

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10)

**PL 243304 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438431**

(22) Data zgłoszenia: **2021.07.09**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.01.16 BUP 03/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.07.31 WUP 31/2023**

(51) MKP:

**C12N 9/52** (2006.01)

**A61K 38/47** (2006.01)

**A61K 8/66** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**MIĘDZYNARODOWY INSTYTUT BIOLOGII  
MOLEKULARNEJ I KOMÓRKOWEJ,  
Warszawa, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**IZABELA SABAŁA, Skierniewice, PL  
PIOTR HENRYK MAŁECKI, Poznań, PL  
KAROLINA TROCHIMIAK, Warszawa, PL  
ELŻBIETA JAGIELSKA, Warszawa, PL  
WERONIKA AUGUSTYNIAK, Kosów Lacki, PL**

(74) Pełnomocnik:

**Grzelak Anna, Warszawa, PL**

(54) Tytuł:

**Hydrolaza peptydoglikanowa, kompozycje ją obejmujące, jej zastosowania  
oraz sposób hydrolizy ją wykorzystujący**

**PL 243304 B1**

## Opis wynalazku

### DZIEDZINA TECHNIKI

Przedmiotem wynalazku jest aktywna forma białka AurR, będąca hydrolazą peptydoglikanową zdolną do trawienia ścian bakterii Gram(+) posiadających mostki sieciujące w peptydoglikanie zbudowane z glicyny i/lub glicyny i seryny, kompozycje ją obejmujące, ich zastosowania oraz sposób hydrolizy peptydoglikanów ją wykorzystujący. Aktywna forma białka AurR, przełamuje oporność bakterii Gram(+) wobec znanych enzymów zdolnych jedynie do hydrolizy ścian komórkowych z glicynowymi mostkami sieciującymi w peptydoglikanie.

### STAN TECHNIKI

Infekcje spowodowane bakteriami z rodzaju *Staphylococcus*, w szczególności *Staphylococcus aureus*, są coraz trudniejsze do leczenia ze względu na szeroko rozpowszechnioną lekooporność. Z tych względów coraz ważniejsze jest opracowanie nowych terapii zwalczających zakażenia gronkowcowe i eliminacja nosicielstwa, szczególnie wśród personelu medycznego, lecz także opracowanie bardziej skutecznych sposobów eliminacji tej bakterii ze środowiska, w tym szpitalnego. Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* (gronkowce) są odpowiedzialne za cały szereg zakażeń u ludzi i zwierząt, a wiele gatunków *Staphylococcus* jest opornych na antybiotyki; szacuje się, że 30–50% ludzi jest nosicielami tych bakterii. Choroby dermatologiczne i zapalne mogą być powodowane przez różne gatunki bakterii, w tym gronkowce. Mogą występować spontanicznie lub np. w ranie, wrzodzie lub oparzeniu. Zakażone rany mogą stanowić zagrożenie dla życia. Dodatkowo, bakterie tworzące biofilm mogą być obecne w zakażonych ranach lub rany mogą być nimi zakażone wtórnie. Szczególnie niebezpieczne są zakażenia szczepami *Staphylococcus aureus* opornymi na antybiotyki, takimi jak szczepy MRSA (oporne na metycylinę *Staphylococcus aureus*). Zakażenia gronkowcowe są szczególnie częste w przypadku stopy cukrzycowej, odleżyn i oparzeń.

Wiadomo, że gronkowce, w szczególności *S. aureus*, są często przyczyną zatruc pokarmowych, gdyż wytwarzają peptydowe, termostabilne enterotoksyny wywołujące intoksykację. Ze względu na wielkotonażowy charakter produkcji przemysłu spożywczego, możliwe jest w nim zastosowanie enzymów niszczących gronkowce do poprawy mikrobiologicznej jakości żywności, jedynie przy niedrogiej i dużej dostępności takich enzymów. Wiadomo również, że bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, również *S. simulans*, są patogenami zwierząt takich jak krowy, owce, kozy czy konie. Podobnie jak *S. aureus*, *S. simulans* powszechnie wiązany jest z zapaleniem gruczołu mlekowego u bydła (mastitis). Mimo, że zakażenia człowieka przez *S. simulans* są rzadkie, są spotykane u osób zajmujących się zwierzętami hodowlanymi. *S. simulans* związany jest też z infekcjami kostno-stawowymi, zapaleniem wsierdza czy cukrzycowym zapaleniem kości [8].

Jednym z nowatorskich podejść eliminowania patogennych bakterii, szczególnie tych opornych na antybiotyki, jest lizowanie komórek bakteryjnych z wykorzystaniem enzymów litycznych. Znane są metody lizy komórek bakteryjnych lub uszkodzania ścian komórek bakteryjnych wymagające naruszenia struktury ściany przy pomocy specyficznych wobec niej enzymów bakteriolytycznych – hydrolaz peptydoglikanowych. Szczególnie dotyczy to bakterii Gram(+), ze względu na specyficzną budowę ich ścian komórkowych. Wiadomo, że ściany komórkowe bakterii Gram(+) różnią się między sobą rodzajem i ilością aminokwasów występujących w mostkach wiążących łańcuchy peptydoglikanów. Hydrolazy peptydoglikanowe dla swojej aktywności mogą wymagać występowania określonej kompozycji aminokwasowej i minimalnej ilości aminokwasów w mostkach sieciujących peptydoglikanów. W przypadku większości gronkowców mostek sieciujący peptydoglikanu składa się z pięciu glicyn i jest on substratem dla enzymów litycznych. Znane są hydrolazy peptydoglikanowe, jak lizostafyna i LytM, które tną mostki pięcioglicynowe charakterystyczne dla peptydoglikanów *Staphylococcus* np. *S. aureus*, i dzięki tej właściwości są one interesujące, jako potencjalne środki przeciwostronkowcowe.

Rola biologiczna lizostafyny jest dobrze poznana. Lizostafyna jest bakteriocyną wydzielaną przez *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. Dojrzałe białko jest nieaktywne w stosunku do produkującego go organizmu, ale jest bardzo efektywne w cięciu ścian *Staphylococcus aureus*. Dojrzała lizostafyna jest białkiem monomerycznym, dla którego optymalna temperatura działania enzymu wynosi około 37–40°C, pH 7,5 a punkt izoelektryczny pI wynosi 9,5 [1, 2]. Lizostafynę stosowano do niszczenia biofilmów *S. aureus* i *S. epidermidis* na sztucznych powierzchniach i testowano do pokrywania cewników [3]. W modelu mysim, lizostafyna była używana do usuwania biofilmów z cewnikowanych żył szysz-

nych i do leczenia zakażeń systemowych [4]. W modelu szczurzym (bawełniak) krem z lizostafyną efektywnie eliminował *S. aureus* z nosów zakażonych szczurów [5]. U ludzi lizostafyna była używana tylko na poziomie eksperymentalnym do leczenia zapalenia zastawki aortalnej serca spowodowanego przez gronkowca złocistego opornego na metycylinę [6].

Inny, komercyjnie dostępny enzym, Aurezyna, będący domeną katalityczną autolizyny LytM z gronkowca złocistego ma specyficzność i mechanizm działania podobne do lizostafiny [7]. Aurezyna jest endopeptydazą zdolną do trawienia wiązań w mostkach pentaglicynowych ścian komórkowych gronkowców. Posiada unikalne właściwości – jest aktywna w warunkach niskiej siły jonowej (nawet w wodzie) i w niskiej temperaturze. Z powodzeniem jest stosowana do lizy komórek gronkowców podczas izolacji DNA, RNA i białek. Dzięki zdolności do szybkiej lizy, zarówno Aurezyna, jak i inne enzymy mogą być stosowane w testach diagnostycznych do identyfikacji i oznaczania gronkowców.

Niektóre bakterie wytworzyły jednak mechanizm oporności na te enzymy, np. *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus* na produkowaną przez siebie lizostafynę [9, 10]. Jest to bardzo poważne ograniczenie we wprowadzeniu lizostafiny na rynek i wciąż poszukiwane są sposoby pokonania tego problemu [11]. Gen kodujący lizostafynę zlokalizowany jest na plazmidzie pACK1. Na tym samym plazmidzie kodowany jest gen oporności (endopeptidase resistance gene, *epr* lub lysostaphin immunity factor, *lif*). Obecność genu *lif*, również u innych gatunków gronkowców, powoduje zwiększenie zawartości seryny i zmniejszenie zawartości glicyny w ścianie komórkowej bakterii. Uważa się, że podstawienie jednej lub kilku glicyn resztami serynowymi w mostku pentaglicynowym determinuje oporność na działanie lizostafiny [12, 13]. Podobnie jak w przypadku antybiotyków, geny warunkujące oporność na lizostafynę kodowane są na ruchomych elementach genetycznych. W związku z tym, istnieje możliwość rozprzestrzeniania się oporności. Badania dowiodły, że gatunki gronkowców wrażliwe na działanie lizostafiny, po przyjęciu konstruktów zawierających gen oporności stawały się mniej wrażliwe lub całkowicie odporne na działanie tego enzymu [16, 17]. Pojawienie się potencjalnej oporności na lizostafynę i inne enzymy lityczne o takiej samej specyficzności jest jednym z głównych czynników ograniczających wykorzystanie tych enzymów w zwalczaniu gronkowców. Z tego względu, wyjątkowo istotne staje się poszukiwanie nowych enzymów bakteriolitycznych, które cechowałyby się poszerzoną specyficznością działania i były równie efektywne w lizowaniu gronkowców także ze zmodyfikowanymi mostkami sieciującymi. Bakterie, które zamiast typowych mostków pentaglicynowych, wykształciły mostki z podstawioną seryną są odporne na powszechnie stosowaną lizostafynę czy też różne formy hydrolaz M23, w tym wobec LytMCD opisaną w WO2012/144912 czy też różnych form LytMCD\_LssCWT opisanych jako Chimery A i Chimery B w WO2021/0759888. Lizostafyna nie jest aktywna względem szczepów posiadających serynę w mostkach wiążących takich jak: *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. haemolyticus* czy *S. warneri* czy *S. aureus* z wprowadzoną do mostków sieciujących seryną.

Enzym używany do zwalczania infekcji gronkowcowych u ludzi i zwierząt powinien mieć szerokie spektrum działania względem bakterii posiadających mostki sieciujące w peptydoglikanie i wykazywać aktywność hydrolazy peptydoglikanowej względem glicynowych mostków sieciujących, jak również względem mostków, w których jedna lub dwie glicyny zostały podstawione przez serynę, tj. również mostki glicynowo-serynowe – jak te występujące u *S. simulans*. Ani lizostafyna ani Aurezyna nie są jednak aktywne względem szczepów gronkowców posiadających serynę w mostkach sieciujących. Także chimery opisane w WO2021/0759888, które składają się z domeny katalitycznej LytM i domeny wiążącej ściany komórkowe lizostafiny, choć są aktywne w warunkach fizjologicznych, nie mają zdolności lizowania gronkowców z serynami w mostkach sieciujących. Dlatego poszukiwane i niezwykle potrzebne są enzymy, które miałyby zdolność cięcia nie tylko mostków glicynowych, ale także mostków glicynowych z podstawioną seryną/serynami (mostki glicynowo-serynowe).

#### UJAWNienie WYNAŁAZKU

W świetle opisanego stanu techniki celem niniejszego wynalazku jest przewyższenie wskazanych niedogodności i dostarczenie enzymu litycznego o aktywności endopeptydazy działającego względem ścian bakterii Gram(+) zawierających zarówno mostki pięcioglicynowe, jak również substytucję reszt glicynowych przez reszty serynowe w mostkach sieciujących łańcuchach peptydoglikanów, w szczególności względem *S. aureus* opornego na działanie dostępnych endopeptydaz glicylo-glicynowych, który to enzym będzie wytwarzany w sposób wydajny, będzie stabilny, zapewni wysoką specyficzność działania względem substratu oraz wysoką aktywność, jak również będzie działał efektywnie w szerokim zakresie pH.

Gen, KXA44996, kodujący białko AurR o długości 410 aminokwasów z *Staphylococcus simulans*, DSM20322 został zidentyfikowany w genomie *Staphylococcus simulans*, DSM20322 [18], wyizolowany,

sklonowany i zsekwencjonowany przez twórców niniejszego wynalazku. Białko AurR o pełnej długości składa się z trzech domen funkcjonalnych (**Fig. 1**): (1) N-terminalnej domeny regulatorowej, (2) domeny katalitycznej AurR tj. CD<sup>AurR</sup> o sekwencji charakterystycznej dla białek z rodziny M23 różnej od lizostafiny, oraz (3) domeny CWT<sup>AurR</sup> – C-terminalnej domeny wiążącej ścianę komórkową bakterii (CTW od Cell Wall Targeting). SP – jest 36 aminokwasowym peptydem sygnałnym, L – linkerem umieszczonym między CD<sup>AurR</sup> a CWT<sup>AurR</sup>.

Nieoczekiwanie okazało się, że aktywna forma AurR jest hydrolazą peptydoglikanową o rozszerzonej aktywności substratowej, która nie tylko podobnie jak LytM czy lizostafina tnie glicynowe mostki sieciujące w ścianie komórek gronkowców prowadząc do lizy komórek bakteryjnych, ale w przeciwieństwie do w/w enzymów aktywna forma AurR ma zdolności przecinania także mostków, w których jedna lub dwie glicyny zostały podstawione przez serynę/y (mostków glicynowo-serynowych). Hydrolazą peptydoglikanową w postaci aktywnej formy AurR przełamuje więc mechanizm oporności bakterii na hydroazy glicylo-glicynowe, gdy mostki sieciujące w peptydoglikanie zbudowane są z glicyny i seryny.

Twórcy wynalazku nieoczekiwanie stwierdzili, że stabilna i aktywna forma białka AurR ze *Staphylococcus simulans*, zawierająca domenę katalityczną CD<sup>AurR</sup> przewyższa wskazane niedogodności, gdyż lizuje zarówno ściany bakterii zawierające pentaglicynę, jak również te zawierające serynę lub dwie seryny w mostku sieciującym. Aktywna forma AurR jest w stanie efektywnie degradować ściany bakterii Gram(+), szczególnie *S. aureus* i *S. simulans* w szerokim zakresie warunków, w tym w środowisku podobnym do warunków fizjologicznych zarówno o niskiej jak i wysokiej konduktywności, w szerokim zakresie stężenia soli, w tym w wysokim stężeniu soli, jak również działa efektywnie w szerokim zakresie pH.

Twórcy wynalazku nieoczekiwanie stwierdzili, że aktywna forma białka AurR z *Staphylococcus simulans* zawierająca domenę katalityczną CD<sup>AurR</sup> lizuje zarówno bakterie zawierające pentaglicynę, jak i te z seryną/serynami w mostku sieciującym i jest w stanie efektywnie degradować ściany bakterii Gram(+), szczególnie *S. aureus* i *S. simulans*. Aktywne formy białka AurR według wynalazku wykazują również wysoką stabilność.

Istota niniejszego wynalazku opiera się więc na znalezieniu aktywnej formy białka AurR kodowanego przez KXA44996 z *Staphylococcus simulans* wykazującego nowe nieznane dotychczas właściwości enzymatyczne i wykazaniu, że możliwe jest wykorzystanie aktywnej formy AurR do prowadzenia proteolizy substratu peptydowego przykładowo ścian bakterii Gram(+) zawierającego resztę serynową oprócz reszt glicynowych.

Wynalazek dotyczy hydrolazy peptydoglikanowej zdolnej do trawienia ścian bakterii Gram(+) posiadających mostki sieciujące w peptydoglikanie zarówno glicynowe jak i glicynowo-serynowe zawierającej aktywną formę białka AurR, która to zawiera jako domenę katalityczną CD<sup>AurR</sup>, przy czym sekwencja aminokwasowa domeny katalitycznej CD<sup>AurR</sup> jest w co najmniej 80% identyczna z sekwencją aminokwasową przedstawioną w SEQ ID NO: 1, korzystanej sekwencja CD<sup>AurR</sup> jest w co najmniej 85%, 90%, korzystniej 95%, najkorzystniej na poziomie 98% lub więcej identyczna z sekwencją aminokwasową przedstawioną w SEQ ID NO: 1; przy czym mostki sieciujące składają się z co najmniej trzech glicyn lub glicyn i seryny/seryn.

W korzystnej hydrolazie peptydoglikanowej aktywna forma białka AurR jest w postaci jednodomenowej aktywnej formy AurR zawierającej domenę katalityczną CD<sup>AurR</sup>, ale nie zawierającej domeny wiążącej ścianę komórkową bakterii CWT<sup>AurR</sup>.

W korzystnej hydrolazie peptydoglikanowej aktywną formę AurR w postaci jednodomenowej stanowi domena katalityczna AurR<sup>158-295</sup> o SEQ ID NO: 1.

W korzystnej hydrolazie peptydoglikanowej że aktywną formę AurR w postaci jednodomenowej stanowi AurR- o SEQ ID NO: 4.

W korzystnej hydrolazie peptydoglikanowej aktywna forma białka AurR jest w postaci dwudomenowej aktywnej formy AurR zawierającej domenę katalityczną CD<sup>AurR</sup> oraz domenę wiążącą ścianę komórkową bakterii CWT<sup>AurR</sup>, przy czym sekwencja aminokwasowa domeny wiążącej ścianę komórkową bakterii CWT<sup>AurR</sup> jest w co najmniej 80% identyczna z sekwencją aminokwasową przedstawioną w SEQ ID NO: 2, korzystanej sekwencja CWT<sup>AurR</sup> jest w co najmniej 85%, 90%, korzystniej 95%, najkorzystniej na poziomie 98% lub więcej identyczna z sekwencją aminokwasową przedstawioną w SEQ ID NO: 2.

W korzystnej hydrolazie peptydoglikanowej sekwencja aminokwasowa domeny katalitycznej CD<sup>AurR</sup> połączona jest z sekwencją domeny wiążącej ścianę komórkową bakterii CWT<sup>AurR</sup> poprzez sekwencję aminokwasową linkera, przy czym korzystną sekwencję linkera stanowią aminokwasy 139–159 z SEQ ID NO: 3.

W korzystnej hydrolazie peptydoglikanowej aktywną formę AurR w postaci dwudomenowej stanowi AurR<sup>158-410</sup> o SEQ ID NO: 3.

W korzystnej hydrolazie peptydoglikanowej aktywną formę AurR w postaci dwudomenowej stanowi AurR+o SEQ ID NO: 5.

Wynalazek również dotyczy konstruktu genetycznego kodującego hydrolazę peptydoglikanową według wynalazku.

Wynalazek dotyczy również kompozycji do proteolizy ścian komórkowych bakterii Gram(+), która zawiera hydrolazę peptydoglikanową według wynalazku oraz nośnik, przy czym kompozycja przeznaczona jest do proteolizy ścian komórkowych bakterii Gram(+) posiadających w peptydoglikanie mostki sieciujące glicynowe i/lub glicynowo-serynowe.

Wynalazek dotyczy również kompozycji farmaceutycznej zawierającej hydrolazę peptydoglikanową według wynalazku oraz farmaceutycznie dopuszczalną substancję pomocniczą do zastosowania jako lek do leczenia chorób i/lub stanów zapalnych wywołanych bakteriami Gram(+) posiadającymi glicynowe i/lub glicynowo-serynowe mostki sieciujące w peptydoglikanie, przy czym korzystnie bakterie Gram(+) są wybrane z rodzaju *Staphylococcus*, korzystnie *S. aureus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*.

Wynalazek dotyczy również kompozycji kosmetycznej lub pielęgnacyjnej do zastosowań kosmetycznych, pielęgnacyjnych i higienicznych u ludzi i/lub zwierząt, która zawiera hydrolazę peptydoglikanową według wynalazku, przy czym kompozycja zawiera dodatkowo co najmniej jeden nośnik dopuszczony w zastosowaniach kosmetycznych, pielęgnacyjnych, higienicznych u ludzi i/lub zwierząt i jest przeznaczona do stosowania zewnętrznego.

Wynalazek dotyczy również kompozycji zawierającej hydrolazę peptydoglikanową według wynalazku oraz nośnik do zastosowania jako środek antyseptyczny, środek przeciwbakteryjny, środek do odkażania powierzchni stosowany wobec bakterii Gram(+) posiadających glicynowe i/lub glicynowo-serynowe mostki sieciujące w peptydoglikanie, przy czym korzystnie kompozycja stosowana jest wobec bakterii Gram(+) z rodzaju *Staphylococcus*, korzystnie *S. aureus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*.

Korzystnie kompozycja do zastosowania jako środek antyseptyczny, środek przeciwbakteryjny, środek do odkażania powierzchni, jest w postaci płynu, emulsji, żelu, płynu do rozpylania, lotionu, nawilżonej chustki lub opatrunku, korzystnie opatrunek jest w postaci plastra z opatrunkiem, plastra z hydrożelem, gazy z naniesioną kompozycją, opatrunku hydrokoloidowego, opatrunku hydrowłóknistego, opatrunku alginianowego, bandaża z naniesioną kompozycją.

Wynalazek dotyczy również niemedycznego zastosowania hydrolazy peptydoglikanowej według wynalazku i/lub kompozycji do proteolizy ścian komórkowych bakterii Gram(+) według wynalazku do proteolizy ścian komórkowych bakterii Gram(+) posiadających glicynowe i/lub glicynowo-serynowe mostki sieciujące w peptydoglikanie, przy czym korzystnie bakteriami Gram(+) są bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, korzystnie *S. aureus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*.

Wynalazek dotyczy również niemedycznego zastosowania hydrolazy peptydoglikanowej według wynalazku i/lub kompozycji do proteolizy ścian komórkowych bakterii Gram(+) według wynalazku jako środka bakteriostatycznego lub bakteriobójczego przeciwko bakteriom Gram(+), szczególnie z rodzaju *Staphylococcus*, korzystnie *S. aureus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, posiadających glicynowe i/lub glicynowo-serynowe mostki sieciujące w peptydoglikanie, przy czym korzystnie środek stosowany jest w przemyśle spożywczym, szczególnie jako dodatek do żywności dla ludzi i/lub zwierząt lub do odkażania powierzchni i pomieszczeń, które mają kontakt z żywnością lub półproduktami żywnościowymi, korzystnie środek stosowany jest w przemyśle mleczarskim i przetworach mlecznych.

W korzystnym niemedycznym zastosowaniu hydrolazy peptydoglikanowej według wynalazku i/lub kompozycji do proteolizy ścian komórkowych bakterii Gram(+) według wynalazku jako środka bakteriostatycznego lub bakteriobójczego przeciwko bakteriom Gram(+), środek stosowany jest w przemyśle kosmetycznym, korzystnie jako dodatek do kosmetyków polepszający ich jakość mikrobiologiczną, jako dodatek do płynów, kremów, mleczek, lotionów.

W korzystnym niemedycznym zastosowaniu hydrolazy peptydoglikanowej według wynalazku i/lub kompozycji do proteolizy ścian komórkowych bakterii Gram(+) według wynalazku jako środka bakteriostatycznego lub bakteriobójczego przeciwko bakteriom Gram(+), środek stosowany jest w ochronie

zdrowia, do odkażania powierzchni narzędzi i przyrządów stosowanych w medycynie i diagnostyce, oraz innych powierzchni, w szczególności powierzchni szpitalnych i laboratoryjnych.

W korzystnym niemedycznym zastosowaniu hydrolazy peptydoglikanowej według wynalazku i/lub kompozycji do proteolizy ścian komórkowych bakterii Gram(+) według wynalazku jako środka bakteriostatycznego lub bakteriobójczego przeciwko bakteriom Gram(+), środek stosowany jest jako środek bakteriostatyczny lub bakteriobójczy w postaci płynu, emulsji, żelu, płynu do rozpylania, lotionu, nawilżonej chustki.

Wynalazek dotyczy również sposobu hydrolizy peptydoglikanów posiadających glicynowe i/lub glicynowo-serynowe mostki sieciujące, przy czym sposób obejmuje etapy, w których

- a) w środowisku wodnym kontaktuje się aktywną formę AurR według wynalazku z substratem peptydowym posiadającym glicynowe i/lub glicynowo-serynowe mostki sieciujące w peptydoglikanie;
- b) hydrolizuje się substrat peptydowy posiadający glicynowe i/lub glicynowo-serynowe mostki sieciujące w peptydoglikanie.

W korzystnym sposobie hydrolizy peptydoglikanów hydrolizowane są peptydoglikany ścian komórkowych bakterii Gram(+), korzystnie z rodzaju *Staphylococcus*, korzystnie *S. aureus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*.

W korzystnym sposobie hydrolizy peptydoglikanów etap b) prowadzi się w temperaturze od 4°C do 45°C.

### SZCZEGÓŁOWE PRZEDSTAWIENIE WYNALAZKU

Termin „aktywna forma AurR” zgodnie z niniejszym opisem oznacza białka, polipeptydy, peptydy lub rekombinowane białka, polipeptydy i peptydy o aktywności hydrolazy peptydoglikanowej zdolnej do trawienia ścian bakterii Gram(+) posiadających mostki sieciujące w peptydoglikanie zarówno glicynowe, jak i glicynowo-serynowe, które to obejmują domenę katalityczną CD<sup>AurR</sup> o sekwencji aminokwasowej identycznej lub wykazującej wysoką identyczność do sekwencji aminokwasowej zawierającej aminokwasy od pozycji 158 do 295 w wyjściowym białku AurR kodowanym przez KXA44996 (co odpowiada SEQ ID NO: 1, oraz aa 1-138 SEQ ID NO: 2), korzystnie na poziomie co najmniej 80%, 85%, 90%, korzystnie 95%, najkorzystnie na poziomie 98% lub więcej identyczności.

Przykładowe, opisywane w niniejszym opisie w przykładach wykonania, aktywne formy AurR dotyczące AurR<sup>158-295</sup> (SEQ ID NO: 1), AurR<sup>158-410</sup> (SEQ ID NO: 3), AurR- (SEQ ID NO: 4), AurR+ (SEQ ID NO: 5) wykazują aktywność proteolityczną endopeptydazy względem mostków sieciujących złożonych z glicyny, jak również z substytucją seryny/seryn. Jest oczywiste, że pewne zmiany w sekwencji aminokwasowej polipeptydu aktywnej formy AurR czy też w sekwencji nukleotydowej kodującej taki polipeptyd skutkujące zmianą w sekwencji aminokwasowej nie będą wpływały na zmianę aktywności polipeptydu, szczególnie jeśli zmiany te nie dotyczą centrum aktywnego białka.

Aktywna forma AurR może być (i) jednodomenową aktywną formą AurR, gdy posiada jedynie domenę katalityczną CD<sup>AurR</sup> – korzystnie na poziomie co najmniej 80%, 85%, 90%, korzystnie 95%, najkorzystnie na poziomie 98% lub więcej identyczności z SEQ ID NO: 1, przykładowo jednodomenową aktywną formą AurR są AurR<sup>158-295</sup> o SEQ ID NO: 1, AurR- o SEQ ID NO: 4, lub (ii) dwudomenową aktywną formą AurR, gdy posiada zarówno domenę katalityczną CD<sup>AurR</sup> wykazującą na poziomie aminokwasowym co najmniej 80%, 85%, 90%, korzystnie 95%, najkorzystnie na poziomie 98% lub więcej identyczności z SEQ ID NO: 1 jak i domenę wiążącą ścianę komórkową bakterii CWT<sup>AurR</sup> o sekwencji wykazującą na poziomie aminokwasowym co najmniej 80%, 85%, 90%, korzystnie 95%, najkorzystnie na poziomie 98% lub więcej identyczności z SEQ ID NO: 2, lub stanowiącą AurR<sup>317-410</sup> SEQ ID NO: 2, przykładową dwudomenową aktywną formą AurR jest AurR<sup>158-410</sup> o SEQ ID NO: 3, AurR+ o SEQ ID NO: 5.

Dwudomenowa aktywna forma AurR dzięki domenie CWT<sup>AurR</sup> zachowuje aktywność w szerszym zakresie pH czy siły jonowej w porównaniu do lizostafiny czy aktywnej formy AurR pozbawionej domeny CWT<sup>AurR</sup>. Z kolei jednodomenowa aktywna forma AurR jest bardziej stabilna podczas przechowywania w temperaturze 37°C.

Jako warunki o niskiej konduktywności należy rozumieć konduktywność poniżej 10 mS/cm, jako warunki o wysokiej konduktywności należy rozumieć konduktywność powyżej 10 mS/cm.

Jako „substrat peptydowy” czy „substrat białkowy” dla aktywnej formy AurR, zgodnie z niniejszym opisem należy rozumieć peptyd, polipeptyd czy białko zbudowane z co najmniej trzech glicyn lub glicyn i seryny/seryn, które są rozpoznawane i cięte przez aktywną formę AurR. Substratem peptydowym dla

aktywnej formy AurR będą więc w szczególności mostki glicynowe lub glicynowo-serynowe w peptydoglikanach bakterii Gram(+) – *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. aureus* jak również zawierające serynę w mostkach sieciujących, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus haemolyticus* i inne.

Do bakterii Gram(+), które zawierają glicyny i ewentualnie seryny w mostkach sieciujących zaliczane są niektóre bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, do których należą gatunki *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. roseus*, *S. carnosus*, *S. lactis*, *S. saprophyticus* oraz z rodzaju *Micrococcus* takie jak *M. caseolyticus*, *M. candidans*, *M. naucinus*, *M. verna*.

Analiza biochemiczna wykazała, że pełnej długości białko AurR nie jest aktywne. Aktywność wykazuje jedynie aktywna forma białka AurR czyli formy enzymu

- (i) zawierające domenę katalityczną CD<sup>AurR</sup> z dołączoną domeną CWT<sup>AurR</sup> wiążącą ściany komórkowe bakterii, przykładowo AurR<sup>158-410</sup>, AurR<sup>+</sup>, który jest aktywny w warunkach reakcji w środowisku o wysokiej konduktywności; jak i w warunkach niskiej konduktywności
- (ii) aktywne formy białka AurR zawierające jedynie domenę katalityczną CD<sup>AurR</sup>, przykładowo AurR<sup>158-295</sup>, Aur<sup>-</sup>, które to są najbardziej aktywne w warunkach niskiej konduktywności. Preferowaną aktywną formą białka AurR jest polipeptyd AurR<sup>158-295</sup>, AurR<sup>158-410</sup>, AurR<sup>-</sup>, AurR<sup>+</sup>.

Zgodnie z wynalazkiem w sposobie proteolizy, zwłaszcza ścian komórek bakteryjnych Gram(+), kontaktuje się aktywną formę białka AurR z substratem peptydowym, korzystnie ze ścianami bakterii Gram(+), w środowisku wodnym o zróżnicowanej konduktywności. W korzystnym sposobie proteolizy kontaktowanie prowadzone jest w temperaturze w zakresie od około 0°C, korzystnie od około 4°C do około 45°C, korzystnie w zakresie 21°C – 37°C. Ponadto pH środowiska reakcji korzystnie mieści się w zakresie odpowiadającym pH od około 6 do około 9, zwłaszcza mieści się w zakresie od około 7 do około 9. Korzystnie bakteriami Gram(+) są bakterie należące do rodzaju *Staphylococcus*, korzystnie gatunki wybrane z grupy obejmującej: *S. aureus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. roseus*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*.

Zgodnie z wynalazkiem kompozycja z aktywną formą białka AurR stosowana jest jako środek bakteriostatyczny lub bakteriobójczy, zwłaszcza przeciwko bakteriom Gram(+), szczególnie z rodzaju *Staphylococcus*, zawierającym mostki pięcioglicynowe, jak i takie z substytucją serynową. Korzystna kompozycja jest przeznaczona do odkażania powierzchni, korzystnie jest w postaci płynu, emulsji, żelu, płynu do rozpylania, lotionu lub nawilżonej chustki. Kompozycja może być uzupełniona o odpowiedni nośnik, środek konserwujący, środek zapachowy, bufor, jak również inne składniki użyteczne w eliminacji bakterii w szczególności detergenty, rozpuszczalniki, antybiotyki, bakteriocyny.

Zgodnie z wynalazkiem kompozycja z aktywną formą białka AurR stosowana jest jako środek bakteriostatyczny lub bakteriobójczy w przemyśle spożywczym. Środek stosowany jest szczególnie jako dodatek do żywności dla ludzi i zwierząt lub do odkażania powierzchni.

Zgodnie z wynalazkiem kompozycja z aktywną formą białka AurR stosowana jest jako środek bakteriostatyczny lub bakteriobójczy w ochronie zdrowia. Środek stosowany jest szczególnie do odkażania powierzchni narzędzi i przyrządów stosowanych w medycynie i diagnostyce, oraz innych powierzchni, w szczególności powierzchni szpitalnych i laboratoryjnych, korzystnie stosowany jest przeciwko bakteriom Gram(+), szczególnie należącym do rodzaju *Staphylococcus*, zawierających zarówno mostki pięcioglicynowe jak również substytucję reszt glicynowych przez reszty serynowe w mostkach sieciujących łańcuchy peptydoglikanów.

Zgodnie z wynalazkiem aktywna forma białka AurR stosowana jest do izolacji struktur komórkowych z bakterii Gram(+). Taka izolacja struktur komórkowych możliwa jest m.in. dla bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, zawierających zarówno mostki pięcioglicynowe jak również substytucję reszt glicynowych przez reszty serynowe w mostkach wiążącym łańcuch peptydoglikanów, zwłaszcza z gatunków wybranych z grupy obejmującej: *S. aureus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. roseus*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*.

Zgodnie z wynalazkiem aktywna forma białka AurR stosowana jest w diagnostyce bakterii Gram(+) zwłaszcza bakterii należących do rodzaju *Staphylococcus*.

Zgodnie z wynalazkiem aktywna forma białka AurR stosowana jest do impregnacji lub pokrycia powierzchni narażonych na kontakt z bakteriami Gram(+).

Zgodnie z wynalazkiem aktywna forma białka AurR wchodzi w zestaw do lizy bakterii Gram(+). Liza bakterii prowadzona jest w celu izolacji struktur komórkowych z bakterii Gram(+), w szczególności DNA, RNA, białek, peptydów, glikopeptydów, lipidów lub użytecznych metabolitów.

Aktywna forma AurR może być stosowana jako środek bakteriostatyczny lub bakteriobójczy w medycynie, weterynarii i diagnostyce. Środek bakteriostatyczny lub bakteriobójczy obejmujący aktywną formę AurR będzie stosowany przeciwko bakteriom Gram(+), korzystnie należącym do rodzaju *Staphylococcus*, zawierających zarówno mostki pięcioglicynowe jak również substytucję reszt glicynowych przez reszty serynowe w mostkach sieciujących łańcuchy peptydoglikanów. Taki środek bakteriostatyczny lub bakteriobójczy stosowany będzie do odkażania powierzchni narzędzi i przyrządów stosowanych w medycynie, weterynarii i diagnostyce, powierzchni szpitalnych i laboratoryjnych oraz jako środek powierzchniowo czynny na powierzchnie, które mogą być zanieczyszczone bakteriami. Taki środek może być stosowany sam albo w kombinacji z innymi składnikami użytecznymi w eliminacji bakterii w szczególności detergentami, rozpuszczalnikami, antybiotykami, bakteriocynami lub innymi enzymami. Stosowany środek może obejmować odpowiedni nośnik, stabilizator, bufor lub inne dodatki. Aktywna forma może być stosowana jako środek bakteriostatyczny lub bakteriobójczy w postaci płynu, emulsji, żelu, płynu do rozpylania, lotionu, nawilżonej chusteczki i im podobnych.

Aktywna forma AurR może być stosowana jako środek do diagnostyki określonych gatunków bakterii Gram(+), korzystnie należących do rodzaju *Staphylococcus* szczególnie gatunków takich jak przykładowo: *S. aureus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. roseus*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*. Aktywna forma AurR może być stosowana jako narzędzie do prowadzenia specyficznej proteolizy bakterii w celu bezpośredniej diagnostyki gatunków lub szczepów bakteryjnych jak również w etapie wstępnej lizy komórek w celu dalszej diagnostyki przykładowo metodami takimi jak PCR, hybrydyzacja kwasów nukleinowych, metodami immunologicznymi, i immunofluorescencyjnymi, ELISA i metodami opartymi na zawartości komórek bakteryjnych jak oceny enzymatyczne i inne.

Aktywna forma AurR może być stosowana jako narzędzie do naruszania ścian komórkowych bakterii Gram(+) przykładowo w celu izolacji struktur komórkowych z bakterii Gram(+). Naruszanie ścian komórkowych bakterii w celu ich lizy może być wspomagane dodaniem detergentów, czy innych czynników osłabiających strukturę ściany komórkowej, jak innych enzymów. Naruszanie ścian komórkowych może być również prowadzone w celu uzyskania protoplastów, umożliwienia transformacji komórki bakteryjnej, izolacji materiału genetycznego, białek jak i użytecznych metabolitów przykładowo długolącuchowych węglowodanów.

Aktywna forma AurR będzie więc wchodziła w skład i stosowana w zestawach przeznaczonych do naruszania ścian komórkowych bakterii Gram(+) przykładowo w celu izolacji struktur komórkowych z bakterii Gram(+). Takie zestawy są również objęte zakresem wynalazku.

Aktywna forma AurR może być stosowana jako środek bakteriostatyczny lub bakteriobójczy w przemyśle spożywczym. Taki środek bakteriostatyczny lub bakteriobójczy stosowany będzie jako dodatek do żywności dla ludzi i zwierząt, do odkażania powierzchni, które mają kontakt z żywnością w szczególności sprzętu, narzędzi i wyposażenia wykorzystywanego w przemyśle spożywczym jak i pomieszczeń, które mają kontakt z żywnością lub półproduktami. Aktywna forma AurR będzie szczególnie stosowana w przemyśle mleczarskim i przetworach mlecznych.

Aktywna forma AurR będzie również stosowana do impregnacji lub pokrycia powierzchni narażonych na kontakt z bakteriami Gram(+). Aktywna forma AurR może być stosowana jako połączona z, lub dodana do, nośników typu polimery, kopolimery czy nanonośniki jak nanokulki czy nanorurki, przykładowo nanorurki węglowe. Pokrywane lub impregnowane powierzchnie mogą dotyczyć najróżniejszych powierzchni przykładowo pomieszczeń, narzędzi, maszyn, urządzeń, sprzętu medycznego, diagnostycznego czy laboratoryjnego. Takie pokryte lub zaimpregnowane powierzchnie warstwą obejmującą aktywną formę AurR będą przez dłuższy czas działały bakteriobójczo i/lub bakteriostatycznie na bakterie Gram(+).

Aktywna forma AurR może być stosowana jako środek bakteriostatyczny lub bakteriobójczy w przemyśle kosmetycznym, środek bakteriostatyczny lub bakteriobójczy stosowany będzie jako dodatek do kosmetyków polepszający ich jakość mikrobiologiczną, jako dodatek do płynów, kremów, mleczek, lotionów, lub jako środek do odkażania powierzchni, lub do odkażania różnych powierzchni, sprzętu, narzędzi i wyposażenia wykorzystywanego w przemyśle kosmetycznym.

#### Dojrzała – forma białka AurR (KXA44996)

Zarówno lizostafyna jak i wyjściowe białko AurR produkowane są w formie trzydomenowej, i wykazują co najwyżej bardzo niską aktywność. AurR jest aktywna w postaci dojrzałej, składającej się z dwóch domen – domeny katalitycznej (CD<sup>AurR</sup>) i domeny wiążącej ścianę komórkową (CWT<sup>AurR</sup>). W postaci dwudomenowej została wyprodukowana i wykorzystana w przykładach AurR+, podczas gdy Aur- jest białkiem jednodomenowym z domeną katalityczną.



#### Rozszerzona aktywność aktywnej formy AurR

Zarówno lizostafyna jak i aktywna forma AurR są aktywne względem bakterii zawierających mostki pięcioglicynowe w peptydoglikanach jak np. te u *S. aureus*. To co było nieoczywiste i zaskakujące to dodatkowa aktywność aktywnej formy białka AurR, wobec gronkowców ze ścianami komórkowymi, w których mostki sieciujące zbudowane są zarówno z glicyn, jak i seryn, np. w szczepie *S. simulans* CCM3583.

#### Brak domeny wiążącej ścianę komórkową CWT<sup>AurR</sup> w aktywnej formie AurR

Zarówno lizostafyna, jak i aktywna forma AurR są aktywne względem bakterii zawierających mostki pentaglicynowe w peptydoglikanach, jak np. te u *S. aureus*. Białka te rozpoznają mostki jako takie, prawdopodobnie przynajmniej częściowo poprzez interakcje z rowkiem w centrum aktywnym. Lizostafyna posiada domenę CWT podobnie jak dwudomenową aktywna forma AurR<sup>+</sup>, która także posiada własną domenę wiążącą ścianę komórkową CVT<sup>AurR</sup>, dzięki której zachowuje aktywność w szerszym zakresie pH czy siły jonowej w porównaniu do lizostafiny czy aktywnej formy AurR<sup>-</sup> pozbawionej domeny CWT<sup>AurR</sup>. Z kolei białko jednodomenowe, aktywna forma AurR<sup>-</sup> z domeną CD<sup>AurR</sup>, ale bez domeny CWT<sup>AurR</sup>, jest bardziej stabilna podczas przechowywania w temperaturze 37°C i działa szybciej w optymalnych warunkach pH i siły jonowej.

#### Aktywna forma AurR lizuje efektywnie żywe komórki *S. aureus*

Twórcy wykazali, że aktywne formy AurR podane z zewnątrz efektywnie lizują żywe komórki bakterii Gram(+), zarówno *S. aureus*, jak i *S. simulans*, wiążąc się i prowadząc proteolizę substratów peptydowych ich ścian komórkowych. Podana z zewnątrz aktywna forma białek AurR jednodomenowa lub dwudomenowa hamuje dalszy wzrost gronkowców i działała jako środek bakteriostatyczny i bakterio-bójczy prowadząc do lizy komórek *S. aureus* i *S. simulans*. Zostało to potwierdzone w przeprowadzonych testach lizowania ścian komórkowych poprzez pomiary zmiany gęstości optycznej zawiesiny komórkowej i monitorowanie redukcji liczby tworzonych kolonii. Wcześniejsze doświadczenia wykazały jedynie zdolność do degradowania ścian komórkowych zawierających pentaglicynę przez lizostafynę. Testy wykazały, że jedno i dwudomenowe aktywne formy AurR są aktywne wobec szczepu *S. simulans* CCM3583, który posiada mostki sieciujące zawierające reszty glicynowe i reszty serynowe i lizuje komórki bakteryjne z dużo większą efektywnością niż lizostafyna.

#### Aktywność aktywnej formy AurR i lizostafiny zależy w różny sposób od pH

Aktywność określonej hydrolazy peptydoglikanowej była wyznaczona w teście lizowania ścian komórkowych *S. aureus* i *S. simulans* poprzez pomiary zmian gęstości optycznej zawiesiny komórkowej.

Prawdopodobnie ze względu na pozostałą aktywność enzymatyczną innych enzymów w ścianach komórkowych obserwowano nieznaczne zmniejszenie zmętnienia również w kontroli, przy nieobecności egzogennie dodanego enzymu. Dlatego wszystkie wartości OD mierzone przy długości fali 595 nm były wyrażone jako procent kontroli. Wartość zbliżona do 100% wskazuje bardzo małą aktywność, podczas gdy niskie OD wskazuje na wysoką aktywność enzymu. Lizostafyna była bardzo efektywna w pH około 7–9 i nieco mniej w pH 10 względem komórek *S. aureus*. Zakres aktywności dwudomenowej aktywnej formy białka AurR względem komórek *S. aureus* jest znacznie szerszy i znajduje się w całym testowanym zakresie od pH 5.4 do pH 10.9, będąc najbardziej aktywnym przy pH 7–10. Jednodomenowa aktywna forma białka AurR jest aktywna w przedziale pH 6–8, zachowując największą aktywność w pH 6–7. Większy reżim obserwuje się przy lizie komórek *S. simulans*, gdzie lizostafyna posiada nieznaczną aktywność w przedziale pH 5,4–8, podczas gdy dwudomenową aktywna forma białka AurR lizuje komórki *S. simulans* znacznie efektywniej w pH 5,4–8, przy optimum w pH 7–8. Jednodomenowa aktywna forma białka AurR wykazuje wysoką aktywność w zakresie pH 5,4–8, największą aktywność w pH około 7.

#### Zależność aktywności aktywnej formy białka AurR i lizostafiny od konduktywności (przewodności właściwej) środowiska reakcji

Nieoczekiwanie okazało się, że wydajność lizy bakterii przez aktywną formę białka AurR zależy w oczywisty sposób od konduktywności (przewodności właściwej) środowiska reakcji (**Fig. 4**), przy czym ta zależność jest zmienna w zależności od typu lizowanych komórek, *S. aureus* czy *S. simulans*. W buforach o niskiej konduktywności degradacja ścian komórkowych *S. aureus* przez jednodomenową aktywną formę AurR jest bardziej efektywna, w przeciwieństwie do dwudomenowej aktywnej formy AurR

która działa najlepiej w buforach o wyższej konduktywności natomiast jest mniej skuteczna w buforach o niskiej konduktywności.

Konduktywność odzwierciedla oba parametry łącznie tj. stężenie jonów i ich ruchliwość. Sprawdzono wpływ konduktywności na aktywność jednodomenowej i dwudomenowej aktywnej formy AurR w roztworach o zmieniającej się sile jonowej przez zmianę stężenia NaCl w zakresie od 0 do 250 mM. Liza komórek *S. simulans* przez dwudomenową aktywną formę AurR jest najbardziej efektywna przy umiarkowanej i niskiej sile jonowej, od 0,1 mS/cm do 10 mS/cm podczas gdy efektywność lizy komórek *S. aureus* nieznacznie się różni w przedziale od 0,1 mS/cm do 20 mS/cm.

#### Zależność aktywności aktywnej formy AurR od temperatury

Wykazano, że zarówno jedno i dwudomenowe aktywne formy AurR są białkami stabilnymi i działającymi efektywnie w szerokim zakresie temperatur od około 4°C do około 45°C. Enzymy te działają już w temperaturze 4°C.

Cytowane w opisie publikacje oraz podane w nich odniesienia są również niniejszym włączone jako referencje.

#### **KRÓTKI OPIS FIGUR RYSUNKU**

Dla lepszego zrozumienia wynalazku, został on zilustrowany w przykładach wykonania oraz na związanych figurach rysunku, na których:

**Fig. 1.** przedstawia (A) schematycznie organizację domen w białku AurR o pełnej długości kodowanym przez gen z locus KXA44996: SP – peptyd sygnałny, ND – domena N-terminalna, CD – domena katalityczna, CWT – domena rozpoznająca ściany komórkowe, L – linker łączący CD i CWT. Zakresy wzięte w klamrę oznaczają zasięg domenowy przedstawionych białek: AurR- jednodomenowej aktywnej formy AurR składającej się z domeny katalitycznej CD<sup>AurR</sup> i AurR+ dwudomenowej aktywnej formy AurR składającej się z domeny katalitycznej CD<sup>AurR</sup> połączonej linkerem (L) z domeną rozpoznającą ścianę komórkową CWT<sup>AurR</sup>; (B) szczegółowy zakres domen i sekwencja AurR+. (C) przedstawia przyrównanie sekwencji aminokwasowych Chimery A (opisanej w WO2021/0759888) z AurR+ oraz (D) Lss z AurR+ wraz z podaniem statystyki uzyskanych wyników przyrównania sekwencji.

**Fig. 2.** przedstawia zależność spadku liczby kolonii i spadku OD<sub>595</sub> pod wpływem działania enzymu AurR- w trzech różnych stężeniach w porównaniu z lizostafiną (Lss), K – kontrola – brak dodanego enzymu. (A) Spadek CFU *S. simulans* przedstawiony w skali logarytmicznej w 5, 15, 30, 70 i 125 min. (B) Liza komórek *S. simulans* monitorowana przy OD<sub>595</sub>. Wyniki są wyrażone jako % początkowego OD (%OD<sub>595</sub>) zawiesiny komórkowej *S. simulans*. Na wykresie przedstawiono wyniki uzyskane dla reakcji prowadzonych przez 125 min. przy pomiarach co 2,5 min w optymalnych buforach dla enzymów. (C) Spadek CFU *S. aureus* przedstawiony w skali logarytmicznej po 5, 15, 30, 70 i 125 min. (D) Liza komórek *S. aureus* monitorowana przy OD<sub>595</sub>. Wyniki są wyrażone jako % początkowego OD (%OD<sub>595</sub>) zawiesiny komórkowej *S. aureus*. Na wykresie przedstawiono wyniki uzyskane dla reakcji prowadzonych przez 125 min. przy pomiarach co 2,5 min w optymalnych buforach dla enzymów.

**Fig. 3.** Przedstawia zależność spadku ilości jednostek tworzących kolonię i spadku OD<sub>595</sub> pod wpływem działania enzymu AurR+ w trzech różnych stężeniach w porównaniu z lizostafiną (Lss). C – kontrola (brak enzymu). (A) Spadek CFU *S. simulans* przedstawiony w skali logarytmicznej w 5, 15, 30, 70 i 125 min. (B) Liza komórek *S. simulans* monitorowana przy OD<sub>595</sub>. Wyniki są wyrażone jako % początkowego OD (%OD<sub>595</sub>) zawiesiny komórkowej *S. simulans*. Na wykresie przedstawiono wyniki uzyskane dla reakcji prowadzonych przez 125 min. przy pomiarach co 2,5 min w optymalnych buforach dla enzymów. (C) Spadek CFU *S. aureus* przedstawiony w skali logarytmicznej w 5, 15, 30, 70 i 125 min. (D) Liza komórek *S. aureus* monitorowana przy OD<sub>595</sub>. Wyniki są wyrażone jako % początkowego OD (%OD<sub>595</sub>) zawiesiny komórkowej *S. aureus*. Na wykresie przedstawiono wyniki uzyskane dla reakcji prowadzonych przez 125 min. przy pomiarach co 2,5 min w optymalnych buforach dla enzymów.

**Fig. 4.** Przedstawia wpływ siły jonowej buforu reakcyjnego na aktywność lityczną AurR- linia ciągła i AurR-i linia przerywana na *S. aureus*. Liza była prowadzona w 50 mM buforze glicynowym pH 8.0 uzupełnionym o NaCl o stężeniach od 0 do 250 mM. Ze względu na stały trend pokazano wyniki do 150 mM NaCl. Konduktywność roztworu reakcji mierzono w temperaturze pokojowej. Wyniki są wyrażone jako % początkowego OD (%OD<sub>595</sub>) zawiesiny komórkowej – 100%. Przedstawione wyniki zostały zebrane po 45 min. prowadzenia lizy w temperaturze pokojowej.

**Fig. 5.** Przedstawia porównanie aktywności Lss (A), AurR- (B) i AurR+ (C) w różnych warunkach pH wobec *S. aureus*. Wyniki są wyrażone jako % początkowego OD (%OD<sub>595</sub>) zawiesiny komórkowej *S. aureus*. Na wykresie przedstawiono wyniki uzyskane dla reakcji w 60 min.

**Fig. 6.** Przedstawia porównanie aktywności L<sub>ss</sub> (A), AurR- (B) i AurR+ (C) w różnych warunkach pH wobec *S. simulans*. Wyniki są wyrażone jako % początkowego OD (%OD<sub>595</sub>) zawiesiny komórkowej *S. simulans*. Na wykresie przedstawiono wyniki uzyskane dla reakcji w 100 min.

**Fig. 7.** Przedstawia porównanie aktywności AurR- i AurR+ wobec *S. aureus* (A) i (B) i AurR- i AurR+ wobec *S. simulans* (C) i (D) w obecności czynnika chelatującego metale – fenantroliny. Używano różnych stężeń fenantroliny (0,12 mM – 2 mM) i dla porównania pokazano również aktywność enzymu bez fenantroliny – 0. Wyniki są wyrażone jako % początkowego OD (%OD<sub>595</sub>) badanej zawiesiny komórkowej. Na wykresie przedstawiono wyniki uzyskane dla reakcji po 60 min.

**Fig. 8.** Przedstawia porównanie aktywności AurR- i AurR+ wobec *S. aureus* (A) i (B) i AurR- i AurR+ wobec *S. simulans* (C) i (D) w obecności różnych stężeń czynnika chelatującego metale – EDTA. Używano różnych stężeń EDTA (0,6 mM – 250 mM) i dla porównania pokazano również aktywność enzymu bez EDTA – 0. Na figurze przedstawiono zakres stężeń przy których obserwowano zmiany aktywności. Wyniki są wyrażone jako % początkowego OD (%OD<sub>595</sub>) badanej zawiesiny komórkowej. Na wykresie przedstawiono wyniki uzyskane dla reakcji w 60 min.

**Fig. 9.** Przedstawia porównanie wpływu temperatury przechowywania enzymów na lizę komórek bakteryjnych: AurR+ na *S. aureus* i *S. simulans* (A) i (B) i AurR- na *S. aureus* i *S. simulans* (C) i (D). Enzymy były przechowywane odpowiednio w -80°C, 4°C, 21°C i 37°C przez 2, 6, 16, 44 dni. Wyniki są wyrażone jako % wartość aktywności świeżego enzymu wyrażonego jako 100%. Na wykresie przedstawiono wyniki uzyskane dla reakcji po 60 min.

**Fig. 10.** Przedstawia porównanie wpływ temperatury dla enzymów AurR- i AurR+ na lizę komórek bakteryjnych *S. aureus* (A) i *S. simulans* (B). Reakcje prowadzone były w temperaturze 4°C, 21°C, 37°C i 45°C przez 60 min. Wyniki są wyrażone jako % początkowego OD (%OD<sub>595</sub>) badanej zawiesiny komórkowej.

## SPOSOBY WYKONANIA WYNALAZKU

Poniższe przykłady umieszczono jedynie w celu zilustrowania wynalazku oraz wyjaśnienia poszczególnych jego aspektów, a nie w celu jego ograniczenia i nie powinny być utożsamiane z całym jego zakresem, który zdefiniowano w załączonych zastrzeżeniach.

## PRZYKŁADY

### Przykład 1

#### **Wytwarzanie różnych form AurR produktu genu KXA44996.**

Na podstawie analizy przewidywanej sekwencji białka AurR i porównanie jej do innych znanych domen zdefiniowano obecność co najmniej dwóch domen: katalitycznej (CD) i wiążącej (CWT) połączonych krótkim peptydem (**Fig. 1A, B**). Sekwencje aminokwasową AurR porównano z sekwencjami dojrzalej lizostafiny i Chimery A składających się z domen katalitycznych i domeny wiążącej CWT (**Fig. 1C, D**). W obydwu przypadkach poziom identyczności wynosił około 64%, a podobieństwa 72%.

Wyizolowano genomowe DNA *Staphylococcus simulans* DSM 20322. Fragmenty DNA odpowiadające domenom katalitycznej 158–295 białka wyjściowego AurR i domenom katalitycznej łącznie z domeną wiążącą 158–410 białka wyjściowego AurR zostały namnożone metodą PCR z wykorzystaniem genomowego DNA *Staphylococcus simulans* DSM 20322 jako matrycy, wstawione do wektora pET30. Sekwencja kodująca była poprzedzona metką His-tag o sekwencji aminokwasowej MHHHHHH połączona z sekwencją rozpoznawaną przez proteazę TEV. Zarówno jednodomenowa, jak i dwudomenowa aktywna forma AurR okazała się występować w formie ciał inkluzyjnych, więc wprowadzono fuzyjną domenę MBP (Maltose Binding Domain) celem zwiększenia rozpuszczalności białek. Rozpuszczalną formę białek AurR- i AurR+ otrzymano przez ekspresję konstruktów w *E. coli* szczep BL21(DE3). Ekspresję indukowano podczas fazy logarytmicznej wzrostu bakterii na pożywce LB przy OD<sub>595</sub> około 1 stosując 1 mM IPTG i kontynuowano przez 16 h w 18°C. Rekombinowane białka oczyszczano metodą chromatografii powinowactwa na kolumnie agarozowej Ni-NTA (Qiagen), proteazę TEV odcinano His-tag w przypadku dwudomenowej aktywnej formy AurR, nazwanej AurR+ i His- tagowanego MBP w przypadku jednodomenowej aktywnej formy AurR, nazwanej AurR-, a następnie oczyszczano przez filtrację w żelu na kolumnie Superdex™ 75 pg (GE Healthcare) zgodnie z zaleceniami producentów. Po uprzednim odcięciu odpowiednio sekwencji His-tag i His-tagowanego MBP, otrzymane oczyszczone preparaty AurR+ o SEQ ID NO: 5 oraz AurR- o SEQ ID NO: 4 wykorzystywano w dalszych doświadczeniach jako stabilne aktywne formy białka AurR.

Dojrzała forma lizostafiny (L<sub>ss</sub>) używana w przykładach porównawczych została również wyprodukowana w ten sam sposób [19].

**Przykład 2****Wpływ enzymów AurR+ i AurR- na komórki bakteryjne *S. aureus* i *S. simulans*.**

Przeprowadzono test lizowania ścian komórkowych poprzez pomiary zmian gęstości optycznej zawiesiny komórkowej (ang. turbidity reduction assay) z jednoczesnym określeniem liczby bakterii poprzez pomiar jednostek tworzących kolonię CFU.

Komórki bakteryjne *S. aureus* i *S. simulans* hodowane w pożywce TSB w 37°C z wytrząsaniem 80 rpm) zbierano w logarytmicznej fazie wzrostu, wirowano, przemywano i zawieszano w buforze do testowania 50 mM glicyna o pH 8 do uzyskania OD<sub>595</sub> około 1. Enzym AurR i AurR+ otrzymany w **Przykładzie 1** dodawano do stężeń końcowych 200 nM, 100 nM i 50 nM a lizostafinę do 200 nM. 200 µl mieszaniny reakcyjnej przenoszono na płytkę mikrotitracyjną. Płytki inkubowano w temperaturze pokojowej z 10 sekundami wytrząsania, co 2,5 min. OD zawiesiny mierzono przy długości fali 595 nm przez 125 minut od rozpoczęcia reakcji. Jako kontrolę stosowano lizostafinę i bakterie zawieszone w buforze bez enzymu. Każdy eksperyment przeprowadzono dwa razy w trzykrotnych powtórzeniach. Wyniki pomiarów przedstawiono na **Fig. 2B, D** oraz **Fig. 3B, D**. Równolegle 1 ml mieszanin o takim samym składzie inkubowano w temperaturze pokojowej. Pobierano 100 µl roztworu w czasie 5, 15, 30, 70 i 125 min. Wykonywano rozcieńczenia od 10 do 10<sup>7</sup> przez seryjne pobieranie 20 µl próbki i mieszanie jej z 180 µl buforu z dodatkiem 2 mM inhibitora metalopeptydaz – phenantroliny. Pobierano 5 µl każdego rozcieńczenia i nakładano na szalki Petriego z pożywką TSB z agarem, które następnie inkubowano 24 h w 37°C. Kolonie liczono i określano liczbę CFU. Wyniki pomiarów przedstawiono na **Fig. 2A, C** i **Fig. 3A, C**. Podsumowane wyniki dla testów redukcji CFU *S. simulans* przedstawiono w **Tabeli 1** a redukcji CFU *S. aureus* w **Tabeli 2**. Pokazano spadek rzędów wielkości liczby komórek i procent redukcji początkowej liczby komórek bakteryjnych w czasie. Wykazano w obecności enzymów zależność zmiany gęstości zawiesiny komórkowej poprzez pomiar OD ze spadkiem liczby komórek bakteryjnych. Tym samym wykazano skuteczność enzymów AurR- i AurR+ w lizowaniu komórek *S. aureus* posiadających mostki pięcioglicynowe, jak również komórek *S. simulans* zawierających w mostkach sieciujących seryne/y. Wykazano dużo wyższą aktywność enzymów AurR- i AurR+ wobec *S. simulans* w porównaniu do lizostafiny.

**Tabela 1.** Średnia z rzędu wielkości redukcji liczby komórek i średnia z % redukcji początkowej liczby komórek *S. simulans* przez enzymy AurR- i AurR+ w czasie ± odchylenie standardowe

|                    | Rząd wielkości redukcji liczby komórek |           |           | % redukcji początkowej liczby komórek |             |             |
|--------------------|----------------------------------------|-----------|-----------|---------------------------------------|-------------|-------------|
|                    | 30 min                                 | 70 min    | 125min    | 30 min                                | 70 min      | 125min      |
| <b>AurR+ 200nM</b> | 2,0 ± 0,0                              | 2,5 ± 0,5 | 3,0 ± 0,0 | 98,6 ± 0,2                            | 99,7 ± 0,2  | 99,9 ± 0,0  |
| <b>AurR+ 100nM</b> | 1,0 ± 0,0                              | 2,0 ± 0,0 | 2,0 ± 0,0 | 86,6 ± 0,7                            | 98,6 ± 0,3  | 99,6 ± 0,1  |
| <b>AurR+ 50nM</b>  | -                                      | 0,5 ± 0,5 | 1,5 ± 0,5 | 45,0 ± 14,2                           | 76,0 ± 16,8 | 93,8 ± 5,2  |
| <b>AurR- 200nM</b> | 2,5 ± 0,5                              | 3,5 ± 0,5 | 4,0 ± 0,0 | 99,7 ± 0,0                            | 100,0 ± 0,0 | 100,0 ± 0,0 |
| <b>AurR- 100nM</b> | 1,0 ± 0,0                              | 2,0 ± 0,0 | 3,0 ± 0,0 | 94,1 ± 2,6                            | 98,6 ± 1,0  | 99,8 ± 0,1  |
| <b>AurR- 50nM</b>  | 1,0 ± 0,0                              | 1,0 ± 0,0 | 3,0 ± 1,0 | 87,3 ± 2,4                            | 97,2 ± 1,3  | 98,9 ± 1,1  |
| <b>Lss 200nM</b>   | 0,5 ± 0,5                              | -         | 0,5 ± 0,5 | 19,9 ± 4,6                            | 54,9 ± 3,8  | 75,2 ± 10,6 |

**Tabela 2.** Średnia z rzędu wielkości redukcji liczby komórek i średnia z % redukcji początkowej liczby komórek *S. aureus* przez enzymy AurR- i AurR+ w czasie i odchylenie standardowe

|                    | Rząd wielkości redukcji liczby komórek |           |           | % redukcji początkowej liczby komórek |             |             |
|--------------------|----------------------------------------|-----------|-----------|---------------------------------------|-------------|-------------|
|                    | 30 min                                 | 70 min    | 125min    | 30 min                                | 70 min      | 125min      |
| <b>AurR+ 200nM</b> | 3,0 ± 1,0                              | 3,5 ± 0,5 | 5,5 ± 0,5 | 99,7 ± 0,2                            | 99,9 ± 0,1  | 100,0 ± 0,0 |
| <b>AurR+ 100nM</b> | 2,5 ± 0,5                              | 2,5 ± 1,5 | 3,5 ± 0,5 | 97,7 ± 2,2                            | 97,5 ± 2,5  | 99,9 ± 0,1  |
| <b>AurR+ 50nM</b>  | 1,0 ± 1,0                              | 1,5 ± 0,5 | 2,5 ± 0,5 | 91,0 ± 7,6                            | 96,6 ± 2,6  | 99,7 ± 0,1  |
| <b>AurR- 200nM</b> | 4,0 ± 1,0                              | 7,0 ± 1,0 | 7,0 ± 1,0 | 100,0 ± 0,0                           | 100,0 ± 0,0 | 100,0 ± 0,0 |
| <b>AurR- 100nM</b> | 3,0 ± 0,0                              | 6,0 ± 0,0 | 7,0 ± 1,0 | 99,8 ± 0,0                            | 100,0 ± 0,0 | 100,0 ± 0,0 |
| <b>AurR- 50nM</b>  | 3,0 ± 0,0                              | 4,0 ± 0,0 | 4,5 ± 0,5 | 99,8 ± 0,0                            | 100,0 ± 0,0 | 100,0 ± 0,0 |
| <b>Lss 200nM</b>   | 4,5 ± 0,5                              | 7,0 ± 1,0 | 7,0 ± 1,0 | 100,0 ± 0,0                           | 100,0 ± 0,0 | 100,0 ± 0,0 |

### **Przykład 3**

#### **Wpływ konduktywności środowiska reakcji na aktywność lityczną aktywnej formy AurR- i AurR+ na podstawie testu lizowania ścian komórkowych poprzez pomiary zmian gęstości optycznej zawiesiny komórkowej**

Komórki bakteryjne *S. aureus* i *S. simulans* hodowane w pożywce TSB w 37°C z wytrząsaniem zbierano w logarytmicznej fazie wzrostu, przemywano i zawieszano w podwójnie destylowanej wodzie do OD<sub>595</sub> około 2 i nakładano 50 µl na płytkę mikrotitracyjną. 50 µl AurR- i AurR+ oraz lizostafiny otrzymanych w **Przykładzie 1** wszystkie rozpuszczone w podwójnie destylowanej wodzie nakładano na płytkę mikrotitracyjną z próbkami bakterii. Końcowe stężenie enzymów wynosiło 100 nM. Do każdego dołka dodawano 100 µl 50 mM buforu glicynowego o pH 8,0 uzupełnionego o różne stężenia NaCl, od 0 – 500 mM. Mierzono konduktywność buforów stosując konduktometr Mettler-Toledo SevenCompact Conductivity S230. Pomiary konduktywności prowadzono w temperaturze pokojowej. OD zawiesiny mierzono przy długości fali 595 nm w momencie rozpoczęcia reakcji i co 2,5 min przez 45 min. Aktywność lityczną liczono jako procent OD<sub>595</sub> kontroli (próbki takie same jak dla reakcji, ale bez enzymu). Każdy eksperyment przeprowadzono dwa razy w trzykrotnych powtórzeniach. Wyniki dla czasu 45 min dla enzymów AurR- i AurR+ względem komórek bakteryjnych *S. aureus* przedstawiono na **Fig. 4**. Stwierdzono, że aktywne formy AurR w postaci enzymów AurR- i AurR+ są aktywne w buforach o różnej konduktywności. Aktywność AurR- względem *S. aureus* była szczególnie wysoka w środowisku reakcji o konduktywności pomiędzy 0,5 a 2 mS/cm redukując OD zawiesiny o 80% w 15 min. W przypadku AurR+ wysoką aktywność względem *S. aureus* zaobserwowano dla wszystkich mierzonych warunków powyżej 0,08 mS/cm.

### **Przykład 4**

#### **Wpływ warunków buforowych na skuteczność lityczną aktywnej formy AurR-, AurR+ i lizostafiny vs. *S. aureus*.**

Komórki bakteryjne i enzymy były przygotowane jak w **Przykładzie 3**. Aktywność enzymów testowano w buforach o różnym pH i podobnej wyjściowej konduktywności około 2 mS/cm z dodatkiem optymalnego stężenia soli – 3 mM dla AurR- i 100 mM dla AurR+ i L<sub>ss</sub>. Test lizowania ścian komórkowych poprzez pomiary zmian gęstości optycznej zawiesiny komórkowej prowadzono jak w **Przykładzie 2 i 3**. AurR+ okazała się działać w najszerszym spektrum pH od 7 do 10,9. Otrzymane wyniki przedstawiono na **Fig. 5**: dla L<sub>ss</sub> (**A**), dla AurR+ (**B**) i AurR- (**C**). Wykazano, że aktywność L<sub>ss</sub> względem *S. aureus* jest wysoka w buforach o pH od 7 do 9. Jednodomenowa AurR wykazuje wysokie działanie w buforze o pH 8–9.

### **Przykład 5**

#### **Wpływ warunków buforowych na skuteczność lityczną aktywnej formy AurR-, AurR+ i lizostafiny vs. *S. simulans*.**

Test lizowania ścian komórkowych poprzez pomiary zmian gęstości optycznej zawiesiny komórkowej prowadzono jak w powyższych przykładach. Komórki bakteryjne i enzymy były przygotowane jak w **Przykładzie 3**. Testowane były bufor o różnym pH i podobnej wyjściowej konduktywności około 2 mS/cm z dodatkiem optymalnego stężenia soli – 3 mM dla AurR- i 100 mM dla AurR+ i L<sub>ss</sub>. Otrzymane wyniki przedstawiono na **Fig. 6** dla L<sub>ss</sub> (**A**), dla AurR+ (**B**) i AurR- (**C**). Wykazano, że aktywność L<sub>ss</sub> względem *S. simulans* jest bardzo niska w buforach o pH 5,4 do 8. Dwudomenową AurR+ okazała się działać najlepiej w pH od 7 do 8, ale aktywność zaobserwowano także w buforze o pH 5,4 i pH 6. Jednodomenowa AurR- działa w zakresie pH 5,4 – 8,0, i wykazuje najwyższą aktywność w buforze o pH 7.

### **Przykład 6**

#### **Wpływ czynników kompleksujących jony metali, EDTA i fenantroliny, na skuteczność aktywnej formy AurR-, AurR+ vs. *S. simulans* i *S. aureus*.**

Test lizowania ścian komórkowych poprzez pomiary zmian gęstości optycznej zawiesiny komórkowej przy różnym stężeniu czynników kompleksujących prowadzono jak w powyższych przykładach. Komórki bakteryjne były przygotowane jak w **Przykładzie 3**. Na płytkę mikrotitracyjną dodawano 100 µl roztworów – 50 mM bufor glicynowego o pH 8,0 uzupełnionych o optymalne dla enzymów stężenie soli i dodatkowo różne stężenia czynników kompleksujących jony metalu. Dla fenantroliny były to stężenia 0 do 2 mM zarówno dla AurR- jak i AurR+. Dla EDTA były to stężenia od 0 do 250 mM dla enzymu AurR+ i od 0 do 31 mM dla AurR-. Na płytkę dodawano bakterie, a tuż przed pomiarem dodawano enzymy do końcowego stężenia 100 nM. Aktywność lityczną policzono jako procent kontroli OD<sub>595</sub> (próbki takie same jak dla reakcji, ale bez enzymu). Każdy eksperyment przeprowadzono w trzykrotnych

powtórzeniach. Fenantrolina hamowała lizę komórek *S. aureus* i *S. simulans* przez AurR- już w bardzo niskich stężeniach, podczas gdy AurR+ wykazywała nieco lepszą tolerancję w stosunku do tego inhibitora (**Fig. 7A i B**). W przypadku reakcji z EDTA dla obydwu enzymów wykazano podobne tendencje, ale jednocześnie dużo wyższą tolerancję niż dla fenantroliny (**Fig. 8**).

#### **Przykład 7**

**Wpływ temperatury przechowywania enzymów na ich właściwości lizowania ścian komórek bakterii.**

Komórki bakteryjne i enzymy były przygotowane jak w **Przykładzie 3**. Enzymy uprzednio były przechowywane w różnych warunkach temperaturowych: -80°C, 4°C, 21°C i 37°C przez 2, 6, 16 i 44 dni. Aktywność lityczną oceniano jako procent gęstości kontroli mierzonej jako OD<sub>595</sub> (próbki takie same jak dla reakcji, ale bez enzymu). Każdy eksperyment przeprowadzono dwa razy w trzykrotnych powtórzeniach. Wyniki znormalizowano względem aktywności świeżo przygotowanych enzymów AurR- i AurR+ **Fig. 9A i B**. Reakcję lityczną prowadzono na komórkach *S. aureus* przez 60 minut w temperaturze pokojowej. Obydwa enzymy wykazywały wysoką stabilność w trakcie przechowywania w różnych warunkach temperaturowych nawet przez 44 dni.

#### **Przykład 8**

**Wpływ temperatury prowadzenia reakcji z aktywnymi formami AurR: AurR- i AurR+ na lizę komórek bakteryjnych *S. aureus* i *S. simulans*.**

Enzymy AurR- i AurR+ bardzo wydajnie lizują komórki bakteryjne *S. aureus* i *S. simulans* w temperaturze pokojowej i wyższej, zachowując aktywność także w 45°C. Enzymy wykazywały też aktywność w niskiej temperaturze (+4°C), w szczególności w stosunku do *S. aureus*.

#### **Przykład 9**

**Aktywność enzymu AurR+ w surowicy różnych organizmów.**

Badano aktywność enzymu AurR+ w surowicy w porównaniu z enzymami L<sub>ss</sub> i LytMCD\_L<sub>ss</sub>CWT (Chimera A, przedstawiona jako sekwencja SEQ ID NO: 5 w publikacji WO2021/075988). 100 nM enzymów inkubowano w 50 mM buforze glicynowym pH 8,0, 100 mM NaCl lub płodowej surowicy bydlęcej, surowicy ludzkiej, surowicy końskiej lub surowicy królika w obecności początkowej liczby komórek 1x10<sup>6</sup> CFU/ml. W doświadczeniu użyto szczepów *S. aureus* z mostkami sieciującymi zawierającymi GGGGG lub GGS<sup>+</sup>GG i *S. simulans* CCM 3583, który zawiera serynę w mostkach sieciujących (GGS<sup>+</sup>GG). Inkubacje prowadzono przez 4 godziny w 37°C. Liczbę komórek bakteryjnych określano przez seryjne rozcieńczenia na płytkach z agarem TSB (test punktowy). Wyniki przedstawiono w **Tabeli 3** jako spadek log<sub>10</sub> (średnia ± SD). Eksperyment powtórzono dwa lub trzy razy. Enzym AurR+ wykazuje dużo wyższą efektywność w eliminowaniu gronkowców zarówno z glicynowymi mostkami sieciującymi, jak i mostkami zawierającymi serynę w porównaniu do lizostafiny i LytMCD\_L<sub>ss</sub>CWT.

Tabela 3

|                          | Rząd spadku początkowej liczby komórek bakteryjnych ( $\pm$ odchylenie standardowe) |                                 |                                                                   |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
|                          | <i>S. aureus</i> GGGGG                                                              | <i>S. aureus</i> GGS GG         | <i>S. simulans</i> CCM 3583<br>(seryna/y w mostkach sieciujących) |
| <b>Bufor glicynowy</b>   |                                                                                     |                                 |                                                                   |
| Kontrola bez enzymu      | 0,0 $\pm$ 0,0                                                                       | 0,0 $\pm$ 0,0                   | -0,5 $\pm$ 0,7                                                    |
| <b>AurR+</b>             | <b>6,0 <math>\pm</math> 0,0</b>                                                     | <b>5,0 <math>\pm</math> 1,4</b> | <b>6,0 <math>\pm</math> 0,0</b>                                   |
| Lss                      | 6,0 $\pm$ 0,0                                                                       | 3,5 $\pm$ 0,7                   | 3,0 $\pm$ 0,0                                                     |
| LytM_CWT                 | 6,0 $\pm$ 0,0                                                                       | 5,0 $\pm$ 1,4                   | 3,0 $\pm$ 0,0                                                     |
| <b>Surowica bydłęca</b>  |                                                                                     |                                 |                                                                   |
| Kontrola bez enzymu      | 0,0 $\pm$ 0,0                                                                       | 0,0 $\pm$ 0,0                   | -2,0 $\pm$ 0,0                                                    |
| <b>AurR+</b>             | <b>6,0 <math>\pm</math> 0,0</b>                                                     | <b>6,0 <math>\pm</math> 0,0</b> | <b>6,0 <math>\pm</math> 0,0</b>                                   |
| Lss                      | 6,0 $\pm$ 0,0                                                                       | 2,0 $\pm$ 0,0                   | -1,0 $\pm$ 0,0                                                    |
| LytM_CWT                 | 6,0 $\pm$ 0,0                                                                       | 2,0 $\pm$ 0,0                   | -1,0 $\pm$ 0,0                                                    |
| <b>Surowica ludzka</b>   |                                                                                     |                                 |                                                                   |
| Kontrola bez enzymu      | -1,0 $\pm$ 0,0                                                                      | -1,0 $\pm$ 0,0                  | -1,0 $\pm$ 0,0                                                    |
| <b>AurR+</b>             | <b>7,0 <math>\pm</math> 0,0</b>                                                     | <b>7,0 <math>\pm</math> 0,0</b> | <b>6,0 <math>\pm</math> 0,0</b>                                   |
| Lss                      | 7,0 $\pm$ 0,0                                                                       | 1,6 $\pm$ 0,5                   | 0,3 $\pm$ 0,6                                                     |
| LytM_CWT                 | 7,0 $\pm$ 0,0                                                                       | 2,0 $\pm$ 0,0                   | 0,3 $\pm$ 0,6                                                     |
| <b>Surowica końska</b>   |                                                                                     |                                 |                                                                   |
| Kontrola bez enzymu      | 0,0 $\pm$ 0,0                                                                       | 0,0 $\pm$ 0,0                   | -2,5 $\pm$ 0,7                                                    |
| <b>AurR+</b>             | <b>6,0 <math>\pm</math> 0,0</b>                                                     | <b>6,0 <math>\pm</math> 0,0</b> | <b>1,0 <math>\pm</math> 0,0</b>                                   |
| Lss                      | 6,0 $\pm$ 0,0                                                                       | 2,0 $\pm$ 0,0                   | -2,0 $\pm$ 0,0                                                    |
| LytM_CWT                 | 6,0 $\pm$ 0,0                                                                       | 2,0 $\pm$ 0,0                   | -2,0 $\pm$ 0,0                                                    |
| <b>Surowica królicza</b> |                                                                                     |                                 |                                                                   |
| Kontrola bez enzymu      | -0,5 $\pm$ 0,7                                                                      | -0,5 $\pm$ 0,7                  | -1,5 $\pm$ 0,7                                                    |
| <b>AurR+</b>             | <b>6,0 <math>\pm</math> 0,0</b>                                                     | <b>6,0 <math>\pm</math> 0,7</b> | <b>3,0 <math>\pm</math> 0,0</b>                                   |
| Lss                      | 6,0 $\pm$ 0,0                                                                       | 0,5 $\pm$ 0,0                   | -1,0 $\pm$ 0,0                                                    |
| LytM_CWT                 | 6,0 $\pm$ 0,0                                                                       | 1,0 $\pm$ 0,0                   | -1,0 $\pm$ 0,0                                                    |

**Objaśnienie sekwencji:**

**SEQ ID NO: 1** AurR<sup>158-295</sup> – sekwencja aminokwasowa białka jednodomenowej aktywnej formy AurR, która odpowiada 138 aminokwasom od 158 do 295 białka AurR kodowanego przez gen KXA44996; domena CD AurR:

MEPYASAQWLTKYQLTAGYGHYNLNINNGMHYGADFAMPICTPVRAITGGKIIIEAGWSPYGGGNQIGVKEPDGSHYQ  
WYMHLSQLNVRVGDYISTGQIIIGKSGSTGFTGPHLHFQRMVGGGLGNNYAQNPPIFLKQYG

**SEQ ID NO: 2** AurR<sup>317-410</sup> – sekwencja aminokwasów domeny CWT – domeny wiążącej ścianę komórkową z AurR, która odpowiada 94 aminokwasom 317–410 sekwencji wyjściowego białka AurR:

STYKVDGKGTTYKAESASF TANYDIKTRLNCPFRSNPQSGVLHPGQTIKYDTVMKQDGHVWVVYTGYSGKRIYLPVR  
TWDKNSNTLGPLWGIIN

**SEQ ID NO: 3** AurR<sup>158-410</sup> – sekwencja aminokwasowa dwudomenowej aktywnej formy AurR, która odpowiada aminokwasom 158–410 białka AurR kodowanego przez gen KXA44996: Aminokwasy 1–138 odpowiadają domenie CD z AurR (**SEQ ID NO: 1**); L-linker stanowią 21 aminokwasy 139–159 **SEQ ID NO: 3**, co odpowiada aminokwasom 196–316 sekwencji wyjściowego białka AurR- ppodkreślone i pochylone, CWT – domenę wiążącą ścianę komórkową z AurR stanowią 94 aminokwasy 160–253 z **SEQ ID NO: 3** co odpowiada aminokwasom 317–410 sekwencji wyjściowego białka AurR:

**MEPYASAQWLTKYQLTAGYGHYNLNINNGMHYGADFAMPIGTPVRAITGGKII EAGWSPYGGGNQIGVKEPDGSHYQ**  
**WYMHLSQLNVRVGDIYSTGQIIIGKSGSTGFSTGPHLHFQRMVGGGLGNNYAQNPIPFLLKQYGYGSNTSGYTTPVNRVQ**  
APSTNSTYKVDGKGTYKAESASFTANYDIKTRLNGPFRSNPQSGVLHPGQTIKYDVTVMKQDGHVWVYTGYSKRI  
 YLPVRTWDKNSNTLGPLWGIIN

**SEQ ID NO: 4** AurR<sup>-</sup> – sekwencja aminokwasowa jednodomenowej aktywnej formy AurR, która obejmuje SEQ ID NO: 1 – tu jako AA od 4 do 141 z pozostałymi na końcu N trzema aminokwasami po odciętym MBP z wektora – poniżej jako zacinienie:

**SNAMEPYASAQWLTKYQLTAGYGHYNLNINNGMHYGADFAMPIGTPVRAITGGKII EAGWSPYGGGNQIGVKEPDGS**  
 HYQWYMHLSQLNVRVGDIYSTGQIIIGKSGSTGFSTGPHLHFQRMVGGGLGNNYAQNPIPFLLKQYGY

**SEQ ID NO: 5** AurR<sup>+</sup> – sekwencja aminokwasowa dwudomenowej aktywnej formy AurR z *S. simulans*. Obejmuje sekwencję AurR<sup>158-410</sup> wraz z fragmentem wektora, którą stanowią aminokwasy 1–3 na N końcu – poniżej jako szare zacinienie:

**SNAMEPYASAQWLTKYQLTAGYGHYNLNINNGMHYGADFAMPIGTPVRAITGGKII EAGWSPYGGGNQIGVKEP**  
**DGSHYQWYMHLSQLNVRVGDIYSTGQIIIGKSGSTGFSTGPHLHFQRMVGGGLGNNYAQNPIPFLLKQYGYGSNTSG**  
**YTPVNRVQAPSTNSTYKVDGKGTYKAESASFTANYDIKTRLNGPFRSNPQSGVLHPGQTIKYDVTVMKQDGHV**  
**WVYTGYSKRIYLPVRTWDKNSNTLGPLWGIIN**

#### Bibliografia:

1. Biochem Biophys Res Commun. 1965 Apr 23;19:383–9. doi: 10.1016/0006-291x(65)90473-0. LYSO-STAPHIN: ENZYMATIC MODE OF ACTION, H P BROWDER, H A ZYGMUNT, J R YOUNG, PA TAVORMINA, PMID: 14317407 DOI: 10.1016/0006-291x(65)90473-0
2. Eur J Biochem. 1973 Oct 5;38(2):293–300. doi: 10.1111/j.1432-1033.1973.tb03061.x. Studies on lysostaphin. Separation and characterization of three enzymes, O J Iversen, A Grov, PMID: 4773876 DOI: 10.1111/j.1432-1033.1973.tb03061.x
3. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Jul;48(7):2704–7. doi: 10.1128/AAC.48.7.2704-2707.2004. Lysostaphin-coated catheters eradicate Staphylococcus aureus challenge and block surface colonization, Anjali Shah, James Mond, Scott Walsh, PMID: 15215130 PMCID: PMC434171 DOI: 10.1128/AAC.48.7.2704-2707.2004
4. J Antimicrob Chemother. 2009 Jul;64(1):94–100. doi: 10.1093/jac/dkp145. Epub 2009 Apr 27. Lysostaphin eradicates established Staphylococcus aureus biofilms in jugular vein catheterized mice, John F Kokai-Kun, Tanya Chanturiya, James J Mond, PMID: 19398455 DOI: 10.1093/jac/dkp145
5. Antimicrob Agents Chemother. 2003 May;47(5): 1589–97. doi: 10.1128/aac.47.5.1589-1597.2003. Lysostaphin cream eradicates Staphylococcus aureus nasal colonization in a cotton rat model, John F Kokai-Kun, Scott M Walsh, Tanya Chanturiya, James J Mond, PMID: 12709327 PMCID: PMC153340 DOI: 10.1128/aac.47.5.1589-1597.2003
6. Antimicrob Agents Chemother. 1998 Jun;42(6): 1355–60. doi: 10.1128/AAC.42.6.1355. Lysostaphin treatment of experimental methicillin-resistant Staphylococcus aureus aortic valve endocarditis, M W Climo, R L Patron, B P Goldstein, G L Archer, PMID: 9624475 PMCID: PMC105603 DOI: 10.1128/AAC.42.6.1355
7. BMC Microbiol. 2012 Jun 6;12:97. doi: 10.1186/1471-2180-12-97. Anti-staphylococcal activities of lysostaphin and LytM catalytic domain, Izabela Sabala, Ing-Marie Jonsson, Andrej Tarkowski, Matthias Bochtler PMID: 22672475 PMCID: PMC3413552 DOI: 10.1186/1471-2180-12-97
8. AAD Case Rep. 2016 Dec 4;2(6):428–429. doi: 10.1016/j.jdcr.2016.08.015. eCollection 2016 Nov. Staphylococcus simulans: An emerging cutaneous pathogen, Bridget E Shields, Amanda J Tschetter, Carolyn A Wanat, PMID: 27957522 PMCID: PMC5143409 DOI: 10.1016/j.jdcr.2016.08.015
9. Antimicrob Agents Chemother. 2001 May;45(5):1431–7. doi: 10.1128/AAC.45.5.1431-1437.2001. Mechanism and suppression of lysostaphin resistance in oxacillin-resistant Staphylococcus aureus, M W Climo, K Ehler, G L Archer, PMID: 11302806 PMCID: PMC90484 DOI: 10.1128/AAC.45.5.1431-1437.2001



10. J Bacteriol. 2006 Sep;188(17):6286–97. doi: 10.1128/JB.00457-06. Staphylococcus aureus mutants with increased lysostaphin resistance, Angelika Gründling, Dominique M Missiakas, Olaf Schneewind, PMID: 16923896 PMCID: PMC1595375 DOI: 10.1128/JB.00457-06
11. Biotechnol Bioeng. 2019 Dec;116(12):3149–3159. doi: 10.1002/bit.27143. Epub 2019 Sep 3. Reducing Staphylococcus aureus resistance to lysostaphin using CRISPR-dCas9, Xia Wu, Jian Zha, Mattheos A G Koffas, Jonathan S Dordick, PMID: 31433061 DOI: 10.1002/bit.27143
12. Appl Environ Microbiol. 1995 Apr;61(4): 1475–9. doi: 10.1128/AEM.61.4.1475-1479.1995. The lysostaphin endopeptidase resistance gene (epr) specifies modification of peptidoglycan cross bridges in Staphylococcus simulans and Staphylococcus aureus, H P DeHart, H E Heath, L S Heath, P A LeBlanc, G L Sloan, PMID: 7747966 PMCID: PMC167404 DOI: 10.1128/AEM.61.4.1475-1479.1995
13. Mol Microbiol. 1997 Mar;23(6): 1251–65. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.2911657.x. Studies on polysostaphin processing and characterization of the lysostaphin immunity factor (Lif) of Staphylococcus simulans biovar staphylolyticus, G Thumm, F Götz, PMID: 9106216 DOI: 10.1046/j.1365-2958.1997.2911657.x
14. J Bacteriol. 1997 Jul; 179(13):4311–8. doi: 10.1128/jb.179.13.4311-4318.1997. epr, which encodes glycylglycine endopeptidase resistance, is homologous to femAB and affects serine content of peptidoglycan cross bridges in Staphylococcus capitis and Staphylococcus aureus, M Sugai, T Fujiwara, K Ohta, H Komatsuzawa, M Ohara, H Suginaka, PMID: 9209049 PMCID: PMC179255 DOI: 10.1128/jb.179.13.4311-4318.1997
15. J Bacteriol. 2006 Sep;188(17):6286–97. doi: 10.1128/JB.00457-06. Staphylococcus aureus mutants with increased lysostaphin resistance, Angelika Gründling, Dominique M Missiakas, Olaf Schneewind, PMID: 16923896, PMCID: PMC1595375 DOI: 10.1128/JB.00457-06
16. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Feb;51(2):475–82. doi: 10.1128/AAC.00786-06. Epub 2006 Nov 13. Lysostaphin-resistant variants of Staphylococcus aureus demonstrate reduced fitness in vitro and in vivo, Caroline Kusuma, Anna Jadanova, Tanya Chanturiya, John F Kokai-Kun, PMID: 17101683 PMCID: PMC1797764 DOI: 10.1128/AAC.00786-06
17. J Bacteriol. 1997 Jan;179(1):9–16. doi: 10.1128/jb.179.1.9-16.1997. Cell wall monoglycine crossbridges and methicillin hypersusceptibility in a femAB null mutant of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, A M Strandén, K Ehlert, H Labischinski, B Berger-Bächi, PMID: 8981974 PMCID: PMC178655 DOI: 10.1128/jb.179.1.9-16.1997
18. J Clin Microbiol. 1975 Jan;1(1):82–8. doi: 10.1128/JCM.1.1.82-88.1975. Simplified scheme for routine identification of human Staphylococcus species, W E Kloos, K H Schleifer, PMID: 170303 PMCID: PMC274946 DOI: 10.1128/JCM.1.1.82-88.1975
19. FEBS J. 2014 Sep;281(18):4112–22. doi: 10.1111/febs.12929. Crystal structure of the antimicrobial peptidase lysostaphin from Staphylococcus simulans I Sabala, E Jagielska, P T Bardelang, H Czapinska, S O Dahms, J A Sharpe, R James, M E Than, N R Thomas, M Bochtler. PMID: 25039253; PMCID: PMC4286107

## Lista sekwencji

```

<110> MIBMIK
<120> Hydrolaza peptydoglikanowa, sposób proteolizy ją wykorzystujący
        oraz jej zastosowania
<130> PPL1167AGR
<160> 5
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 138
<212> PRT
<213> Staphylococcus simulans<213> Staphylococcus simulans
<400> 1
Met Glu Pro Tyr Ala Ser Ala Gln Trp Leu Thr Lys Tyr Gln Leu Thr
1      5      10      15
Ala Gly Tyr Gly His Tyr Asn Leu Asn Ile Asn Asn Gly Met His Tyr
20      25      30
Gly Ala Asp Phe Ala Met Pro Ile Gly Thr Pro Val Arg Ala Ile Thr
35      40      45
Gly Gly Lys Ile Ile Glu Ala Gly Trp Ser Pro Tyr Gly Gly Gly Asn
50      55      60
Gln Ile Gly Val Lys Glu Pro Asp Gly Ser His Tyr Gln Trp Tyr Met
65      70      75      80
His Leu Ser Gln Leu Asn Val Arg Val Gly Asp Tyr Ile Ser Thr Gly
85      90      95
Gln Ile Ile Gly Lys Ser Gly Ser Thr Gly Phe Ser Thr Gly Pro His
100     105     110
Leu His Phe Gln Arg Met Val Gly Gly Leu Gly Asn Asn Tyr Ala Gln
115     120     125
Asn Pro Ile Pro Phe Leu Lys Gln Tyr Gly
130     135

<210> 2
<211> 253
<212> PRT
<213> Staphylococcus simulans
<400> 2
Met Glu Pro Tyr Ala Ser Ala Gln Trp Leu Thr Lys Tyr Gln Leu Thr
1      5      10      15
Ala Gly Tyr Gly His Tyr Asn Leu Asn Ile Asn Asn Gly Met His Tyr
20      25      30
Gly Ala Asp Phe Ala Met Pro Ile Gly Thr Pro Val Arg Ala Ile Thr
35      40      45
Gly Gly Lys Ile Ile Glu Ala Gly Trp Ser Pro Tyr Gly Gly Gly Asn
50      55      60

```

Gln Ile Gly Val Lys Glu Pro Asp Gly Ser His Tyr Gln Trp Tyr Met  
 65 70 75 80  
 His Leu Ser Gln Leu Asn Val Arg Val Gly Asp Tyr Ile Ser Thr Gly  
 85 90 95  
 Gln Ile Ile Gly Lys Ser Gly Ser Thr Gly Phe Ser Thr Gly Pro His  
 100 105 110  
 Leu His Phe Gln Arg Met Val Gly Gly Leu Gly Asn Asn Tyr Ala Gln  
 115 120 125  
 Asn Pro Ile Pro Phe Leu Lys Gln Tyr Gly Tyr Gly Ser Asn Thr Ser  
 130 135 140  
 Gly Tyr Thr Pro Pro Val Asn Arg Val Gln Ala Pro Ser Thr Asn Ser  
 145 150 155 160  
 Thr Tyr Lys Val Asp Gly Lys Gly Thr Tyr Tyr Lys Ala Glu Ser Ala  
 165 170 175  
 Ser Phe Thr Ala Asn Tyr Asp Ile Lys Thr Arg Leu Asn Gly Pro Phe  
 180 185 190  
 Arg Ser Asn Pro Gln Ser Gly Val Leu His Pro Gly Gln Thr Ile Lys  
 195 200 205  
 Tyr Asp Thr Val Met Lys Gln Asp Gly His Val Trp Val Val Tyr Thr  
 210 215 220  
 Gly Tyr Ser Gly Lys Arg Ile Tyr Leu Pro Val Arg Thr Trp Asp Lys  
 225 230 235 240  
 Asn Ser Asn Thr Leu Gly Pro Leu Trp Gly Ile Ile Asn  
 245 250

<210> 3  
 <211> 253  
 <212> PRT  
 <213> Staphylococcus simulans

<400> 3  
 Met Glu Pro Tyr Ala Ser Ala Gln Trp Leu Thr Lys Tyr Gln Leu Thr  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Tyr Gly His Tyr Asn Leu Asn Ile Asn Asn Gly Met His Tyr  
 20 25 30  
 Gly Ala Asp Phe Ala Met Pro Ile Gly Thr Pro Val Arg Ala Ile Thr  
 35 40 45  
 Gly Gly Lys Ile Ile Glu Ala Gly Trp Ser Pro Tyr Gly Gly Gly Asn  
 50 55 60  
 Gln Ile Gly Val Lys Glu Pro Asp Gly Ser His Tyr Gln Trp Tyr Met  
 65 70 75 80  
 His Leu Ser Gln Leu Asn Val Arg Val Gly Asp Tyr Ile Ser Thr Gly  
 85 90 95  
 Gln Ile Ile Gly Lys Ser Gly Ser Thr Gly Phe Ser Thr Gly Pro His  
 100 105 110  
 Leu His Phe Gln Arg Met Val Gly Gly Leu Gly Asn Asn Tyr Ala Gln  
 115 120 125  
 Asn Pro Ile Pro Phe Leu Lys Gln Tyr Gly Tyr Gly Ser Asn Thr Ser  
 130 135 140  
 Gly Tyr Thr Pro Pro Val Asn Arg Val Gln Ala Pro Ser Thr Asn Ser  
 145 150 155 160  
 Thr Tyr Lys Val Asp Gly Lys Gly Thr Tyr Tyr Lys Ala Glu Ser Ala  
 165 170 175  
 Ser Phe Thr Ala Asn Tyr Asp Ile Lys Thr Arg Leu Asn Gly Pro Phe  
 180 185 190  
 Arg Ser Asn Pro Gln Ser Gly Val Leu His Pro Gly Gln Thr Ile Lys  
 195 200 205  
 Tyr Asp Thr Val Met Lys Gln Asp Gly His Val Trp Val Val Tyr Thr  
 210 215 220  
 Gly Tyr Ser Gly Lys Arg Ile Tyr Leu Pro Val Arg Thr Trp Asp Lys  
 225 230 235 240  
 Asn Ser Asn Thr Leu Gly Pro Leu Trp Gly Ile Ile Asn  
 245 250

<210> 4  
 <211> 141  
 <212> PRT  
 <213> Staphylococcus simulans  
 <400> 4

```

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

```

```

<210> 5
<211> 256
<212> PRT
<213> Staphylococcus simulans
<400> 5

```

```

Ser Asn Ala Met Glu Pro Tyr Ala Ser Ala Gln Trp Leu Thr Lys Tyr
1      5      10      15
Gln Leu Thr Ala Gly Tyr Gly His Tyr Asn Leu Asn Ile Asn Asn Gly
20      25      30
Met His Tyr Gly Ala Asp Phe Ala Met Pro Ile Gly Thr Pro Val Arg
35      40      45
Ala Ile Thr Gly Gly Lys Ile Ile Glu Ala Gly Trp Ser Pro Tyr Gly
50      55      60
Gly Gly Asn Gln Ile Gly Val Lys Glu Pro Asp Gly Ser His Tyr Gln
65      70      75      80
Trp Tyr Met His Leu Ser Gln Leu Asn Val Arg Val Gly Asp Tyr Ile
85      90      95
Ser Thr Gly Gln Ile Ile Gly Lys Ser Gly Ser Thr Gly Phe Ser Thr
100     105     110
Gly Pro His Leu His Phe Gln Arg Met Val Gly Gly Leu Gly Asn Asn
115     120     125
Tyr Ala Gln Asn Pro Ile Pro Phe Leu Lys Gln Tyr Gly Tyr Gly Ser
130     135     140
Asn Thr Ser Gly Tyr Thr Pro Pro Val Asn Arg Val Gln Ala Pro Ser
145     150     155     160
Thr Asn Ser Thr Tyr Lys Val Asp Gly Lys Gly Thr Tyr Tyr Lys Ala
165     170     175
Glu Ser Ala Ser Phe Thr Ala Asn Tyr Asp Ile Lys Thr Arg Leu Asn
180     185     190
Gly Pro Phe Arg Ser Asn Pro Gln Ser Gly Val Leu His Pro Gly Gln
195     200     205
Thr Ile Lys Tyr Asp Thr Val Met Lys Gln Asp Gly His Val Trp Val
210     215     220
Val Tyr Thr Gly Tyr Ser Gly Lys Arg Ile Tyr Leu Pro Val Arg Thr
225     230     235     240
Trp Asp Lys Asn Ser Asn Thr Leu Gly Pro Leu Trp Gly Ile Ile Asn
245     250     255

```

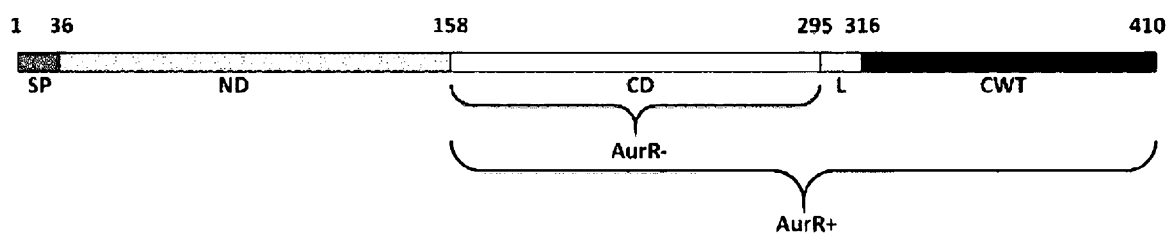
## Zastrzeżenia patentowe

1. Hydrolaza peptydoglikanowa zdolna do trawienia ścian bakterii Gram(+) posiadających mostki sieciujące w peptydoglikanie zarówno glicynowe jak i glicynowo-serynowe zawierająca aktywną formę białka AurR, która zawiera jako domenę katalityczną CD<sup>AurR</sup>,  
przy czym sekwencja aminokwasowa domeny katalitycznej CD<sup>AurR</sup> jest w co najmniej 80% identyczna z sekwencją aminokwasową przedstawioną w SEQ ID NO: 1,  
korzystniej sekwencja CD<sup>AurR</sup> jest w co najmniej 85%, 90%, korzystniej 95%, najkorzystniej na poziomie 98% lub więcej identyczna z sekwencją aminokwasową przedstawioną w SEQ ID NO: 1;  
przy czym mostki sieciujące składają się z co najmniej trzech glicyn lub glicyn i seryny/seryn.
2. Hydrolaza peptydoglikanowa według zastrz. 1, **znamienna tym**, że aktywna forma białka AurR jest w postaci jednodomenowej aktywnej formy AurR zawierającej domenę katalityczną CD<sup>AurR</sup>, ale nie zawierającej domeny wiążącej ścianę komórkową bakterii CWT<sup>AurR</sup>.
3. Hydrolaza peptydoglikanowa według zastrz. 1–2, **znamienna tym**, że aktywną formę AurR w postaci jednodomenowej stanowi domena katalityczna AurR<sup>158-295</sup> o SEQ ID NO: 1.
4. Hydrolaza peptydoglikanowa według zastrz. 1–2, **znamienna tym**, że aktywną formę AurR w postaci jednodomenowej stanowi AurR<sup>-</sup> o SEQ ID NO: 4.
5. Hydrolaza peptydoglikanowa według zastrz. 1, **znamienna tym**, że aktywna forma białka AurR jest w postaci dwudomenowej aktywnej formy AurR zawierającej domenę katalityczną CD<sup>AurR</sup> oraz domenę wiążącą ścianę komórkową bakterii CWT<sup>AurR</sup>,  
przy czym sekwencja aminokwasowa domeny wiążącej ścianę komórkową bakterii CWT<sup>AurR</sup> jest w co najmniej 80% identyczna z sekwencją aminokwasową przedstawioną w SEQ ID NO: 2,  
korzystniej sekwencja CWT<sup>AurR</sup> jest w co najmniej 85%, 90%, korzystniej 95%, najkorzystniej na poziomie 98% lub więcej identyczna z sekwencją aminokwasową przedstawioną w SEQ ID NO: 2.
6. Hydrolaza peptydoglikanowa według zastrz. 1 oraz 5, **znamienna tym**, że sekwencja aminokwasowa domeny katalitycznej CD<sup>AurR</sup> połączona jest z sekwencją domeny wiążącej ścianę komórkową bakterii CWT<sup>AurR</sup> poprzez sekwencję aminokwasową linkera, przy czym korzystną sekwencję linkera stanowią aminokwasy 139–159 z SEQ ID NO: 3.
7. Hydrolaza peptydoglikanowa według zastrz. 1 oraz 5–6, **znamienna tym**, że aktywną formę AurR w postaci dwudomenowej stanowi AurR<sup>158-410</sup> o SEQ ID NO: 3.
8. Hydrolaza peptydoglikanowa według zastrz. 1 oraz 5–6, **znamienna tym**, że aktywną formę AurR w postaci dwudomenowej stanowi AurR<sup>+</sup> o SEQ ID NO: 5.
9. Konstrukcja genetyczna kodująca hydrolazę peptydoglikanową jak określoną w zastrz. 1–8.
10. Kompozycja do proteolizy ścian komórkowych bakterii Gram(+), **znamienna tym**, że zawiera hydrolazę peptydoglikanową jak określoną w zastrz. 1–8 oraz nośnik, przy czym kompozycja przeznaczona jest do proteolizy ścian komórkowych bakterii Gram(+) posiadających w peptydoglikanie mostki sieciujące glicynowe i/lub glicynowo-serynowe.
11. Kompozycja farmaceutyczna zawierająca hydrolazę peptydoglikanową jak określoną w zastrz. 1–8 oraz farmaceutycznie dopuszczalną substancję pomocniczą do zastosowania jako lek do leczenia chorób i/lub stanów zapalnych wywołanych bakteriami Gram(+) posiadającymi glicynowe i/lub glicynowo-serynowe mostki sieciujące w peptydoglikanie,  
przy czym korzystnie bakterie Gram(+) są wybrane z rodzaju *Staphylococcus*, korzystnie są *S. aureus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*.
12. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 11, **znamienna tym**, że jest w postaci płynu, emulsji, żelu, płynu do rozpylania, lotionu, nawilżonej chustki lub opatrunku, korzystnie opatrunek jest w postaci plastra z opatrunkiem, plastra z hydrożelem, gazy z naniesioną kompozycją, opatrunku hydrokoloidowego, opatrunku hydrowłóknistego, opatrunku alginianowego, bandaża z naniesioną kompozycją.
13. Kompozycja kosmetyczna lub pielęgnacyjna do zastosowań kosmetycznych, pielęgnacyjnych i higienicznych u ludzi i/lub zwierząt, **znamienna tym**, że zawiera hydrolazę peptydoglikanową jak określoną w zastrz. 1–8, przy czym kompozycja zawiera dodatkowo co najmniej jeden

- nośnik dopuszczony w zastosowaniach kosmetycznych, pielęgnacyjnych, higienicznych u ludzi i/lub zwierząt i jest przeznaczona do stosowania zewnętrznego.
14. Kompozycja zawierająca hydrolazę peptydoglikanową jak określoną w zastrz. 1–8 oraz nośnik do zastosowania jako środek antyseptyczny, środek przeciwbakteryjny, środek do odkażania powierzchni stosowany wobec bakterii Gram(+) posiadających glicynowe i/lub glicynowo-serynowe mostki sieciujące w peptydoglikanie,  
przy czym korzystnie kompozycja stosowana jest wobec bakterii Gram(+) z rodzaju *Staphylococcus*, korzystnie wybranych z *S. aureus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*.
  15. Kompozycja według zastrz. 14, **znamienna tym**, że jest w postaci płynu, emulsji, żelu, płynu do rozpylania, lotionu, nawilżonej chustki lub opatrunku, korzystnie opatrunek jest w postaci plastra z opatrunkiem, plastra z hydrożelem, gazy z naniesioną kompozycją, opatrunku hydrokolidowego, opatrunku hydrowłóknistego, opatrunku alginianowego, bandaża z naniesioną kompozycją.
  16. Niemedyczne zastosowanie hydrolazy peptydoglikanowej jak określonej w zastrz. 1–8 i/lub kompozycji jak określonej w zastrz. 10 do proteolizy ścian komórkowych bakterii Gram(+) posiadających glicynowe i/lub glicynowo-serynowe mostki sieciujące w peptydoglikanie, przy czym korzystnie bakteriami Gram(+) są bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, korzystnie *S. aureus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*.
  17. Niemedyczne zastosowanie hydrolazy peptydoglikanowej jak określonej w zastrz. 1–8 i/lub kompozycji jak określonej w zastrz. 10 jako środka bakteriostatycznego lub bakteriobójczego przeciwko bakteriom Gram(+) posiadającym glicynowe i/lub glicynowo-serynowe mostki sieciujące w peptydoglikanie, korzystnie przeciwko bakteriom z rodzaju *Staphylococcus*, korzystnie *S. aureus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*.
  18. Zastosowanie według zastrz. 17, **znamiennie tym**, że środek stosowany jest w przemyśle spożywczym, szczególnie jako dodatek do żywności dla ludzi i/lub zwierząt lub do odkażania powierzchni i pomieszczeń, które mają kontakt z żywnością lub z półproduktami żywnościowymi.
  19. Zastosowanie według zastrz. 17–18, **znamiennie tym**, że środek stosowany jest w przemyśle mleczarskim i przetworach mlecznych.
  20. Zastosowanie według zastrz. 17, **znamiennie tym**, że środek stosowany jest w przemyśle kosmetycznym, korzystnie jako dodatek do kosmetyków polepszający ich jakość mikrobiologiczną, korzystnie jako dodatek do płynów, kremów, mleczeek, lotionów.
  21. Zastosowanie według zastrz. 17, **znamiennie tym**, że środek stosowany jest w ochronie zdrowia do odkażania powierzchni narzędzi i przyrządów stosowanych w medycynie i diagnostyce, oraz innych powierzchni, w szczególności powierzchni szpitalnych i laboratoryjnych.
  22. Zastosowanie według zastrz. 17, **znamiennie tym**, że środek stosowany jest jako środek bakteriostatyczny lub bakteriobójczy w postaci płynu, emulsji, żelu, płynu do rozpylania, lotionu, nawilżonej chustki.
  23. Sposób hydrolizy peptydoglikanów posiadających glicynowe i/lub glicynowo-serynowe mostki sieciujące, **znamienny tym**, że obejmuje poniższe etapy, w których
    - a) w środowisku wodnym kontaktuje się aktywną formę AurR jak określoną w zastrz. 1–8 z substratem peptydowym posiadającym glicynowe i/lub glicynowo-serynowe mostki sieciujące w peptydoglikanie;
    - b) hydrolizuje się substrat peptydowy posiadający glicynowe i/lub glicynowo-serynowe mostki sieciujące w peptydoglikanie.
  24. Sposób hydrolizy peptydoglikanów według zastrz. 23, **znamienny tym**, że hydrolizowane są peptydoglikany ścian komórkowych bakterii Gram(+) , korzystnie z rodzaju *Staphylococcus*, korzystnie *S. aureus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*.
  25. Sposób hydrolizy peptydoglikanów według zastrz. 23–24, **znamienny tym**, że etap b) prowadzi się w temperaturze od 4°C do 45°C.

## Rysunki

Fig. 1

*A**B*

## Sekwencja AurR+

Domena CD z AurR aminokwasy 1-138 z SEQ ID NO: 2 (158-295 z wyjściowego AurR):

MEPYASAQWLTKYQLTAGYGHYNLNINNGMHYGADFAMPIGTPVRAITGGKIIIEAGWSPYGGGNQIGVKEPDGSHYQ  
WYMHLSQLNVRVGDYISTGQIIGKSGSTGFSTGPHLHFQRMVGGGLGNNYAQNPIPFLLKQYG

Linker z AurR aminokwasy 139 -159 z SEQ ID NO: 2 (296-316 z wyjściowego AurR):

YGSNTSGYTTPVNRVQAPSTN

Domena CWT z AurR aminokwasy 160- 253 z SEQ ID NO: 3 (317-410 z wyjściowego AurR):

STYKVDGKGTYYKAESASFTANYDIKTRLNGPFRSNPQSGVLHPGQTIKYDTVMKQDGHVWVYTGYSKGRIYLPVR  
TWDKNSNTLGPLWGIIN

Fig. 1 kontynuacja

C**Chimera A vs AurR+**

| Alignment statistics for match Chimera A vs AurR <sup>+158-410</sup> |                                                                 |              |            |
|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------|------------|
| NW Score                                                             | Identities                                                      | Positives    | Gaps       |
| 712                                                                  | 139/254(55%)                                                    | 171/254(67%) | 12/254(4%) |
| Chimera A                                                            | MGHAKDASWLT SRKQLQPYGQYH---GGGAHYGVDYAMPENSPVYSLTDGTVVQAGWSNY   | 57           |            |
| AurR                                                                 | M A WLT + YG Y+ G HYG D+AMP +PV ++T G +++AGWS Y                 | 60           |            |
| Chimera A                                                            | GGGNQVTIKEANSNNYQWYMHNNRLTVSAGDKVKAGDQIAYSGSTGNS TAPHVHFQRM SG  | 117          |            |
| AurR                                                                 | GGGNQ+ +KE + ++YQWYMH ++L V GD + G I SGSTG ST PH+HFQRM G        | 120          |            |
| Chimera A                                                            | GIGNQYAVDPTSYLQSRAGYGKAAS TVTP-----TPNTGWKTNKYGTLYKSESASFT      | 169          |            |
| AurR                                                                 | G+GN YA +P +L+ + GYG S TP + N+ +K + GT YK+ESASFT                | 179          |            |
| Chimera A                                                            | PNTDII TRTTGPFRSMPQSGVLKAGQTIHYDEV MKQDGHVWVG YTGNSGQRIYLPVRTWN | 229          |            |
| AurR                                                                 | N DI TR GPFRS PQSGVL GQTI YD VMKQDGHVWV YTG SG+RIYLPVRTW+       | 239          |            |
| Chimera A                                                            | KSTNTLGVLWG TIK 243                                             |              |            |
| AurR                                                                 | K++NTLG LWG I                                                   |              |            |
| Chimera A                                                            | KSTNTLGVLWG TIK 243                                             |              |            |
| AurR                                                                 | KNSNTLGPLWGI IN 253                                             |              |            |

D**Lss vs AurR+**

| Alignment statistics for match Chimera A vs AurR <sup>+158-410</sup> |                                                                 |              |           |
|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------|-----------|
| NW Score                                                             | Identities                                                      | Positives    | Gaps      |
| 833                                                                  | 162/254(64%)                                                    | 184/254(72%) | 9/254(3%) |
| Lss                                                                  | AATHEHSAQWLNNYKKGYGYGPYPLGINGGMHYGVDFMNI GTPVKAISSGKIVEAGWSN    | 60           |           |
| AurR                                                                 | + SAQWL Y+ GYG Y L IN GMHYG DF M IGTPV+AI+ GKI+EAGWS            | 59           |           |
| Lss                                                                  | YGGGNQIGLIENDGVHRQWYMHLSKYNVKGVDYVKAGQIIGWSGSTGYSTAPHLHFQRMV    | 120          |           |
| AurR                                                                 | YGGGNQIG+ E DG H QWYMHLS+ NV+VG DY+ GQIIG SGSTG+ST PHLHFQRMV    | 119          |           |
| Lss                                                                  | NSFSNSTAQDMPFLKSAGYGKAGGT VTP-----TPNTGWKTNKYGTLYKSESASFT       | 172          |           |
| AurR                                                                 | N+ AQ+P+PFLK GYG TP + N+ +K + GT YK+ESASFT                      | 179          |           |
| Lss                                                                  | PNTDII TRTTGPFRSMPQSGVLKAGQTIHYDEV MKQDGHVWVG YTGNSGQRIYLPVRTWN | 232          |           |
| AurR                                                                 | N DI TR GPFRS PQSGVL GQTI YD VMKQDGHVWV YTG SG+RIYLPVRTW+       | 239          |           |
| Lss                                                                  | KSTNTLGVLWG TIK 246                                             |              |           |
| AurR                                                                 | K++NTLG LWG I                                                   |              |           |
| Lss                                                                  | KSTNTLGVLWG TIK 246                                             |              |           |
| AurR                                                                 | KNSNTLGPLWGI IN 253                                             |              |           |



Fig. 2

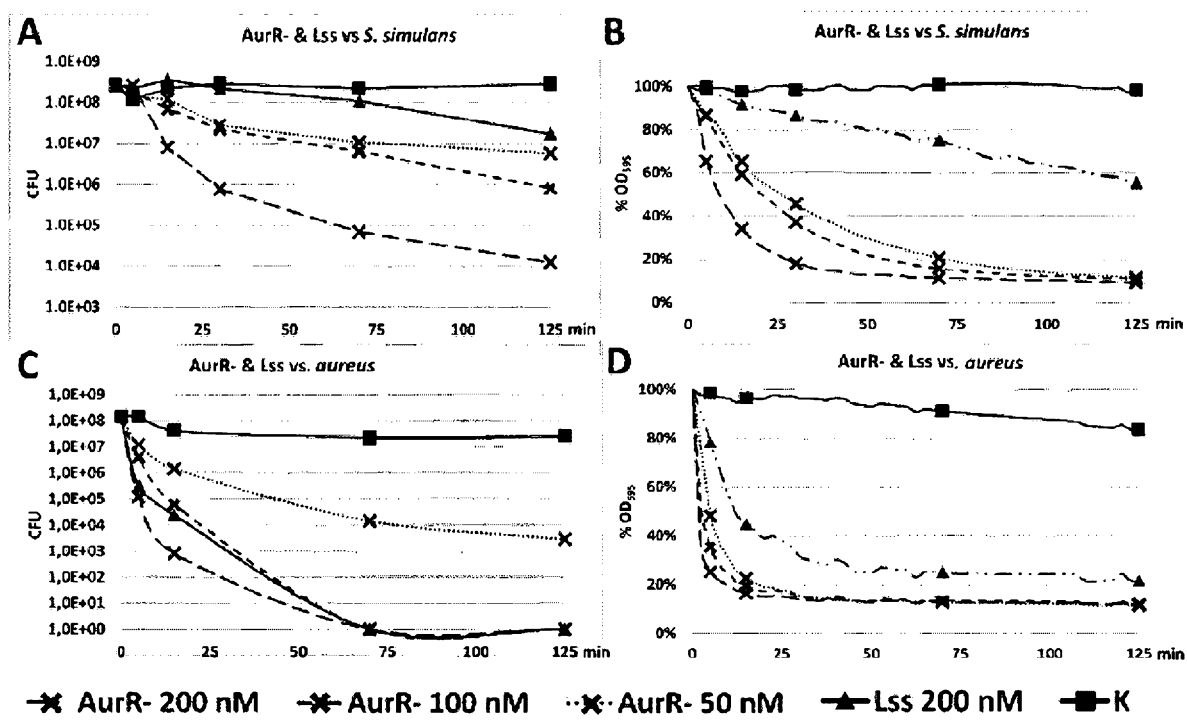


Fig. 3

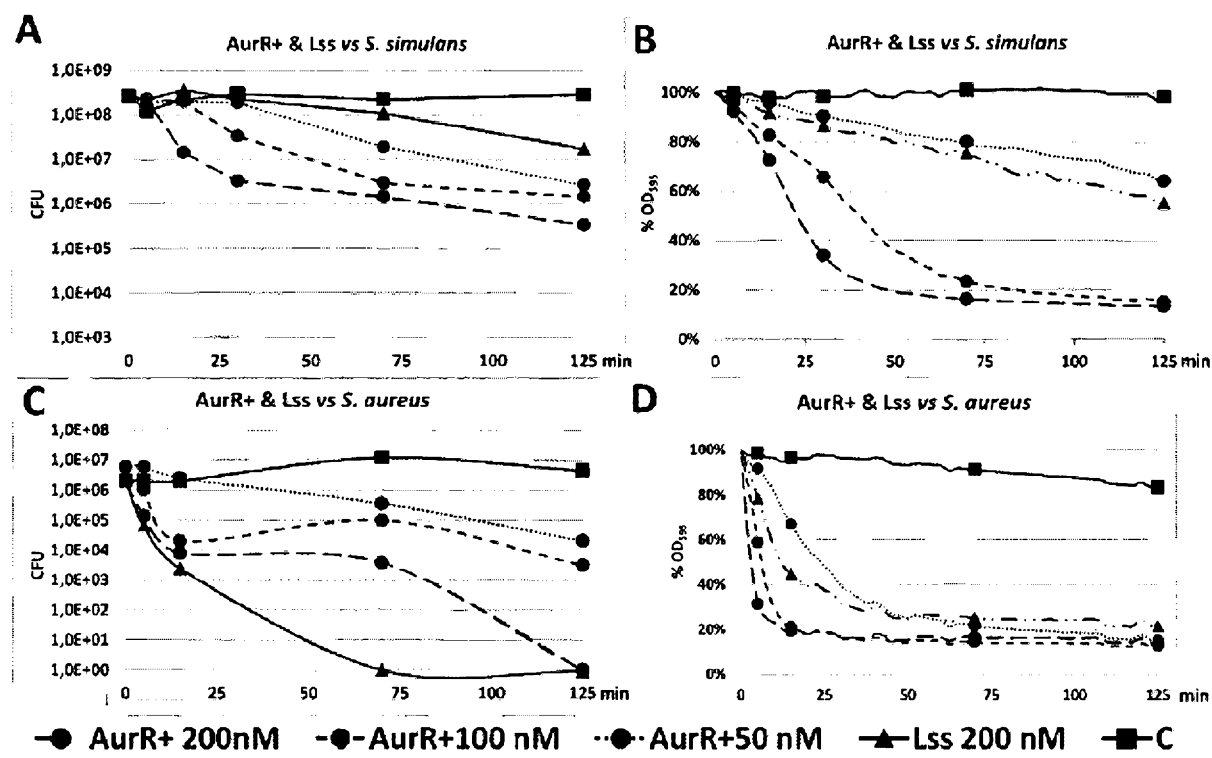


Fig. 4

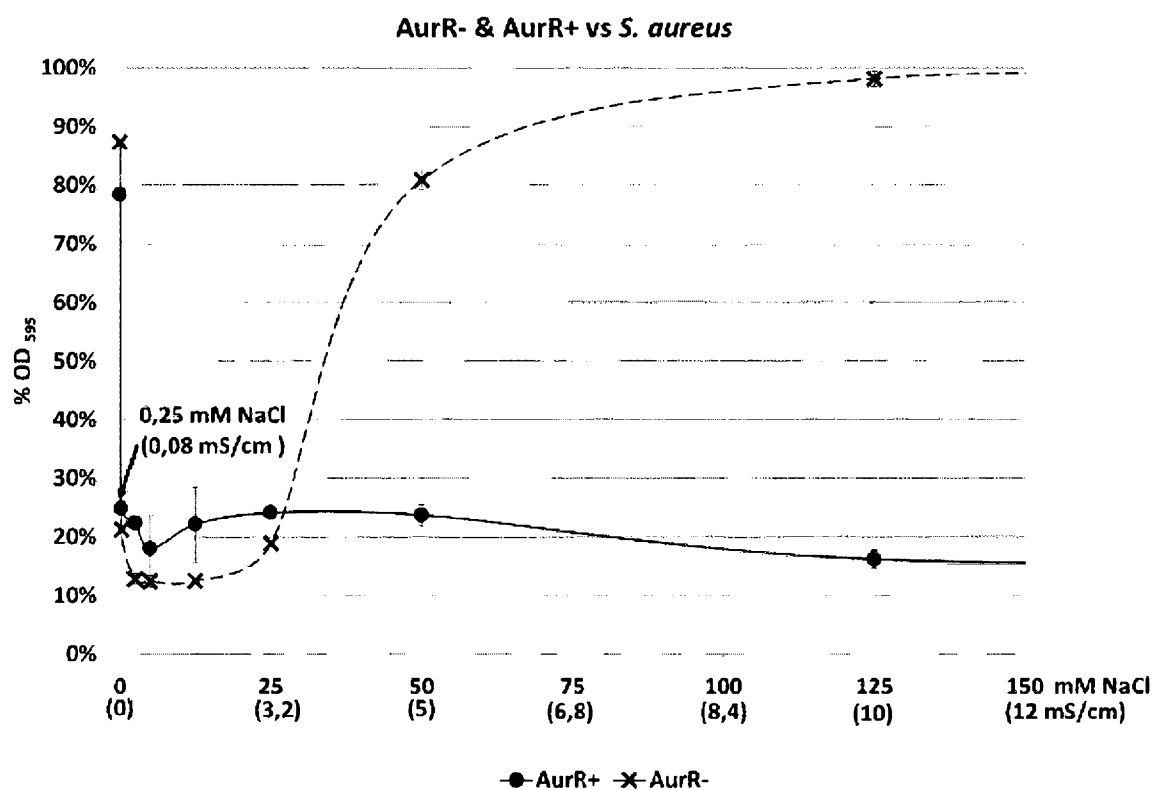


Fig. 5

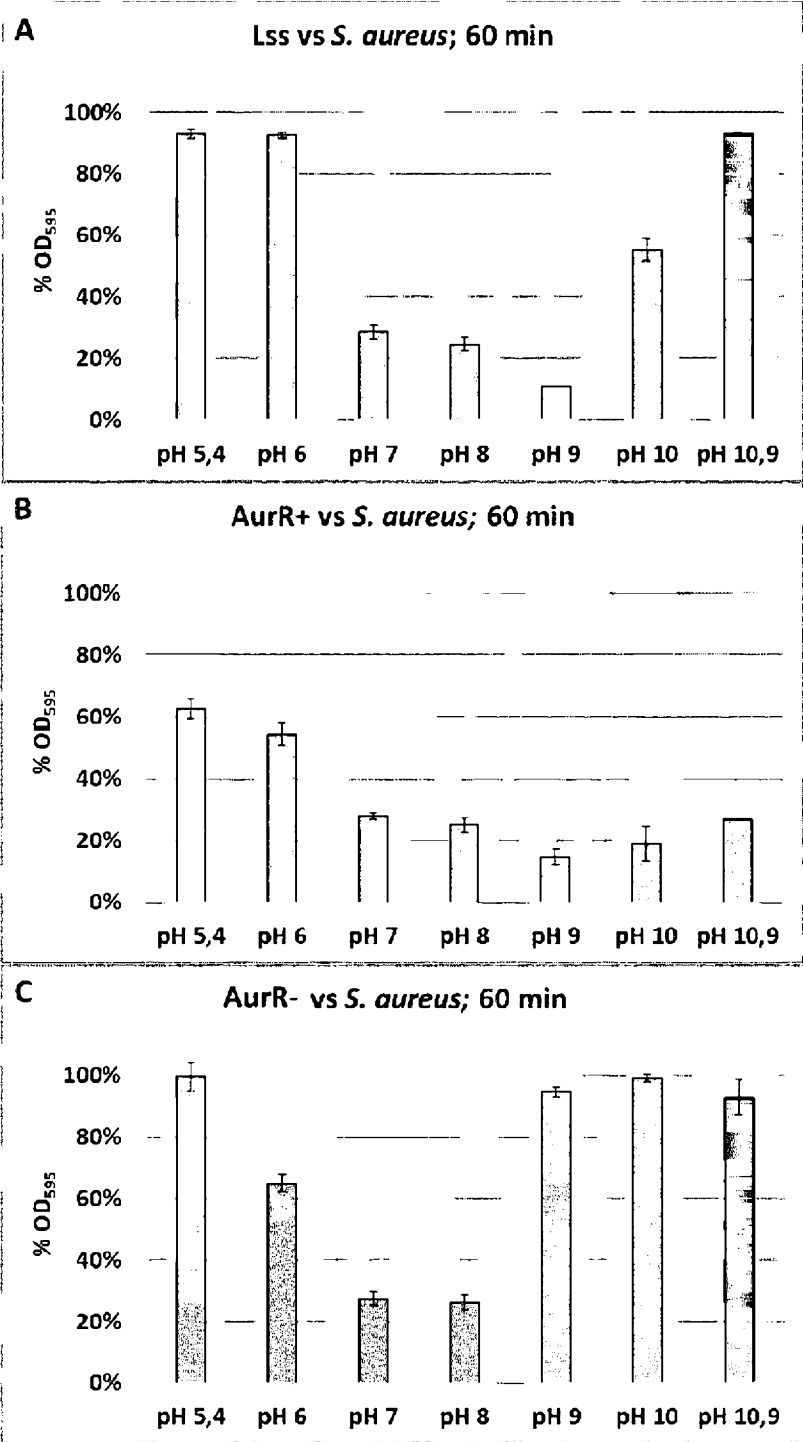


Fig. 6

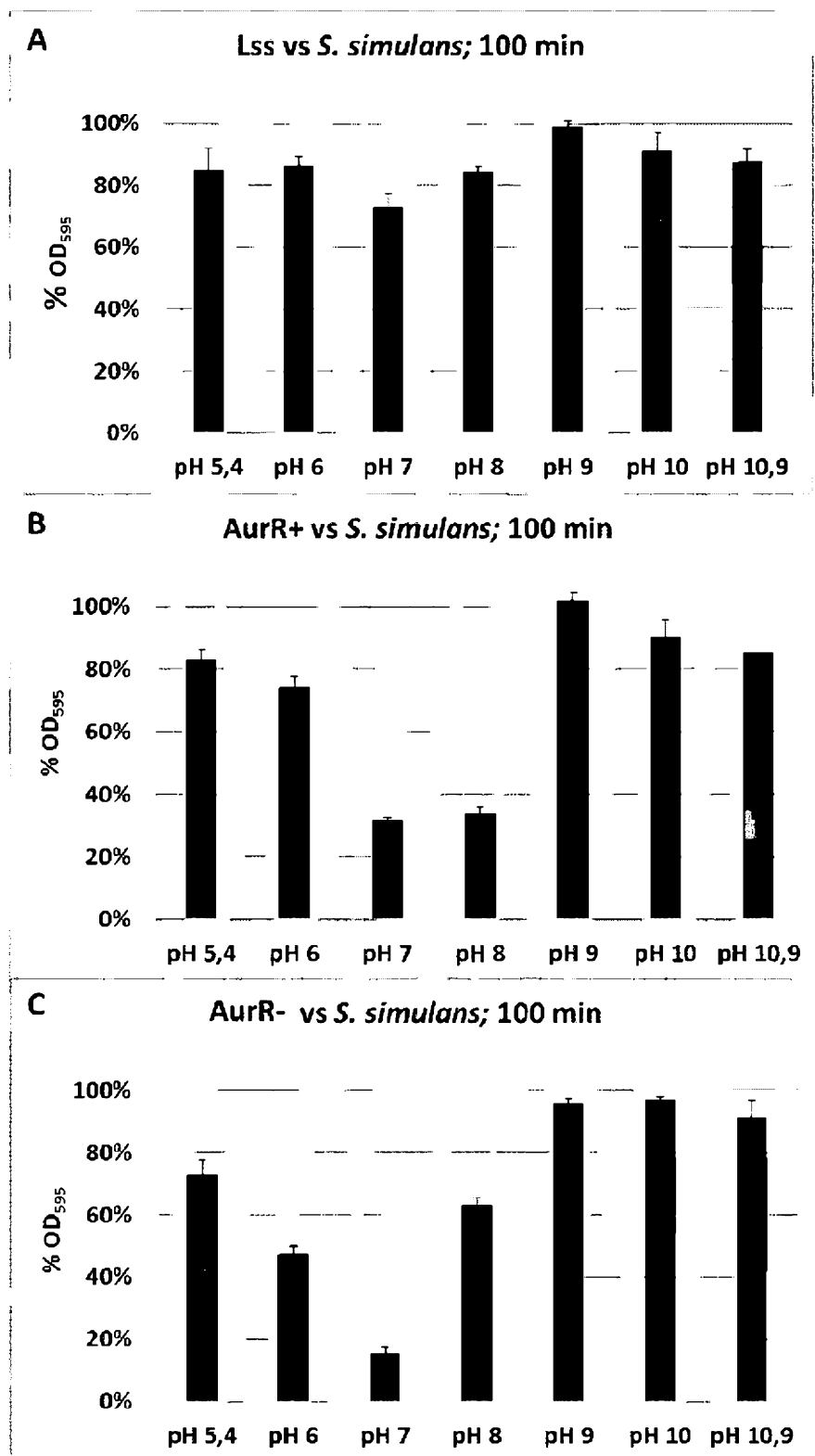


Fig. 7

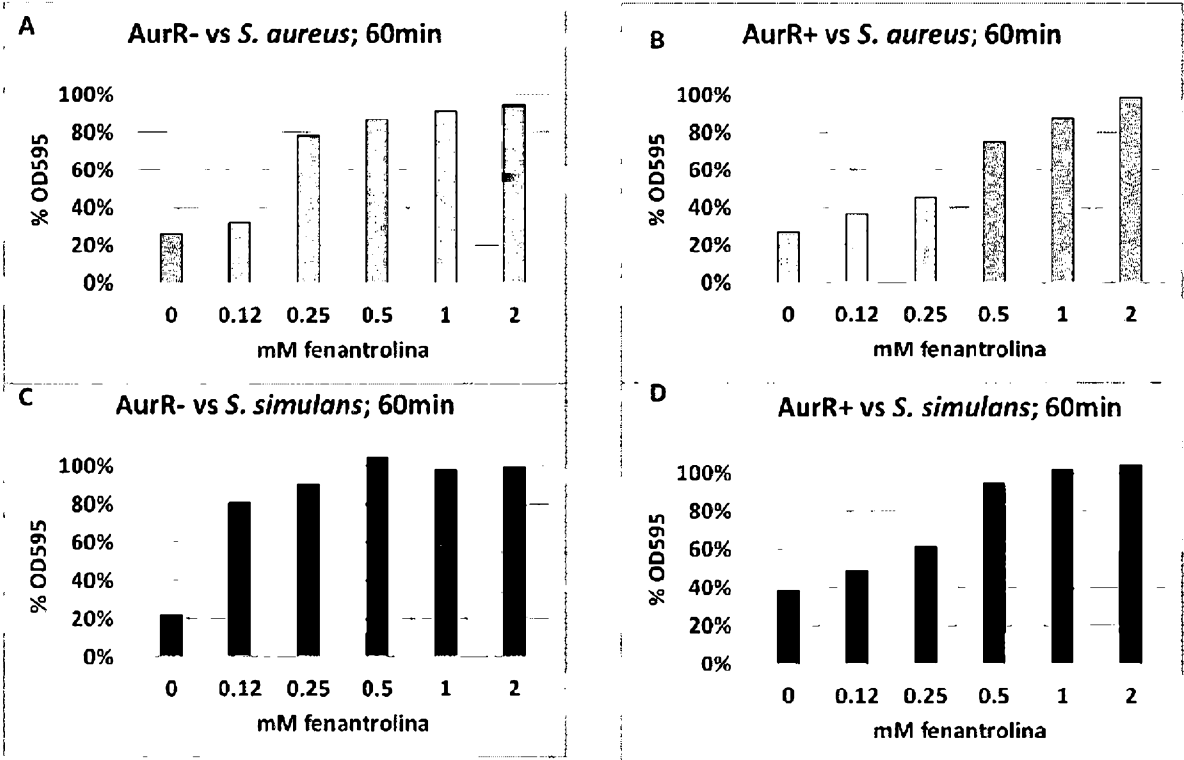


Fig. 8

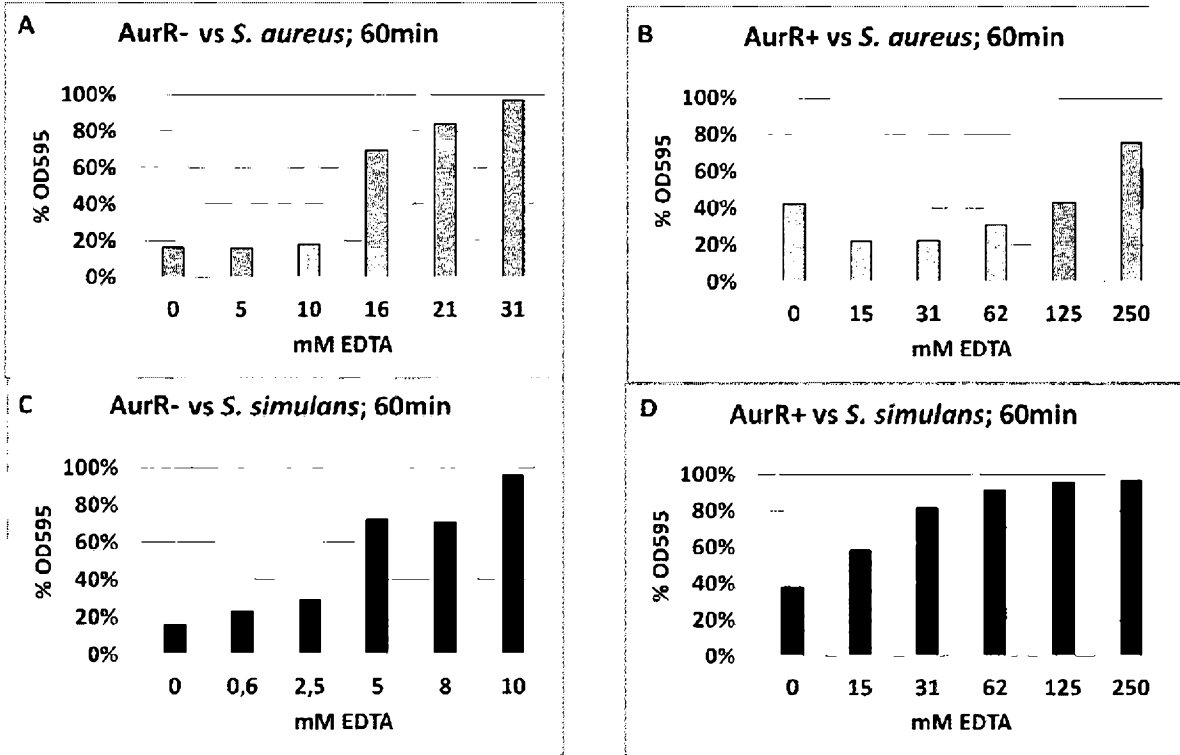


Fig. 9

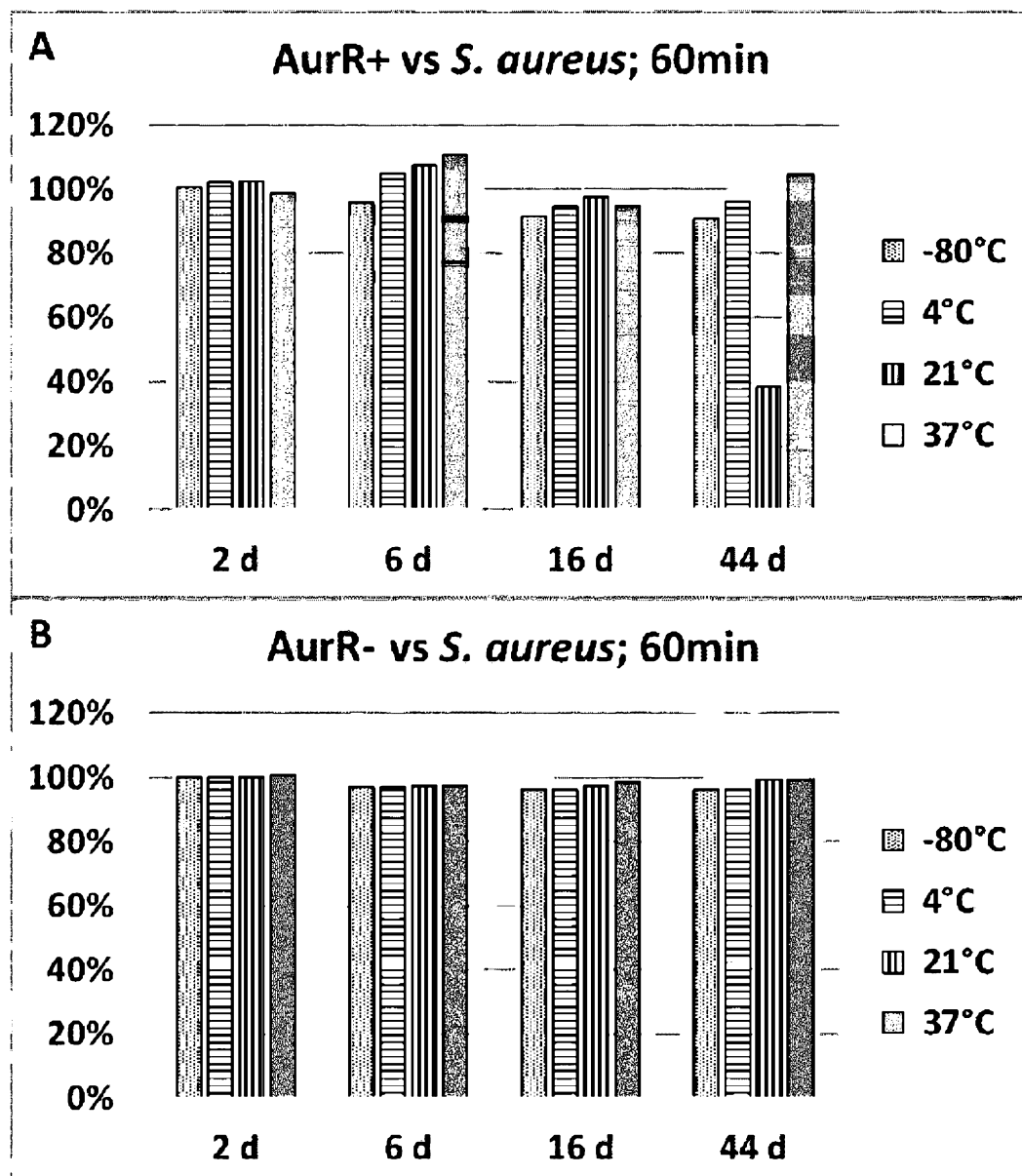




Fig. 10

