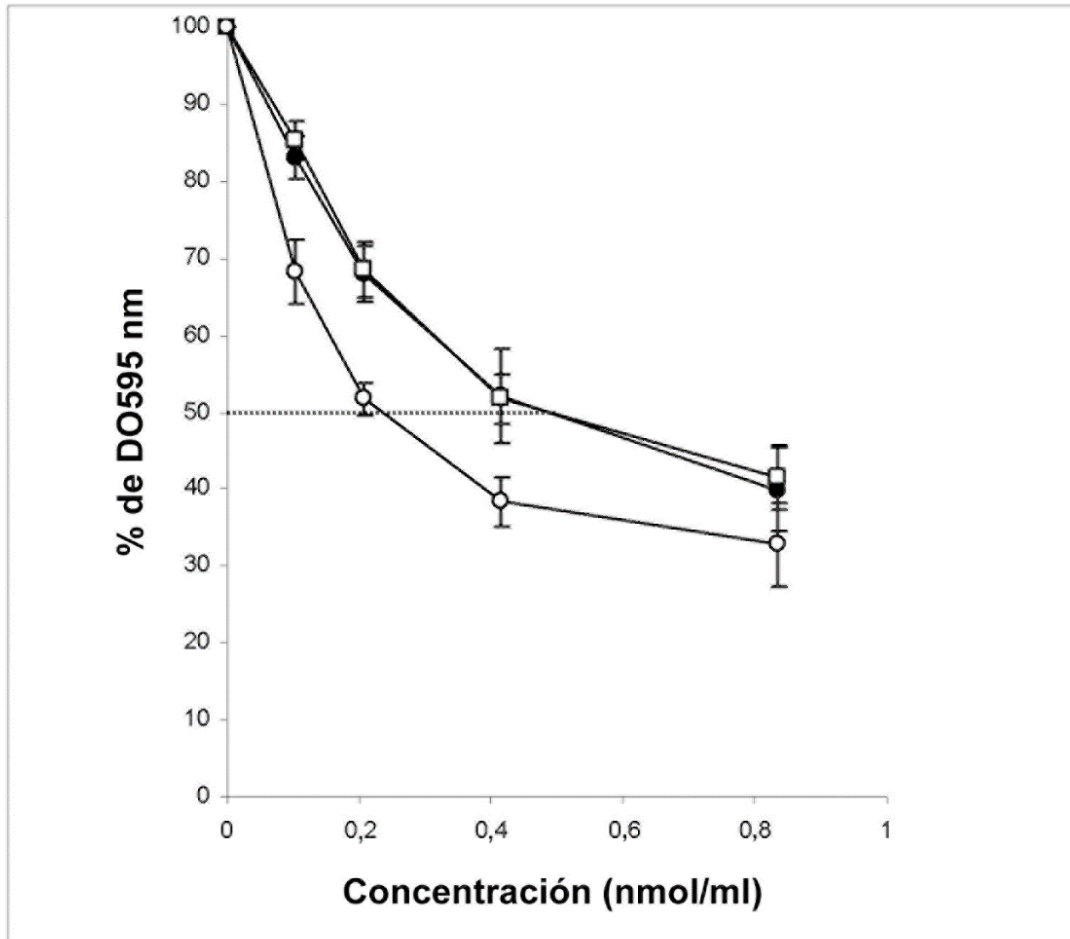


FIGURA 4

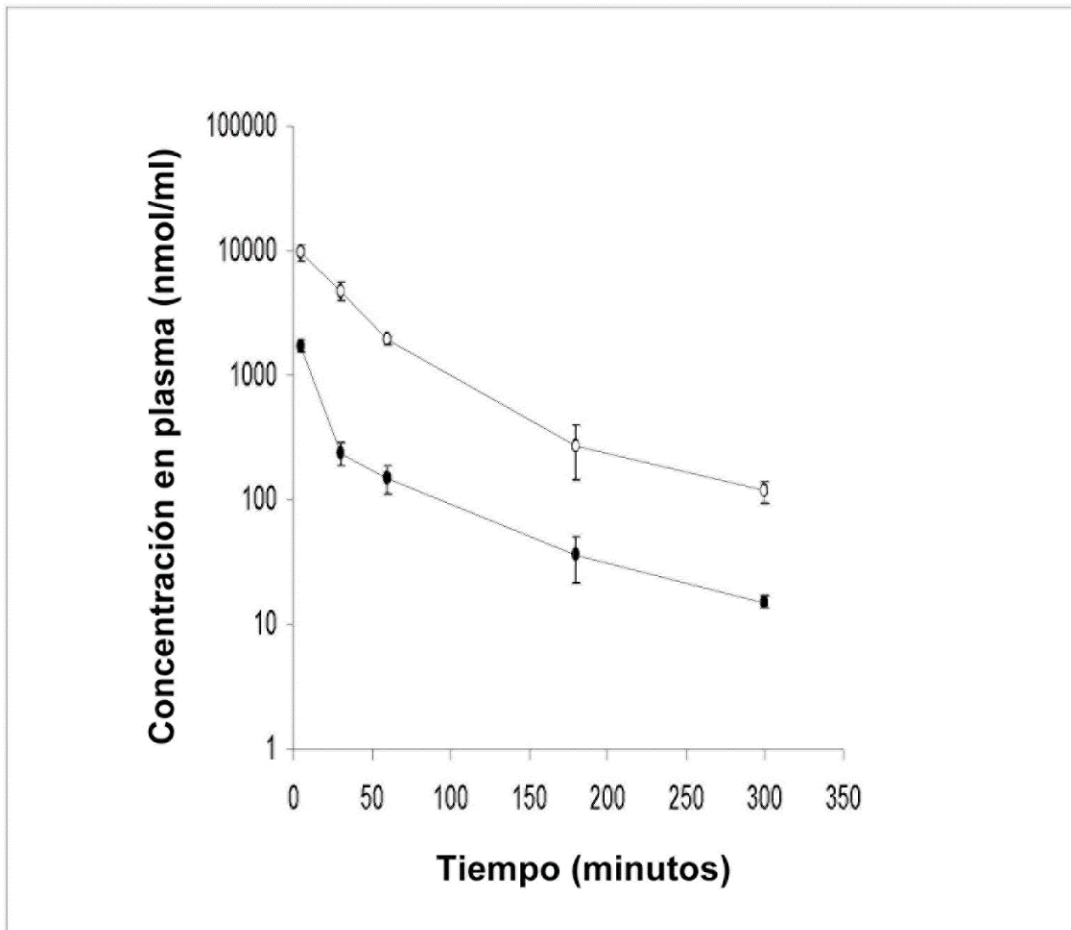


FIGURA 5

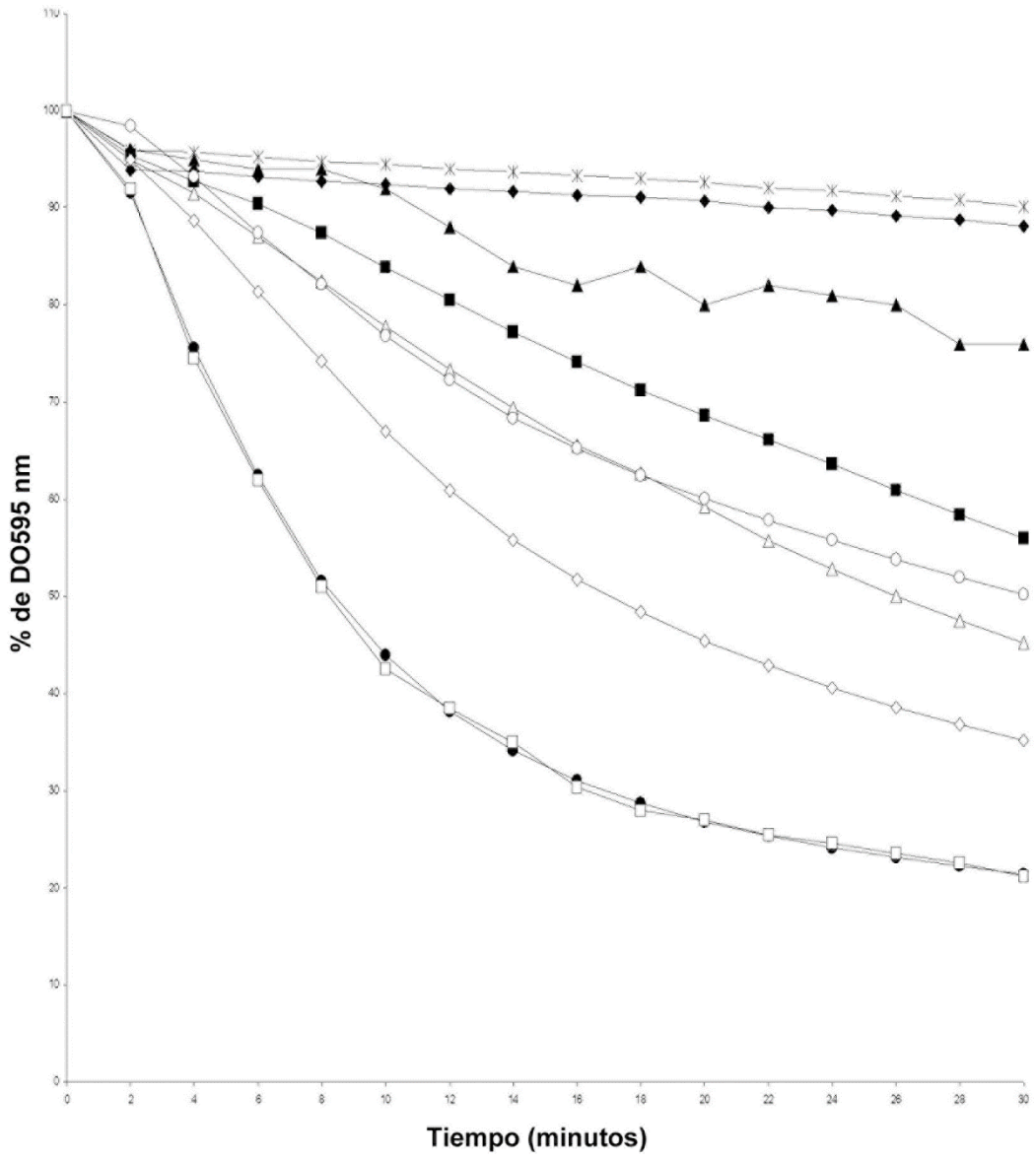


FIGURA 6

Cpl-1 MVKKNDLFVDVSSHNGYDITGILEQMGTNTIIKISESTYLNPCLSAQVEQSNPIGFYH 60
 C45S MVKKNDLFVDVSSHNGYDITGILEQMGTNTIIKISESTYLNPSLSAQVEQSNPIGFYH 60
 C45S,D324C MVKKNDLFVDVSSHNGYDITGILEQMGTNTIIKISESTYLNPSLSAQVEQSNPIGFYH 60

 Cpl-1 FARFGDVAEAEAREAQFFLDNVPMQVKYLVLVDYEDDPSGDAQANTNACLRFMQMIADAGY 120
 C45S FARFGDVAEAEAREAQFFLDNVPMQVKYLVLVDYEDDPSGDAQANTNACLRFMQMIADAGY 120
 C45S,D324C FARFGDVAEAEAREAQFFLDNVPMQVKYLVLVDYEDDPSGDAQANTNACLRFMQMIADAGY 120

 Cpl-1 KPIYYSYKPFTHDNVDYQQIILAQFPNSLWIAGYGLNDGTANFEYFSPMDGIRWWQYSSNP 180
 C45S KPIYYSYKPFTHDNVDYQQIILAQFPNSLWIAGYGLNDGTANFEYFSPMDGIRWWQYSSNP 180
 C45S,D324C KPIYYSYKPFTHDNVDYQQIILAQFPNSLWIAGYGLNDGTANFEYFSPMDGIRWWQYSSNP 180

 Cpl-1 FDKNIVLLDDEEDDKPKTAGTWKQDSKGWFRNRNGSFYPYNKWEKIGGVWYFFDSKGYCL 240
 C45S FDKNIVLLDDEEDDKPKTAGTWKQDSKGWFRNRNGSFYPYNKWEKIGGVWYFFDSKGYCL 240
 C45S,D324C FDKNIVLLDDEEDDKPKTAGTWKQDSKGWFRNRNGSFYPYNKWEKIGGVWYFFDSKGYCL 240

 Cpl-1 TSEWLKDNDKWYYLKDNGAMATGWVLVSEWYYMDDSGAMVTGWVKYKNNWYYMTNERG 299
 C45S TSEWLKDNDKWYYLKDNGAMATGWVLVSEWYYMDDSGAMVTGWVKYKNNWYYMTNERG 299
 C45S,D324C TSEWLKDNDKWYYLKDNGAMATGWVLVSEWYYMDDSGAMVTGWVKYKNNWYYMTNERG 299

 Cpl-1 NMVSNEFIKSGKGWYFMNTGELADNPSFTKEPDGLITVA 339
 C45S NMVSNEFIKSGKGWYFMNTGELADNPSFTKEPDGLITVA 339
 C45S,D324C NMVSNEFIKSGKGWYFMNTGELACNPSFTKEPDGLITVA 339

FIGURA 7

```

Cpl-1  MVKKNLDFVDVSSHNGYDITGILEQMGTTNTIIKISESTTYLNPCLSAQVEQSNPIGFYH 60
Pal      MGVDIEKGVAVWMO 13
LytA    -----MEINVS-----KLRTDLPQVGVQPYRQVHAHSTG--NPHSTVQNEAD-----YH 42

Cpl-1  FARFGGDVAEAAREAQFFLDNVPMQVKYLVLVDYEDDPSGDAQANTNACLRFMQMIADAGY 120
Pal      ARKGRVSYSMDFRDGPDSYDCSSSMYYALRSAGASSAGWAVNTEYMHAWLIENGYELISE 73
LytA    WRKD----PELGFFSHIVGNCCIMQVG-PVDNGAWDVGGGWAETAAVELIESHSTKEE 97

Cpl-1  KPIIYYSYKPFTHDNVDYQQILAQFPNSLWIAGYGLNDGTANFEYFPSMDGIRWWQYSSNP 180
Pal      NAPWDAKRGDIFIWGRKGASAGAGGHTGMFIDSDNIIHCNYAYDGI VNDHDERWYYAGQP 134
LytA    FMTDYRLYIELLRNLADEAGLPKTLDTGSLAGIKTHEYCTNNQPNHSDHVDPPYPLAK- 156

Cpl-1  FDKNIVLLDDEEDDKPKTAGTWKQDSKGWVFRNRNGSFYPYKWEKI--GGVWYFDSKGYCL 240
Pal      YYYVYRLTNANAQPAEKLG-WQKDATGFWYARANGTYPKDEFEYIEENKSWFYFDDQGYML 195
LytA    WGISREQFKHDIENGLTIE1TGWQKNDTGYWYVHSDGSYPKDKFEKI--NGTWYFDS2SGYML 216
          *      * *      * *      * *      * *      * *      * *      * *
          * *      * *      * *      * *      * *      * *      * *      * *

Cpl-1  TSEWLKDND-KWYYLKDNGAMATGWVLVGSEWYYMDDSGAMVTGWVKYKNNWYYMTNERG 299
Pal      AEKWLKHTDGNWYWFDRDGYMATSWKRIGESWYFNRDGSMTGWIKYYDNWYYCDATNG 255
LytA    ADRWRKHTDGNWYWF3DNSGEMATGWKKIADKWYFNEEGAMKTGWVKYKDTWY4YLD5AKEG 276
          * *      * *      * *      * *      * *      * *      * *      * *
          * *      * *      * *      * *      * *      * *      * *      * *

Cpl-1  NMVSNEFIK--SGKGWYFMNTNGELADNPSFTKEPDGLITVA 339
Pal      DMKSNAFIR--YNDGWYLLLPDGR6LADKPEFTVEPDGLITAKV 296
LytA    AMVSNAFIQSADGTGWY7YLLKPDGT8LADKPEFTVEPDGLITVK 318
          * * * *      * * *      * * * *      * * * *      * * * *      * * * *
          * * * *      * * *      * * * *      * * * *      * * * *      * * * *
    
```