

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 722**

51 Int. Cl.:
C07K 14/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07797461 .6**
96 Fecha de presentación: **14.05.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2021358**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.02.2009**

54 Título: **Bacteriocinas modificadas y métodos para su uso**

30 Prioridad:
15.05.2006 US 747299 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.09.2012

73 Titular/es:
**AVIDBIOTICS CORPORATION
385 OYSTER POINT BOULEVARD, SUITE 6A
SOUTH SAN FRANCISCO CA 94080-1970, US**

72 Inventor/es:
**MARTIN, David W., Jr.;
JAMIESON, Andrew C.;
SCHOLL, Dean M. y
WILLIAMS, Steven R.**

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

ES 2 387 722 T3

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

DESCRIPCIÓN

Bacteriocinas modificadas y métodos para su uso

5 **Campo de la descripción**

Esta descripción se refiere a formas modificadas de bacteriocinas de alto peso molecular (apm) que se producen de manera natural, tales como las piocinas de tipo R de *Pseudomonas aeruginosa*. Las bacteriocinas están modificadas en los extremos de sus fibras de la cola en una región responsable de la afinidad y especificidad de unión a sus parejas de unión relacionadas, o receptores, tales como los de la superficie de bacterias. También se describen métodos para el uso de las bacteriocinas modificadas, tales como para unirse a receptores, incluyendo factores de virulencia o adaptación, en las superficies de bacterias.

15 **Antecedentes de la descripción**

Actualmente, se presta mucha más atención global a las amenazas de patógenos virales que a las de enfermedades bacterianas. Sin embargo, las bacterias resistentes a antibióticos omnipresentes siguen causando estragos en el cuidado de pacientes y en la contención de costes en hospitales y otras instalaciones de cuidado médico. Al mismo tiempo, hay un repliegue en el desarrollo de antibióticos en favor de fármacos para enfermedades crónicas y mejoras del estilo de vida. En los últimos veinte años, sólo dos nuevas clases de antibióticos (oxazolidinonas y lipopéptidos) se han introducido en el mercado de EE.UU. (Wenzel, 2004).

Solo en EE.UU., hay más de 2 millones de casos de infecciones bacterianas adquiridas en hospitales cada año. De estos, aproximadamente 90.000 personas morirán. La estadística más alarmante es la de que más del 70% de estos responsables bacterianos son resistentes a al menos un fármaco antibacteriano (Bad Bugs, No Drugs, 2004). Este número sigue aumentando a una velocidad alarmante. El coste anual para la economía de EE.UU. de estas infecciones intrahospitalarias resistentes a antibióticos supera los 5000 millones de \$. La realidad de esta amenazante situación global forzará a un nuevo enfoque para el desarrollo y uso de agentes antibacterianos (Talbot *et al.*, 2006). Cuando crece el uso (y abuso) extensivo de anticuerpos en medicina humana y animal, también lo hace el surgimiento de patógenos bacterianos resistentes a antibióticos hasta el punto de que muchos antibióticos que una vez fueron "fármacos milagrosos" son ahora clínicamente ineficaces (Microbial Threats to Health, 2003).

Como ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno ubicuo para plantas y animales que está presentando una incidencia rápidamente creciente de resistencia a múltiples fármacos antibióticos (Microbial Threats to Health, 2003; Bad Bugs, No Drugs, 2004). *P. aeruginosa* es un bacilo aerobio, móvil, gram-negativo. *P. aeruginosa* habita normalmente en el suelo, el agua y la vegetación. Aunque pocas veces provoca enfermedades en personas sanas, es un patógeno oportunista que representa aproximadamente el 10% de todas las infecciones intrahospitalarias (National Nosocomial Infection Survey report-Data Sumario de octubre de 1986-abril de 1996). *P. aeruginosa* es el patógeno más común que afecta a pacientes con fibrosis quística (FQ), presentando el 61% de las muestras cultivadas resultados positivos (Govan, J. R. W. y V. Deretic, 1996, Microbiol. Reviews, 60(3):530-574) así como uno de los dos patógenos más comunes observados en unidades de cuidados intensivos (Jarvis, W. R. *et al.*, 1992, J. Antimicrob. Chemother., 29 (un sup.): 19-24).

La mortalidad por algunas infecciones por *P. aeruginosa* puede ser tan alta como el 50%. Actualmente, la infección por *P. aeruginosa* puede controlarse todavía eficazmente mediante antibióticos, particularmente usando una combinación de fármacos. Sin embargo, se ha mostrado resistencia a varios de los antibióticos comunes y es particularmente problemática en unidades de cuidados intensivos (Archibald, L. *et al.*, 1997, Clin. Infectious Dis., 24(2):211-215; Fish, D. N., *et al.*, 1995, Pharmacotherapy, 15(3):279-291). Adicionalmente, *P. aeruginosa* ha demostrado ya mecanismo para adquirir plásmidos que contienen genes de resistencia a múltiples antibióticos (Jakoby, G. A. (1986), The bacteria, vol. X, The biology of Pseudomonas, págs. 265-294, J. R. Sokach (ed.) Academic Press, Londres) y en la actualidad no hay ninguna vacuna aprobada para la infección por *Pseudomonas*.

Como muchas otras especies bacterianas, la variabilidad de cepas en *P. aeruginosa* es bastante significativa. Se ha mostrado que se produce variabilidad mediante varios mecanismos diferentes, incluyendo estos, pero sin limitarse a, la integración de profagos en un genoma bacteriano (Zierdt, C. H. y P. J. Schmidt, 1964, J. Bacteriol. 87:1003-1010), la adición del gen de citotoxina de bacteriófagos (Hayashi, T., *et al.*, 1994, FEMS Microbiol. Lett. 122:239-244) y mediante transposones (Sinclair, M. I. y B. W. Holloway, 1982, J. Bacteriol. 151:569-579). A través de este tipo de diversidad, se han incorporado nuevos mecanismos patógenos en *P. aeruginosa*. Estas y otras transiciones tales como la conversión al fenotipo mucoso, comúnmente observada en FQ, ilustran claramente la necesidad de una vigilancia continuada.

Estas preocupaciones apuntan a la necesidad de herramientas de diagnóstico y agentes terapéuticos destinados a la identificación apropiada de cepas resistentes a fármacos y la erradicación de la virulencia.

65 Muchas bacterias producen bacteriocinas, que son sustancias bactericidas, durante su crecimiento. Las bacteriocinas están compuestas por polipéptidos y varían en peso molecular. Aunque se han usado bacteriocinas

por sus propiedades antibacterianas, algunas tienen espectros bactericidas más limitados que muchos antibióticos usados clínicamente. Por ejemplo, se ha notificado que algunas bacteriocinas reconocen, y de ese modo actúan sólo sobre, miembros de la misma especie o especies estrechamente relacionadas uniéndose a sitios receptores en organismos sensibles, o susceptibles.

5 Como clasificación amplia, se han dividido las bacteriocinas en tres tipos. Las primeras son moléculas pequeñas que son termoestables. Los ejemplos de este primer tipo incluyen colicina V (siendo las colicinas específicas para bacterias coliformes). El segundo tipo, piocinas de tipo S producidas por *P. aeruginosa*, son moléculas proteicas de peso molecular superior. El tercer tipo incluye bacteriocinas que se asemejan genética y morfológicamente a las partes de la cola de bacteriófagos. Los ejemplos de este último tipo incluyen las piocinas de tipo F y de tipo R de *P. aeruginosa* así como enterocolitina de *Yersinia*. Se ha notificado que estas piocinas se derivan de un bacteriófago ancestral, y tienen similitudes con la familia del fago lambda y la familia del fago P2, respectivamente.

15 Las piocinas de tipo R son similares a las partes de la cola contráctiles y no flexibles de bacteriófagos de la familia *Myoviridae* y están codificadas en una única agrupación de genes en el genoma de *Pseudomonas* (Shinomiya *et al.*, 1983). Véase la figura 1. Tras unirse específicamente a una bacteria diana, estas piocinas forman un poro en la célula bacteriana, comprometiendo la integridad de su membrana citoplasmática y provocando despolarización de la membrana. Las piocinas de tipo F también son similares a una cola de bacteriófago, pero tienen una estructura similar a un bacilo flexible y no contráctil. Las piocinas se producen por la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa*, y algunas cepas sintetizan más de una piocina.

20 Las piocinas de tipo R son bacteriocinas de alto peso molecular complejas producidas por algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, y tienen actividad bactericida contra otras determinadas cepas de *P. aeruginosa* (para una revisión véase Michel-Briand y Baysse, 2002). Se han identificado hasta la fecha cinco piocinas de tipo R y, basándose en sus espectros de diana (véase a continuación), se denominan R1 a R5. La cepa PAO1 produce la piocina R2, que está codificada en una agrupación génica que consiste en 16 marcos de lectura abiertos (ORF), 12 de los cuales muestran similitud de secuencia significativa con ORF de los bacteriófagos P2, PS17, Φ CTX y otros fagos similares a P2 (Nakayama *et al.*, 2000). La producción de piocinas se induce por el daño en el ADN (Matsui *et al.*, 1993) y se regula por RecA, que degrada PrtR, el represor de PrtN, un regulador de la transcripción positivo de la agrupación. La inducción de genes de piocinas da como resultado la síntesis de aproximadamente 200 partículas de piocinas por célula bacteriana seguido por la lisis de la célula mediante mecanismos similares a los de la lisis de bacteriófagos. Las piocinas destruyen rápida y específicamente células diana uniéndose en primer lugar al lipopolisacárido (LPS) mediante sus fibras de la cola, seguido por contracción de la vaina y penetración del núcleo a través de la membrana externa bacteriana, la pared celular y la membrana citoplasmática. Esta penetración compromete la integridad de la membrana citoplasmática y la despolarización del potencial de membrana (Urutani y Hoshino, 1984). En muchos aspectos, las piocinas pueden considerarse como profagos defectuosos adaptados por el huésped para producir partículas antibacterianas no infecciosas, resistentes a proteasas y ácidos que consisten sólo en el aparato de la cola adaptado, es decir, sin cápsidas o ADN. La replicación de los genes de piocinas requiere la replicación del genoma bacteriano en el que están insertados.

40 Las cinco especificidades de receptores de piocinas diferentes están relacionadas linealmente entre sí con dos ramas. (Ito *et al.*, 1970; Meadow y Wells, 1978; Kageyama, 1975). La piocina R5 tiene el espectro más amplio e incluye las especificidades de las otras cuatro. Los receptores para los otros cuatro tipos R forman dos ramas, o familias de especificidades, que divergen de R5. Una rama incluye los receptores para R3, R4 y R2, en ese orden en el que la especificidad de receptor por la piocina R3 es la más distal de la superficie celular. La segunda rama contiene el receptor de R1, que parece tener un determinante de especificidad no relacionado con aquellos para R2, R3 y R4. Las dos ramas parecen unirse al receptor para R5 puesto que todas las cepas de *P. aeruginosa* que son sensibles a cualquiera de las piocinas R1-R4 son sensibles también a R5, mientras que algunas cepas son sensibles sólo a la piocina R5. Algunas cepas de *P. aeruginosa* son resistentes a todas las 5 piocinas de tipo R que se producen de manera natural.

55 Las piocinas de *P. aeruginosa* destruyen específicamente cepas de principalmente *P. aeruginosa* pero también se ha mostrado que destruyen algunas cepas de especies de *Hemophilus*, *Neisseria* y *Campylobacter* (Filiatrault *et al.*, 2001; Morse *et al.*, 1976; Morse *et al.*, 1980; Blackwell *et al.*, 1981, 1982).

60 La especificidad de las piocinas de tipo R la confiere la fibra de la cola codificada por *prf15*. PRF15 está relacionada muy estrechamente con las fibras de la cola de fagos de la familia *Myoviridae*, particularmente fagos similares a P2 (Nakayama *et al.*, 2000). Estas fibras de la cola son homotrimeros dispuestos simétricamente en una estructura de placa basal con seis copias por partícula, tal como se muestra en la figura 1. La región N-terminal de la fibra de la cola se une a la placa basal, y la parte C-terminal, probablemente cerca de la punta, se une al receptor bacteriano y de ese modo confiere la especificidad de destrucción. Una chaperona relacionada, codificada por *prf16* (en el caso de piocinas de tipo R) se ubica inmediatamente en el sentido de 3' de *prf15*, y es necesaria para el plegamiento apropiado de la fibra de la cola y/o el ensamblaje de las fibras de la cola en la estructura de la piocina. Las partículas de piocinas de tipo R se han descrito como inmunoquímica y genéticamente similares a las colas de determinados bacteriófagos de *P. aeruginosa* (Kageyama 1975, Kageyama *et al.* 1979, Shinomiya *et al.* 1989, y Shinomiya *et al.* 1983b). Se ha propuesto que piocinas de tipo R y bacteriófagos de *Pseudomonas*, tales como PS-17 y Φ CTX, están

relacionados a través de un bacteriófago lisogénico ancestral común del cual se perdieron los genes que codificaban para las proteínas de la cabeza y las funciones de replicación y los genes del fago residuales se adaptaron para su función como componentes de las piocinas de tipo R defensivas (Shinomiya *et al.* 1989).

- 5 Se han descrito bacteriocinas de alto peso molecular de tipo R similares en otras bacterias incluyendo *Yersinia enterocolitica* (Strauch *et al.*, 2001), *Listeria monocytogenes* (Zink *et al.*, 1995), *Staphylococcus aureus* (Birmingham & Pattee, 1981) y *Erwinia amylovora* (Jabrane *et al.*, 2002). La clasificación y nomenclatura de las bacteriocinas han experimentado cambios a lo largo del tiempo, particularmente dadas las pruebas crecientes de su origen, química y actividades. Normalmente, la denominación de las bacteriocinas se basa en la especie productora. Por ejemplo, *E. coli* produce bacteriocinas denominadas colicinas; *Pseudomonas aeruginosa* produce piocinas; *Listeria monocytogenes* produce monocinas; *Yersinia enterocolitica* produce enterocolitocinas; y así sucesivamente. Históricamente, la clasificación comenzó con la identificación de aproximadamente 20 colicinas que se clasificaron como A-V. En la mayoría de los casos, cada bacteriocina parece ser de acción específica para la misma especie, o especies taxonómicamente relacionadas, de organismos. Las cepas productoras de piocinas normalmente son resistentes a su propia piocina. Se describe un ensayo general para la concentración de bacteriocina en la patente de EE.UU. 4.142.939.

La mención de los documentos anteriores no está prevista como una admisión de que cualquiera de lo anterior es técnica anterior pertinente. Todas las afirmaciones en cuanto a la fecha o representación y en cuanto al contenido de estos documentos se basa en la información disponible para el solicitante y no constituye ninguna admisión en cuanto a la exactitud de las fechas o el contenido de estos documentos.

Sumario de la descripción

- 25 Esta descripción se refiere a formas modificadas por ingeniería genética de la clase de bacteriocinas que se asemejan a, pero son distintas de, colas de bacteriófagos. Estas bacteriocinas incluyen piocinas de tipo R.

Las bacteriocinas de APM naturales son normalmente termolábiles, resistentes a tripsina y pueden inducirse por agentes que activan el sistema SOS. Por ejemplo, se han identificado en muchas enterobacterias, especies de *Pseudomonas*, *Rhizobium lupin*, especies de *Bacillus*, especies de *Yersinia* y especies de *Flavobacterium*.

Una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética está compuesta por múltiples copias de varias subunidades polipeptídicas diferentes y tiene una o más fibras de la cola constituidas por proteínas de fibras de la cola. Cada fibra de la cola contiene un dominio de unión al receptor (RBD) que se une a, o interacciona con, un receptor para formar un par de unión. El RBD es la parte de una fibra de la cola que comprende la propiedad de unión a bacterias que la convierte en el primer miembro del par de unión. Un RBD tal como se da a conocer en el presente documento comprende la modificación de una proteína en la fibra de la cola para formar una fibra de la cola modificada. La fibra de la cola modificada con las otras subunidades polipeptídicas forma una bacteriocina de apm alterada por ingeniería genética (o modificada). El receptor al que se une el RBD es el segundo miembro del par de unión, y puede ser igual que, o diferente de, el receptor para una bacteriocina sin la fibra de la cola modificada. En algunas realizaciones de la descripción, el segundo miembro de un par de unión es un factor de virulencia o adaptación de una bacteria patógena. En otras realizaciones, el segundo miembro es un componente de la(s) capa(s) más externa(s) de una célula bacteriana, tal como una membrana celular o, en el caso de bacterias gram-positivas, un componente de la pared celular.

En comparación con una bacteriocina de apm que carece de la fibra de la cola modificada, una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética puede diferir en el número, la manera y la fuerza de unión de sus interacciones con un receptor. Por tanto, una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética puede tener propiedades de unión diferentes o adicionales (por ejemplo, especificidades, afinidades y/o avidedces de unión) en comparación con una bacteriocina sin la modificación. Una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética no es una molécula que se produce de manera natural sino que puede ser una versión modificada de una molécula que se produce de manera natural. Alternativamente, una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética puede ser una versión modificada de otra bacteriocina que no se produce de manera natural. En la mayoría de las realizaciones, una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética sigue siendo un agente letal para células bacterianas que expresan un receptor al que se une la bacteriocina.

Según la presente invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína de fibras de la cola de bacteriocina de alto peso molecular (apm), en la que dicha proteína de fibras de la cola comprende una región de unión a la placa basal (BPAR) de una piocina de tipo R y un dominio de unión al receptor heterólogo (RBD), en la que el RBD es de una fibra de la cola de otra bacteriocina o una fibra de la cola de un bacteriófago o profago, en la que la BPAR consiste en los aminoácidos 1-164 ó 1-240 de la fibra de la cola de piocina de tipo R.

En algunas realizaciones, la fibra de la cola comprende una secuencia heteróloga, o que no es de bacteriocina, en uno o más de los tres monómeros de proteína de fibras de la cola que constituyen una única fibra de la cola trimérica. Y mientras que las fibras de la cola en una bacteriocina nativa, o que se produce de manera natural, pueden ser homotriméricas para formar un RBD, la fibra de la cola de una bacteriocina de apm modificada por

ingeniería genética es o bien heterotrimérica, cuando uno o dos de los monómeros de proteína es/son diferente(s) del/de los otro(s), o bien homotrimérica cuando los tres monómeros de proteína son idénticamente no nativos (que no se producen de manera natural). La presencia de una secuencia heteróloga (o no nativa), en uno o más monómeros de proteína, permite que el trímero forme una fibra de la cola con un RBD modificado.

5 La secuencia heteróloga está por tanto en una parte del/de los monómero(s) de manera que al menos el RBD de la fibra de la cola está alterado en un trímero ensamblado. El RBD alterado cambia las características de unión y las propiedades de la fibra de la cola y de ese modo la actividad de unión de una bacteriocina de apm que contiene la fibra de la cola. El RBD heterólogo se deriva de otra bacteriocina o una proteína de la cola de un bacteriófago o profago. En muchos casos, el RBD heterólogo es un polipéptido que incluye al menos parte de la parte C-terminal de una proteína de fibras de la cola de una bacteriocina, una proteína de fibras de la cola de bacteriófago o una presunta proteína de fibras de la cola, cuya secuencia se ha derivado de un gen de un bacteriófago lisogénico viable o incluso defectuoso que se encuentra dentro del genoma de una bacteria. El RBD heterólogo se fusiona con un polipéptido que contiene una región de unión a la placa basal (BPAR) de una proteína de fibras de la cola de bacteriocina de apm. El polipéptido que contiene la BPAR puede contener toda o parte de la parte N-terminal de una fibra de la cola de bacteriocina de apm, en el que la parte N-terminal puede consistir en cualquier parte de la fibra de la cola excepto el mismo extremo C-terminal.

20 En otras realizaciones, el RBD heterólogo se deriva del determinante del tropismo principal (Mtd) de bacteriófago de *Bordetella*. Los ejemplos no limitativos incluyen un RBD heterólogo que comprende un Mtd modificado o diversificado, opcionalmente con todo o parte del RBD de una fibra de la cola de un bacteriófago. En algunas realizaciones, la fibra de la cola del bacteriófago es la del bacteriófago similar a miovirus de *Vibrio harveyi* (VHML) o sus derivados diversificados o las de otro profago o bacteriófago que comprende una estructura de retroelemento de generación de diversidad (DGR).

25 También se describe una parte de una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética en la que la parte conserva la actividad de unión de la bacteriocina a un receptor en la superficie de una célula bacteriana promoviendo entonces la penetración en la membrana celular. Por tanto, la parte puede ser cualquiera que conserve las actividades de unión (reconocimiento) y penetración en la membrana de una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética. En algunos ejemplos, la parte comprende uno o más polipéptidos de bacteriocina que están truncados.

30 También se describen fibras de la cola modificadas que pueden ser parte de una bacteriocina de apm de la descripción. La fibra de la cola trimérica puede comprender una o más proteínas de fibras de la cola con un RBD modificado o un RBD heterólogo. En algunas realizaciones, la proteína de fibras de la cola monomérica modificada se deriva de una bacteriocina de tipo R mientras que en otras realizaciones la proteína de fibras de la cola se deriva de una proteína de fibras de la cola de bacteriófago.

40 La descripción también incluye secuencias de ácido nucleico que codifican para una proteína de fibras de la cola modificada, así como vectores y/o células (huésped) que contienen las secuencias codificantes. Los vectores y/o las células huésped pueden usarse para expresar las secuencias codificantes para producir proteínas de fibras de la cola modificadas que forman fibras de la cola y se incorporan en una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética de la descripción. También puede introducirse una secuencia que codifica para una proteína de fibras de la cola modificada en una célula bacteriana que produce, o puede producir, una bacteriocina de apm en presencia de la proteína de fibras de la cola modificada. La expresión de la proteína de fibras de la cola modificada da como resultado la producción de una bacteriocina de apm modificada por la célula. Si se inactiva(n) o elimina(n) secuencia(s) de proteínas de fibras de la cola de bacteriocinas naturales, entonces sólo se producirán bacteriocinas de apm modificadas. Si se conserva(n) secuencia(s) de proteínas de fibras de la cola de bacteriocinas naturales, entonces se producirán bacteriocinas de apm modificadas junto con las fibras de la cola de bacteriocinas naturales, y las piocinas modificadas generadas pueden ser mezclas de tanto piocinas modificadas como piocinas naturales. Además, las piocinas generadas a partir de tales bacterias huésped de producción pueden contener piocinas bivalentes (multivalentes), es decir, contienen partículas de piocinas individuales con una mezcla de dos tipos de fibras de la cola, cada una con sus propiedades de unión específicas. Tales piocinas multivalentes tienen especificidades de unión y destrucción múltiples, es decir, dos o más, dentro de la misma partícula o molécula de piocina. Las bacterias transfectadas pueden propagarse para producir bacteriocinas de apm que previenen o inhiben el crecimiento e otras bacterias que expresan un receptor al que se une la bacteriocina de apm modificada o una de las bacteriocinas de apm de la mezcla de bacteriocinas de apm naturales más modificadas.

60 En algunas realizaciones, el receptor es un factor de virulencia o adaptación de una cepa bacteriana virulenta o patógena de manera que la exposición a la bacteriocina de apm modificada previene o inhibe el crecimiento de la cepa virulenta o patógena. Los ejemplos no limitativos de factores de virulencia seleccionados como diana por una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética incluyen los codificados por las secuencias dadas a conocer en la patente de EE.UU. 6.355.411 y la solicitud de patente publicada WO 99/27129 (Ausubel *et al.*), que se incorporan por el presente documento como referencia como si se expusieran completamente.

65 La exposición es opcionalmente mediante contacto, o cocultivo, con bacterias transfectadas que expresan la

- bacteriocina de apm. La descripción incluye permitir la propagación de las bacterias transformadas *in vivo*, sobre o dentro de un sujeto animal o vegetal. La aplicación *in vivo* de las bacterias transfectadas proporciona un estado de protección frente a bacterias que expresan un receptor de superficie seleccionado como diana por la bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética. El estado de protección es análogo a un estado de inmunidad, en el que las bacterias transfectadas aumentan o complementan esencialmente el sistema inmunitario del organismo animal o vegetal u otro sistema de defensa.
- En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica para un RBD de una proteína de fibras de la cola monomérica modificada es parte de un sistema genético que permite la identificación, el aislamiento físico y/o la selección de la secuencia codificante. Como ejemplos no limitativos, el sistema genético puede comprender la secuencia codificante en un fago, fago lisogénico, partícula de transducción, cósmido o genoma de fago que permite su identificación, aislamiento y/o selección. En algunas realizaciones, la secuencia se fusiona con una parte de un gen de fibra y se expresa para producir un trímero de fibras de la cola modificado que provocará que la bacteriocina de apm modificada se una a la superficie de y destruya el organismo huésped que alberga el fago lisogénico a partir del cual se identificó o aisló la secuencia que codifica para RBD. La detección de un fenotipo en el trímero de fibras de la cola modificado permite que la secuencia se seleccione y/o examine, se identifique y se aisle. En algunas realizaciones, el fenotipo puede ser una propiedad de unión al receptor deseada, y posiblemente rara.
- También se describe una biblioteca de fagos, partículas de transducción, cósmidos o genomas de fagos, que contienen una pluralidad de secuencias de ADN y/o ARN, que codifican cada una para una proteína de fibras de la cola modificada. Este acoplamiento de fenotipo de unión con genotipo codificante del RBD permite la expresión de una pluralidad de RBD modificados de manera que las secuencias que codifican para los mismos están representadas dentro de la biblioteca. En algunos ejemplos, los miembros de una biblioteca contienen cada uno una secuencia que codifica para una proteína de fibras de la cola modificada de manera que se expresan fibras de la cola homotriméricas y están disponibles para examen o selección para determinar el fenotipo de unión respectivo de un miembro de la biblioteca. En otros ejemplos, los miembros de una biblioteca incluyen aquellos con más de una secuencia que codifica para una proteína de fibras de la cola modificada de manera que pueden expresarse fibras de la cola heterotriméricas dadas a conocer en el presente documento y examinarse o seleccionarse para determinar sus fenotipos de unión. El fenotipo de unión de un miembro de la biblioteca está por tanto acoplado a la(s) secuencia(s) codificante(s) receptiva(s). Una vez que el genotipo que codifica para el RBD deseado o ventajoso se ha identificado así, puede usarse para crear la fibra de la cola para una bacteriocina de apm modificada. Utilizando la función de chaperona relacionada de una fibra de la cola, tal como VHML, que diversifica de manera natural su RBD, puede garantizarse el plegamiento apropiado de una fibra de la cola que contiene un RBD diversificado derivado de VHML.
- Vectores, células huésped, fagos, partículas de transducción, cósmidos, genomas de fagos y bibliotecas tal como se dan a conocer en el presente documento pueden considerarse composiciones que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica para proteínas de fibras de la cola.
- Composiciones adicionales de la descripción comprenden una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética o una parte antibacteriana de la misma. Las composiciones son antibacterianas en virtud de la bacteriocina de apm, y pueden comprender un portador o excipiente. Por supuesto, el portador o excipiente es uno que es adecuado para su uso en combinación con una proteína compleja de múltiples subunidades como una bacteriocina de apm. En algunas realizaciones, el portador o excipiente es farmacéuticamente aceptable de manera que la composición puede usarse de manera clínica o en la agricultura. En otras realizaciones, el portador o excipiente es adecuado para administración tópica, pulmonar, gastrointestinal o sistémica, tal como a un ser humano o un animal no humano. En realizaciones adicionales, el portador o excipiente es adecuado para su administración a un organismo no animal tal como una planta o producto fresco de una planta como ejemplos no limitativos.
- Una composición tal como se da a conocer en el presente documento puede comprender más de una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética o comprender uno o más agentes adicionales, incluyendo pero sin limitarse a, una bacteriocina de apm que se produce de manera natural deseada para su uso con la bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética. Los ejemplos no limitativos de un agente adicional incluyen una enzima, un antibiótico, un agente antifúngico, un bactericida, un analgésico y un agente antiinflamatorio.
- En un aspecto adicional, la descripción proporciona métodos de uso de un producto relacionado con bacteriocina de apm descrito en el presente documento. Las realizaciones de la descripción incluyen métodos de inhibición del crecimiento bacteriano o de inducción de muerte de células bacterianas. Tales métodos comprenden poner en contacto una célula o células bacterianas susceptibles con una cantidad eficaz de una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética, o con una parte antibacteriana de la misma. Alternativamente, puede usarse una composición que contiene la bacteriocina de apm o una parte antibacteriana de la misma. En algunos casos, una cantidad eficaz puede ser equivalente a tan sólo una, en promedio, bacteriocina de apm por célula bacteriana. Por supuesto, pueden usarse cantidades superiores.
- En otras realizaciones, se proporciona un método para comprometer la integridad de la membrana citoplasmática de una bacteria. El compromiso puede dar como resultado la pérdida del potencial de membrana y/o la pérdida de

algún contenido celular. Tales métodos comprenden poner en contacto la membrana con una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética, o una parte antibacteriana de la misma. En muchos casos, la membrana será la de bacterias virulentas o patógenas.

- 5 En algunas realizaciones, los métodos de la descripción pueden comprender la aplicación (o administración) *in vivo* de una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética, o una parte antibacteriana de la misma, dentro de un sujeto. Alternativamente, los métodos pueden comprender la puesta en contacto *in vitro* o *ex vivo*.

10 Aún en un aspecto adicional, la descripción proporciona un método de formación de bacterias no virulentas a partir de bacterias progenitoras virulentas. El método comprende poner en contacto bacterias virulentas con una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética, o una parte antibacteriana de la misma, que se une a un factor de virulencia o adaptación de las bacterias virulentas. La puesta en contacto puede ser en condiciones en las que no todas las bacterias se destruyen, o se inhibe completamente su crecimiento celular, mediante la cantidad de bacteriocina de apm, o parte antibacteriana de la misma, usada. La puesta en contacto proporciona una presión selectiva que permite que la bacteria seleccionada como diana sobreviva a la bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética o parte antibacteriana de la misma y se propague sólo si se ha convertido en una progenie de bacterias modificadas o mutantes no virulentas que no es susceptible (y de ese modo resistente) a la bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética o parte antibacteriana de la misma. En algunas realizaciones, la resistencia se debe a la falta de expresión del factor de virulencia o adaptación o receptor para la bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética, o parte antibacteriana de la misma, evitando de ese modo el ataque por la bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética. En otra realización, la resistencia puede deberse a una alteración en el factor de virulencia o adaptación de manera que ya no sirve como receptor eficaz para el RBD de la piocina modificada y en la forma alterada también compromete su función de virulencia o adaptación. La adquisición de resistencia por la progenie superviviente, y el cambio resultante en virulencia o adaptación de una bacteria anteriormente virulenta, puede determinarse *in vivo* o *in vitro* para demostrar su patogenicidad comprometida.

20 En un aspecto relacionado, la descripción proporciona un método de mantenimiento de una población de bacterias no virulentas mediante el contacto con una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética, o una parte antibacteriana de la misma, que se une a y media su efecto bactericida mediante un factor de virulencia o adaptación de las bacterias virulentas. La presencia de la bacteriocina de apm previene el crecimiento (o generación o propagación) de bacterias virulentas y de ese modo mantiene la población como no virulenta. En algunas realizaciones, la puesta en contacto puede ser mediante el uso de una célula bacteriana, tal como se describe en el presente documento, que expresa la bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética o parte antibacteriana de la misma.

30 Las detalles de una o más realizaciones de la descripción se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la descripción resultarán evidentes a partir de los dibujos y la descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

40 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 proporciona la micrografía electrónica de una partícula de piocina de tipo R que revela 4 de las 6 fibras de la cola en el panel A, y un esquema de los componentes principales de una partícula de piocina de tipo R en el panel B.

45 La figura 2 proporciona ensayos de dilución en serie de puntos (5X) de piocinas de tipo natural (R2), partículas de piocinas producidas a partir de la cepa de delección de fibras de la cola (PA01 Δ *Prf15*) y piocinas complementadas con la fusión de fibras de la cola R2-P2. Las bacterias diana son *P. aeruginosa* 13s y *E. coli* C. Las partículas de piocina R2 de tipo natural pueden destruir *Pseudomonas* pero no *E. coli*. La cepa de delección de fibras de la cola no produce partículas de piocinas activas, pero cuando se complementa en *trans* con la fusión de fibras de la cola R2-P2, puede destruir ahora *E. coli* C.

50 La figura 3 es la complementación de la estructura de piocina R2 con una fusión de fibras de la cola R2-P2. Se fusionó la parte C-terminal (RBD) del gen de fibra de la cola P2 con la parte N-terminal (BPAR) de la fibra de la cola R2, tal como se muestra en la parte A.

55 La parte B de la figura 3 muestra un esquema de la piocina R2 de tipo natural (izquierda). La piocina R2 se complementa con el constructo de fusión R2 (BPAR)-P2 (RBD) para producir partículas (derecha) que tienen las fibras de la cola quiméricas incorporadas en la estructura. Las partículas R2-P2 tienen un espectro de destrucción alterado y seleccionan como diana ahora determinadas cepas de *E. coli*.

60 La figura 4 proporciona fusiones R2-P2 múltiples y sus actividades bactericidas. El extremo N-terminal, aminoácidos 1-164, de R2 (región de unión a la placa basal, "BPAR") se fusionó con diversas partes C-terminales de P2 (RBD). Los números representan los números de residuos de aminoácido en las proteínas respectivas. La actividad bactericida de las piocinas modificadas (frente a *E. coli* C) que contiene cada una de las fibras de la cola construidas se indica como presente (+) o ausente (-).

La figura 5 muestra diversas partes del extremo N-terminal de la fibra de la cola R2 (BPAR) fusionadas con la parte C-terminal 158-669 (RBD) de la fibra de la cola P2. Los números representan los números de residuos de aminoácido de las proteínas respectivas. La actividad bactericida de las piocinas modificadas (frente a *E. coli C*) que contiene cada una de las fibras de la cola construidas se indica como presente (+) o ausente (-).

La figura 6 muestra fusiones R2-P2 múltiples y sus actividades bactericidas. Se fusionó el extremo N-terminal, aminoácidos 1-240, de R2 (BPAR) con diversas partes C-terminales de P2 (RBD). Los números representan los números de residuos de aminoácido de las proteínas respectivas. La actividad bactericida de las piocinas modificadas (frente a *E. coli C*) que contiene cada una de las fibras de la cola construidas se indica como presente (+) o ausente (-).

La figura 7 proporciona diversas partes del extremo N-terminal de la fibra de la cola R2 (BPAR) fusionadas con la parte C-terminal 322-669 (RBD) de la fibra de la cola P2. Los números representan los números de residuos de aminoácido de las proteínas respectivas. La actividad bactericida de las piocinas modificadas (frente a *E. coli C*) que contiene cada una de las fibras de la cola construidas se indica como presente (+) o ausente (-).

La figura 8 muestra la complementación en *trans* de la estructura de la piocina R2 de PA01Δprf15 con diversas fibras de la cola de piocina de tipo R, fusiones de fibras de la cola y chaperonas. Se evaluaron las actividades de las piocinas complementadas R1 a R5 mediante siembra por puntos sobre la cepa indicadora *Pseudomonas aeruginosa* 13s, que es sensible a todos los tipos de piocinas. Se sometieron a prueba las piocinas complementadas R2-P2 para determinar su actividad usando *E. coli C* como indicador, y se sometió a prueba la piocina complementada R2-L-413c sobre la cepa de *Yersinia pestis* KIM.

Las fibras de la cola Prf15 de R2, R3 y R4 pudieron complementarse mediante la Prf16 endógena de la piocina R2 de PA01Δprf15. Las fibras de la cola Prf15 de R1 y R5, que difieren en el extremo C-terminal en comparación con R2, requerían, para su actividad máxima, su propia Prf16 relacionada (que por sí misma difiere de su homólogo de R2). Las fusiones tanto R2-P2 como R2-L-413c, que contienen el extremo C-terminal (RBD) del fago P2 y fibras de la cola L-413c, respectivamente, requieren sus chaperonas de ensamblaje de fibras de la cola relacionadas codificadas por el gen G del fago.

La figura 9 muestra el vector de expresión de chaperonas y fibras de la cola de piocinas pUCP30T. Los genes, *prf15* y *prf16*, se expresan usando un vector lanzadera de *Pseudomonas/E. coli* (Schweitzer) con orígenes de replicación (ori pRO1600, rep y oriT) para ambas especies. Se muestran los sitios de clonación mediante los sitios de escisión de enzimas de restricción indicados. El plásmido confiere resistencia a gentamicina (Gm R) y se mantiene añadiendo gentamicina a los medios de cultivo. La transcripción de ambos genes se dirige mediante el promotor *tac* que se regula negativamente por *lacIQ*. Cuando se transforman en la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Δ*prf15*, los genes, por ejemplo *prf15* y *prf16*, incorporados en el plásmido se expresan en *trans* tras inducirse con IPTG simultáneamente con la inducción con mitomicina C de los genes de piocinas que permanecen en las bacterias de producción huésped PAO1 Δ*prf15*.

La figura 10 proporciona la construcción de fibra de la cola de piocina específica de *Yersinia pestis*. Similar a la estrategia que se usó para construir R2-P2, se fusionó la parte codificante C-terminal (RBD) del gen de fibra de la cola L-413c con una parte N-terminal (BPAR) de la fibra de la cola R2. Cuando se expresa en *trans* para complementar la cepa de delección de fibras de la cola R2 PA01Δ*prf15*, se producen partículas de piocinas modificadas que contienen las fibras de la cola R2-L-413c quiméricas que pueden destruir eficazmente *Y. pestis* pero no *Pseudomonas*.

La figura 11 proporciona las secuencias de aminoácidos o secuencias de ácido nucleico para SEQ ID NO:1-59, proporcionadas en las páginas 11A-11J.

Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, una bacteriocina de apm incluye una piocina de tipo R, bacteriocina similar a una cola, bacteriocina de tipo R, piocinas de tipo R y de tipo F, monocinas, meningocinas u otras bacteriocinas de alto peso molecular (apm). Una bacteriocina de apm incluye versiones modificadas de piocinas de tipo R y de tipo F, enterocolitinas, monocinas y meningocinas (véase Kingsbury "Bacteriocin production by strains of *Neisseria meningitidis*." J Bacteriol. 91(5):1696-9, 1966). Una bacteriocina de apm alterada por ingeniería genética o modificada puede ser una piocina de tipo R modificada seleccionada de la piocina R1, R2, R3, R4 o R5 de *P. aeruginosa*. Una bacteriocina de la descripción puede ser termolábil, resistente a ácidos suaves, resistente a tripsina, sedimentable por centrifugación a aproximadamente 65.000 x g y resoluble por microscopio electrónico (véanse Jabrane *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 68:5704-5710, 2002; Daw *et al.* Micron 27:467-479, 1996; Bradley Bacteriol. Revs. 31:230-314, 1967; y Kageyama *et al.* Life Sciences 9:471-476, 1962. En muchos casos, una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética dada a conocer en el presente documento tiene una o más, en cualquier combinación, de estas propiedades. Una propiedad adicional común a bacteriocinas y bacteriocinas de apm modificadas por ingeniería genética dadas a conocer en el presente documento es que no contienen ácido

nucleico y por tanto son de replicación deficiente de manera que no pueden reproducirse por sí mismas tras o durante la destrucción de una bacteria diana como pueden muchos bacteriófagos.

Las piocinas, y otras bacteriocinas de apm dadas a conocer en el presente documento, son moléculas complejas que comprenden múltiples subunidades proteicas, o polipeptídicas, y se asemejan a las estructuras de la cola de bacteriófagos de la familia *Myoviridae*. En piocinas que se producen de manera natural, las estructuras de subunidades están codificadas por el genoma bacteriano tal como el de *P. aeruginosa* y forman piocinas que sirven como defensas naturales contra otras bacterias (Kageyama, 1975). Una bacteria diana sensible puede destruirse por una única molécula de piocina (Kageyama, 1964; Shinomiya & Shiga, 1979; Morse *et al.*, 1980; Strauch *et al.*, 2001).

Una "bacteria diana" o "bacterias diana" se refieren a una bacteria o bacterias a las que se une una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética de la descripción y/o cuyo crecimiento, supervivencia o replicación se inhibe de ese modo. El término "inhibición de crecimiento" o variaciones del mismo se refiere a la ralentización o detención de la velocidad de división celular bacteriana o el cese de la división celular bacteriana, o a la muerte de las bacterias.

Tal como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico" se refiere normalmente a polímeros de desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos (puros o mixtos) en forma mono o bicatenaria. El término puede abarcar ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos o enlaces o residuos de estructura principal modificados, que son sintéticos, que se producen de manera natural y que no se producen de manera natural, que tienen propiedades de unión, estructurales o funcionales similares al ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos no limitativos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, ribonucleótidos de 2-O-metilo y ácidos nucleicos peptídicos (ANP). El término ácido nucleico, en algunos contextos, puede usarse de manera intercambiable con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.

Una secuencia de ácido nucleico particular también abarca variantes modificadas de manera conservativa de la misma (tales como sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada de manera explícita. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados pueden lograrse generando secuencias en las que la tercera posición ("oscilación") de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye por residuos de desoxiinosina y/o bases mixtas. Por tanto, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia proteica dada a conocer en el presente documento también abarca variantes modificadas de la misma tal como se describe en el presente documento.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan normalmente de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácido. Puede hacerse referencia a los aminoácidos en el presente documento mediante o bien sus símbolos de tres letras o bien mediante los símbolos de una letra comúnmente conocidos recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB.

Los factores de virulencia son las moléculas que contribuyen a la patogenicidad de un organismo pero no a su viabilidad general. Tras la pérdida de un factor de virulencia, el organismo es menos patógeno pero no necesariamente menos viable. Los factores de virulencia pueden tener una cualquiera de numerosas funciones, por ejemplo, regular la expresión génica, proporcionar adhesión o movilidad, eliminar por bombeo agentes antibióticos o formar recubrimientos protectores incluyendo biopelículas.

Los factores de adaptación son las moléculas que contribuyen a la viabilidad general del organismo, velocidad de crecimiento o competitividad en su entorno. Tras la pérdida de un factor de adaptación, el organismo es menos viable o competitivo y debido a este compromiso, indirectamente menos patógeno. Los factores de adaptación también pueden tener una cualquiera de numerosas funciones, por ejemplo, adquirir nutrientes, iones o agua, formar componentes o protectores de membranas celulares o paredes celulares, replicar, reparar o mutagenizar ácidos nucleicos, proporcionar defensa frente a o ataque hacia agresiones medioambientales o competitivas.

Algunos factores de virulencia y adaptación están presentes sobre la superficie de la bacteria y de ese modo son accesible a una bacteriocina de apm dada a conocer en el presente documento. Uniéndose a algún factor de virulencia o adaptación superficial, una bacteriocina de apm puede mediar la destrucción perforando las membranas celulares, comprometiendo la integridad de la membrana citoplasmática y/o disipando el potencial de membrana de la célula. Las moléculas accesibles en la superficie que lo más probablemente soportan la unión y destrucción de las bacteriocinas de apm son proteínas, polisacáridos y lipopolisacáridos de la membrana externa. Por consiguiente, las posibles dianas para la bacteriocinas de apm modificadas por ingeniería genética son factores de virulencia y factores de adaptación que son proteínas, polisacáridos y lipopolisacáridos de la membrana externa. Algunos ejemplos no limitativos de dianas de factores de virulencia para piocinas modificadas por ingeniería incluyen las metalproteasas de proteasas de escisión intramembrana (iCLIP); lectinas de unión a fucosa y galactosa IL e IIL; proteínas de moléculas de la matriz adhesiva que reconocen componentes de superficie microbiana (MSCRAMM); y adhesina, tal como ACE.

El éxito final de la selección como diana de un factor de virulencia específico depende de su topografía en la

superficie bacteriana, su densidad en la superficie, quizás su movilidad bidimensional dentro de la membrana externa y su prevalencia en aislados clínicos o de campo del patógeno. Por ejemplo, OprM es una proteína de membrana externa similar a porina implicada en múltiples bombas de eflujo, por ejemplo el sistema MexAB, y el prevalente en muchas bacterias gram-negativas (Wong y Hancock, 2000). TolC, similar a OprM, es una proteína auxiliar requerida para muchas bombas de eflujo de patógenos gram-negativos (Koronakis *et al.*, 2004; Piddock, 2006). Además, varios miembros de la familia YcrC de secretinas son proteínas de membrana externa necesarias para la translocación de proteínas efectoras patógenas mediante el sistema de secreción tipo tres ("T3SS"), del que dependen muchos patógenos gram-negativos tales como *P. aeruginosa* e *Yersinia pestis* para intoxicar su huésped mamífero (Galan y Collmer, 1999; Koster *et al.*, 1997; Cornelis, 2006). Además, los miembros de la familia YscW son lipoproteínas también ancladas en la membrana externa para ayudar a la inserción de las secretinas en la membrana (Burghout *et al.*, 2004).

Los ejemplos no limitativos adicionales de factores de virulencia y adaptación incluyen una acuaporina, tal como el canal de agua de acuaporina-Z de *E. coli* (véase Calamita, 2000); RetS (véase Goodman *et al.*, 2004; y Zolfaghar *et al.*, 2005); miembros de la familia 7TMR-DISM (véase Anantharaman *et al.*, 2003); OprM (véase Wong *et al.*, 2000; y SEQ ID NO:11); proteínas bacterianas tales como OprJ (SEQ ID NO:12), OprN (SEQ ID NO:13), AprF (SEQ ID NO:14), OpmM (SEQ ID NO:15), OpmA (SEQ ID NO:16), OpmD (SEQ ID NO:17), OpmE (SEQ ID NO:18), OpmQ (SEQ ID NO:35), OpmB (SEQ ID NO:36), OpmJ (SEQ ID NO:37), OpmG (SEQ ID NO:38), Opml (SEQ ID NO:39), OpmH (SEQ ID NO:40), OpmK (SEQ ID NO:41), OpmN (SEQ ID NO:42), OpmF (SEQ ID NO:43) u OpmL (SEQ ID NO:44); familia OprD de porinas (véase Tamber *et al.*, 2006); ACE, o el gen de ACE codificado por *E. faecalis* OG1RF (véase Sreedhar *et al.*, 2000; y Rich, *et al.*, 1999); lectinas de unión a fucosa y galactosa PA-IL y PA-IIL (véase Mitchell *et al.*, 2002); genes de virulencia animales y vegetales descritos por He *et al.*, 2004; restos pirofosfato extracelulares (véase Bonev *et al.*, 2004); metaloproteasas (véase Rudner *et al.*, 1999); y moléculas de superficie codificadas por transposones (véase Jacobs *et al.*, 2003).

Otros ejemplos no limitativos de factores de virulencia seleccionados como diana por una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética dada a conocer incluyen los codificados por los marcos de lectura abiertos (ORF) dados a conocer en la patente de EE.UU. 6.355.411 y el documento WO 99/27129. En algunas realizaciones, un factor seleccionado como diana por una bacteriocina dada a conocer en el presente documento es uno codificado por los siguientes ORF de la patente de EE.UU.:

Número de ORF	Codificación
5	Desconocida
9	Desconocida
21	Posiblemente receptor
23	Posiblemente transportador de ABC
33	Desconocida
41	Posiblemente similar a mucina
43	Desconocida
51	Desconocida
53	Posiblemente similar a mucina
85	Desconocida
89	Posiblemente receptor de lipoproteínas
91	Desconocida
95	Posiblemente proteofosfoglicano, superficie celular
107	Posiblemente ABC
110	Posiblemente glicosiltransferasa de membrana
113	Posiblemente proteína MexA de resistencia a múltiples fármacos
132	Posiblemente muc d
134	Posiblemente 6-UDP manosa deshidrogenasa
149	Posiblemente diana potencial del transportador de MDR
150	Posiblemente proteína MexA de resistencia a múltiples fármacos

ES 2 387 722 T3

203	Posiblemente componente de ATPasa de transportador de ABC
204	Posiblemente componente de ATPasa de transporte de ABC
205	Posiblemente componente de ATPasa de transporte de ABC
206	Posiblemente componente de ATPasa de transporte de ABC
207	Posiblemente componente de ATPasa de transporte de ABC
208	Posiblemente componente de ATPasa de transporte de ABC
209	Posiblemente ABC
213	Posiblemente antiportadores de Na ⁺ /H ⁺ y K ⁺ /H ⁺ de tipo NhaP
215	Desconocida
227	Posiblemente receptor
239	Posiblemente desoxicitidina trifosfato desaminasa
241	Posiblemente UTPasa
249	Desconocida
255	Desconocida
261	Posiblemente 6-fosfogliconato deshidrogenasa
263	Posiblemente transportador de ABC
273	Desconocida
277	Posiblemente miembros de la familia PE-PGRS
289	Posiblemente 6-fosfogluconato deshidrogenasa
291	Posiblemente glicosil transferasa
297	Posiblemente ligA
301	Posiblemente glicosiltransferasa
309	Posiblemente bomba de eflujo de múltiples fármacos/cationes
323	Desconocida
327	Desconocida
331	Posiblemente sensor con supuesta PilR cinasa
333	Posiblemente transporte de proteína TonB
341	Posiblemente Pil R
349	Posiblemente Pil A o R
363	Posiblemente orfz
365	Posiblemente transportador de ABC
375	Posiblemente mucina
377	Posiblemente pilus fimT
381	Posiblemente antígeno de inmovilización H1
383	Posiblemente fimU
387	Posiblemente pilus PilV
393	Posiblemente pilW et
401	Posiblemente pil X
403	Posiblemente antígeno cd3
411	Desconocida

413	Desconocida
419	Posiblemente pil E
421	Posiblemente pyl y2
427	Posiblemente antígeno de membrana externa PE-PGRS
437	Posiblemente ABC ligA

Descripción detallada de modos de puesta en práctica de la descripción

General

5 Las bacteriocinas de apm tienen la capacidad de destruir rápidamente las bacterias. Unos cuantos informes tempranos de estudios *in vivo* han mostrado que pueden ser eficaces en ratones para esta aplicación (Haas *et al.*, 1974; Merrikin y Terry, 1972). Los inventores han determinado recientemente que la piocina R2 de tipo natural puede rescatar ratones de la peritonitis aguda provocada por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos cuando se administra o bien por vía intraperitoneal o bien por vía intravenosa y que las piocinas R2 pueden actuar a dosis muy bajas, tales como 10⁹ piocinas o menos de 1 µg de proteína total en una única dosis (datos no mostrados).

15 Para que las bacteriocinas de apm sean útiles clínicamente como agentes antibacterianos, sin embargo, debe abordarse el problema de sus estrechos espectros bactericidas. Aunque esto puede verse como una ventaja porque es posible seleccionar como diana específicamente una especie o cepa particular sin afectar a la flora normal, se limitan los tipos de especies/cepas que son sensibles a las bacteriocinas conocidas. Por ejemplo, se sabe actualmente que se producen piocinas por algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, y tienen actividad contra un estrecho rango de otras cepas de *Pseudomonas* y algunas otras especies gram negativas. Se han notificado bacteriocinas de tipo R de otras especies (tales como *Erwinia*, véase Jabrane 2002, y *Yersinia enterocolitica*, véase Strauch) pero la aparición parece estar limitada. Los fagos *Myoviridae*, por otro lado, están bastante extendidos y son comunes y se encuentran por toda la clase bacteriana.

25 Esta descripción demuestra que es posible cambiar el espectro de una piocina de tipo R. Un determinante de espectro principal entre tanto las piocinas como sus fagos relacionados se encuentra en la fibra de la cola, que se une a la superficie bacteriana específicamente, interaccionando a través de su parte C-terminal (RBD) con un componente del LPS u otra estructura de la superficie celular. El LPS puede ser altamente variable entre diferentes especies y cepas de bacterias, y las fibras de la cola de bacteriófago son por sí mismas altamente variables, particularmente en esta región C-terminal que interacciona con la superficie celular (Tetart, Desplats). Esta variabilidad refleja aparentemente adaptaciones constantes de los fagos a superficies del huésped cambiantes. Se ha observado que diferentes tipos de fago que infectan el mismo huésped (fagos de *E. coli* P2, Mu y P1) tienen similitud de secuencia en la parte C-terminal de la fibra de la cola (Haggard-Ljungquist E, Halling C, Calendar R.), lo que indica que la transferencia horizontal en estas regiones genéticas desempeña probablemente un papel en la especificidad de huésped. Por ejemplo, la piocina R2 tiene un grado muy alto de similitud de secuencia con respecto al fago phiCTX de *Pseudomonas*, un fago que también está relacionado muy estrechamente con el fago P2 de *E. coli*. Comparando las secuencias de fibras de la cola de la piocina R2 y P2, se observa más similitud de secuencia en el extremo N terminal (BPAR) que con el extremo C terminal (RBD), lo que sugiere que el extremo C-terminal desempeña el papel en la especificidad de huésped.

40 Tal como se da a conocer en el presente documento, es posible alterar el espectro diana de una piocina de tipo R modificando por ingeniería la parte C-terminal del gen de fibras de la cola. Es notable que este cambio de espectro puede producirse a través de barreras de especies, demostrando que las piocinas de tipo R naturales pueden modificarse tal como se da a conocer en el presente documento y desarrollarse para dar compuestos antimicrobianos con espectros más amplios.

Bacteriocinas de apm modificadas

50 La descripción proporciona bacteriocinas de apm modificadas por ingeniería genética, en particular piocina de tipo R con afinidades y/o especificidades de unión alteradas. En algunas realizaciones, una bacteriocina de apm de la descripción se une específicamente a moléculas de superficie expuestas que actúan como factores de virulencia o factores de adaptación de bacterias patógenas. El término "se une específica (o selectivamente)" se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia del ligando unido, a menudo en una población de proteínas heterogénea y otra materia biológica. Como resultado, la bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética una vez que se une específicamente puede destruir genéricamente las bacterias patógenas. Además, son el fin de volverse resistentes a la bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética, las bacterias patógenas seleccionadas como diana deben perder su sitio de reconocimiento o unión para la bacteriocina de apm. Dicho de otra manera, si la bacteriocina de apm modificada usa específica y exclusivamente el factor de virulencia o adaptación como su receptor, las bacterias se verían forzadas a perder su virulencia o adaptación con el fin de

escapar de la destrucción por la bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética.

Una bacteriocina de apm modificada de la descripción se asemeja a una cola de bacteriófago pero comprende una capacidad de unión, o dominio de unión al receptor (RBD), que se ha cambiado en relación con una bacteriocina nativa, que se produce de manera natural o no modificada. El RBD puede cambiarse en la secuencia de aminoácidos mediante el uso de técnicas de ADN recombinante tal como se describe en el presente documento. El término "recombinante", usado normalmente con referencia a una célula, o ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado mediante la introducción de una proteína o ácido nucleico heterólogo o la alteración de una proteína o ácido nucleico nativo, o que la célula se deriva de una célula así modificada. De ese modo, una célula recombinante expresa genes que no se encuentra dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresa genes nativos que se expresan de manera anómala, se subexpresan o no se expresan en absoluto.

En muchas realizaciones, el RBD puede modificarse para ser el de una fibra de la cola de otra bacteriocina o un bacteriófago. Como ejemplo no limitativo dado a conocer en el presente documento, el RBD de la piocina R2 se modifica fusionando la parte C-terminal de la proteína de fibras de la cola (RBD) de un fago (que infecta a un huésped diferente) con la parte N-terminal (BPAR) de la proteína de fibras de la cola de R2. Al fusionar el extremo C-terminal de la fibra de la cola de P2 a *PRF15* de R2 y coexpresar la chaperona relacionada con P2, el espectro de bacterias diana de la R2 se cambia para destruir *E. coli* C. Véase la figura 2.

En realizaciones adicionales, las bacteriocinas de apm se modifican por ingeniería genética de otra forma. La descripción incluye una bacteriocina de apm diseñada o seleccionada para reconocer, o seleccionar como diana, una molécula de superficie de una bacteria (tal como una bacteria patógena). La molécula de superficie puede considerarse un receptor sobre una bacteria reconocido, o al que se une, la bacteriocina de apm.

La descripción se basa en las propiedades de una fibra de la cola de bacteriocina de apm para unirse a, o interactuar con, un receptor para formar un par de unión. La unión o interacción se produce a través del RBD de la fibra de la cola, que es el primer miembro del par de unión, siendo el receptor el segundo miembro del par. En muchas realizaciones, el receptor es una molécula de superficie de célula bacteriana o parte de la misma. En otras realizaciones, el receptor es una molécula con propiedades de un factor de virulencia o adaptación de una bacteria patógena.

Una bacteriocina de apm alterada por ingeniería genética o modificada dada a conocer en el presente documento comprende una fibra de la cola que tiene tanto una región de unión a la placa basal (BPAR) como un RBD heterólogo o modificado. Tal como se describe en el presente documento, la fibra de la cola es una estructura trimérica de tres subunidades proteicas de fibras de la cola, cada una de las cuales también comprende un primer dominio que corresponde a, y que forma, la BPAR en una fibra de la cola y un segundo dominio que corresponde a, y que forma, un RBD heterólogo o modificado en una fibra de la cola.

Normalmente, "heterólogo" cuando se usa con referencia a partes de una proteína o secuencia de ácido nucleico indica que la secuencia comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran habitualmente en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. "Heterólogo" también significa que la secuencia de ácido nucleico o aminoácidos no se encuentra normalmente junto con las otras secuencias o no está contenida normalmente en el plásmido, vector o huésped seleccionado. En otras palabras, no es nativa al sistema para el que se utiliza ahora. Por ejemplo, las proteínas producidas por un organismo que no es la fuente de tipo natural de esas proteínas.

La descripción incluye una proteína de fibras de la cola de bacteriocina de apm que comprende una BPAR de la proteína y un RBD heterólogo o modificado. La BPAR está en la región N-terminal de una proteína de fibras de la cola, mientras que el RBD está en la región C-terminal. A parte del RBD heterólogo o modificado, la proteína de fibras de la cola puede ser la de cualquier piocina de tipo R que se produce de manera natural. En algunas realizaciones, la proteína de fibras de la cola de piocina R1, piocina R2, piocina R3, piocina R4 y piocina R5, tal como se representa por SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, respectivamente, puede usarse tal como se describe en el presente documento. En realizaciones adicionales, la proteína de fibras de la cola puede ser la o las del fago Φ CTX SEQ ID NO:45, o la del fago PS17 SEQ ID NO:19 o la del bacteriófago VHML SEQ ID NO:21 y 22.

Las realizaciones de la descripción incluyen combinaciones de una BPAR de la proteína de fibras de la cola de bacteriocina de apm y un RBD de una proteína de fibras de la cola de bacteriófago, tal como se muestra en la figura 3. En algunos casos, una combinación puede incluir los aminoácidos N-terminales desde la posición 1 hasta aproximadamente la posición 164 o la posición 240 de una proteína de fibras de la cola de bacteriocina. Este fragmento de polipéptido puede fusionarse con una región de una proteína de fibras de la cola de bacteriófago incluyendo su parte C-terminal que contiene un RBD. La región puede ser un fragmento de polipéptido que carece de la región N-terminal desde la posición 1 hasta aproximadamente la posición 150, aproximadamente la posición 170, aproximadamente la posición 190, aproximadamente la posición 290, aproximadamente la posición 300 o aproximadamente la posición 320.

Usando la proteína de fibras de la cola del fago P2 y la piocina R2 como ejemplos no limitativos, el fragmento que contiene la BPAR puede incluir los aminoácidos N-terminales desde la posición 1 hasta la posición 164 ó 240. Véanse las figuras 4-7. El fragmento que contiene el RBD puede incluir el extremo C-terminal, y desde aproximadamente 347 hasta aproximadamente 755 aminoácidos de longitud de las proteínas de fibras de la cola del fago relacionado o P2. La fusión puede prepararse fácilmente mediante técnicas de ADN recombinante con secuencias de ácido nucleico que codifican para la proteína de fibras de la cola de R2, tal como *prf15*, y el gen *H* del fago P2 que codifica para su proteína de fibras de la cola. La chaperona relacionada del RBD necesita coexpresarse con los genes de fibras de la cola de fusión con el fin de garantizar el ensamblaje de las fibras de la cola modificadas en una a estructura de piocina que funcione. Véase la figura 8.

RBD de bacteriófagos

Otras fuentes de RBD incluyen, pero no se limitan a, T-4 y otros fagos T-par o pseudo T-par, fagos T-3 y T-7, supergrupo T-7 de fagos, fago Mu, fago P22, fago L-413c y fagos lambdoides.

RBD de diversificación

En realizaciones adicionales, una proteína de fibras de la cola comprende una sustitución con, o inserción de, un RBD derivado de un organismo que diversifica la estructura utilizando un retroelemento de generación de diversidad (DGR), tal como se describe en la solicitud de patente publicada US 2006-0121450, publicada el 8 de junio de 2006. El determinante del tropismo principal (Mtd) del bacteriófago BPP-1 de *Bordetella* es una estructura de este tipo. La secuencia de Mtd se representa por SEQ ID NO:24 tal como se da a conocer en el presente documento. En otras realizaciones, la sustitución es con parte de la secuencia de Mtd, tal como, pero sin limitarse a, la región del residuo 49 a 381, del residuo 171 a 381, o de los residuos 306 a 381, de SEQ ID NO:24. La inserción de la secuencia de Mtd, o cualquier fragmento de la misma (tal como los enumerados anteriormente), al extremo de una proteína de fibras de la cola, tal como después de la posición 691 de SEQ ID NO:3, está dentro de las realizaciones dadas a conocer en el presente documento. La sustitución de la secuencia de Mtd, o cualquier fragmento de la misma (tal como los enumerados anteriormente), puede ser por cualquier región que no es BPAR de una proteína de fibras de la cola. Los ejemplos no limitativos incluyen la región de SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 ó 9 que comienza en aproximadamente la posición 643, 625, 562, 448, 428, 231 y 163 hasta el extremo C-terminal de la secuencia (véanse las figuras 4-7 para ejemplificaciones de estas sustituciones).

Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de Mtd en una fibra de la cola puede diversificarse para producir una pluralidad de RBD heterólogos o modificados. La secuencia de ácido nucleico que codifica para Mtd comprende una región variable (VR) que puede unirse operativamente, en *cis* o en *trans*, a una región de molde (TR) de manera que la TR es una secuencia de molde que dirige la mutagénesis específica del sitio de la VR. La unión operativa entre las regiones VR y TR también incluye una unión operativa a secuencias que codifican para una actividad de transcriptasa inversa (RT), que puede estar presente en *trans* con respecto a la VR. Los sitios de variabilidad en la VR de Mtd corresponden a residuos de adenina en la región de molde TR generalmente homóloga, que por sí misma es invariante y esencial para las alteraciones de secuencia en la VR. De ese modo, mientras que una molécula inicial puede contener una TR que es idéntica a la VR, los residuos de adenina presentes en la TR darán como resultado la mutagénesis o diversificación de las posiciones correspondientes en la secuencia VR. De ese modo si la secuencia de TR es una repetición directa perfecta de la secuencia en la VR, la diversificación de la región VR da como resultado uno o más residuos de adenina en la VR, también encontrados en la TR, que se mutan a otro nucleótido, que es citosina, timina o guanina, sin cambio en la secuencia de TR. Este sistema puede usarse para alterar la región VR, y por tanto el RBD, de una proteína de fibras de la cola modificada tal como se describe en el presente documento.

Tras la diversificación, la proteína de fibras de la cola puede variarse de manera que el RBD resultante tiene una homología de al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90% o al menos el 95% con respecto al determinante del tropismo principal (Mtd) del bacteriófago BPP-1 de *Bordetella*, tal como se representa por SEQ ID NO:24. Tal como se describe en el presente documento, la combinación de proteína de fibras de la cola y Mtd puede ser una sustitución, o una inserción, de una secuencia de Mtd o parte de la misma en la secuencia de proteína de fibras de la cola. Por tanto, puede considerarse que la proteína de fibras de la cola resultante comprende una sustitución o inserción con un dominio de unión con una homología de al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90% o al menos el 95% tal como se mencionó anteriormente.

Una molécula de ácido nucleico que codifica para una combinación de fibra de la cola y Mtd puede usarse para la diversificación y variación de secuencia. Por tanto, las combinaciones de ácido nucleico de secuencias que codifican para toda o parte de una proteína de fibras de la cola, y todo o parte de un Mtd, están dentro de las realizaciones dadas a conocer. Otras realizaciones incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican para cualquier proteína de fibras de la cola con un RBD heterólogo o modificado tal como se da a conocer en el presente documento. En algunas realizaciones, el RBD heterólogo o modificado codificado comprende un cambio en la secuencia de aminoácidos del RBD en relación a un RBD que se produce de manera natural o en relación a la BPAR presente en la proteína de fibras de la cola tal como se describió anteriormente.

En realizaciones adicionales, puede ponerse a disposición una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína de fibras de la cola para la diversificación para formar una proteína de fibras de la cola modificada dada a conocer en el presente documento. La molécula de ácido nucleico, bajo control de un promotor adecuado, está colocada operativamente en 5' con respecto a una región atd-TR-brt. La secuencia de TR puede denominarse TR' y prepararse basándose en la secuencia VR tal como se trata a continuación. El constructo de ácido nucleico resultante puede portar una delección de la estructura terminadora de la transcripción en el sentido de 5' del atd.

Se selecciona una región de la molécula de ácido nucleico que codifica para el extremo C-terminal de la proteína de fibras de la cola tal como se describió anteriormente para que sea la VR y entonces se une operativamente a una secuencia de TR' que contiene residuos de adenina en posiciones, que cuando se varían, dirigen cambios de aminoácidos en la secuencia codificada por la VR. Tales residuos de adenina pueden diseñarse de manera deliberada para que sean la primera o segunda posición de codones dentro de la VR. La secuencia TR' puede ser inicialmente idéntica a la VR seleccionada seguida por mutagénesis dirigida al sitio o síntesis de ácido nucleico *de novo* para preparar una secuencia TR' que contiene residuos de adenina en las correspondientes posiciones para dirigir la mutagénesis y diversificación en la proteína de fibras de la cola codificada.

Preparación y uso de bacteriocinas de apm

Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden usarse para expresar y preparar proteínas de fibras de la cola, incluyendo proteínas alteradas por ingeniería genética o modificadas, por cualquier medio conocido por el experto. En algunas realizaciones, la expresión es a través del uso de un vector que contiene la molécula de ácido nucleico operativamente unida a un promotor que puede dirigir la expresión de la proteína de fibras de la cola codificada.

En muchas realizaciones, la expresión puede producirse con expresión de un gen auxiliar, tal como una secuencia que codifica para "chaperona" notificada para diversas bacteriocinas y bacteriófagos. La presencia de una chaperona facilita el ensamblaje de una bacteriocina de apm de la descripción sin convertirse necesariamente en una parte de la bacteriocina. La chaperona puede ser la proteína relacionada o correspondiente para el RBD usado en una bacteriocina de apm de la descripción tal como se muestra en la figura 8. Un ejemplo no limitativo de una chaperona está codificado por *prf16* de R2 (SEQ ID NO:4), y corresponde a (o es la chaperona relacionada de) la proteína de fibras de la cola de plocina R2 codificada por *prf15* (SEQ ID NO:3). Otros ejemplos incluyen el gen G en el P2 (SEQ ID NO:26), gen G en L-413c (SEQ ID NO:29), la chaperona relacionada, SEQ ID NO: 20, para la fibra de la cola PS17, y el *Orf 38* (SEQ ID NO:23) en bacteriófagos VHML que son chaperonas relacionadas con genes de fibras de la cola en cada fago. Estos genes son homólogos al fago T4 gp38 (SEQ ID NO:32), que se sabe que es responsable del plegamiento apropiado de la fibra de la cola de T4 (SEQ ID NO:31) en trímeros (Burda, Qu, Hash emolhossen).

El uso de una chaperona relacionada es ventajoso debido a que una chaperona no relacionada puede ser insuficiente para plegar correctamente una proteína de fibras de la cola dada y/o ensamblarla para dar una bacteriocina de apm, tal como se muestra en la figura 8. Como ejemplo no limitativo, se ha observado que el producto del gen *prf16* de R2 es insuficiente para complementar el plegamiento de una fibra de la cola modificada que compromete un BPAR de R2 fusionado a una parte BRD de P2 de una fibra de la cola. Sin querer restringirse a ninguna teoría, y ofrecido para mejorar el entendimiento de la presente descripción, se cree que una chaperona puede actuar específicamente sobre la parte C-terminal de su proteína de fibras de la cola relacionada y que las fibras de la cola y sus chaperonas han evolucionado conjuntamente. Sin embargo, Qu *et al.* aislaron un mutante de fibra de la cola gp37 de T4 que suprime el requisito de gp38, su chaperona relacionada. Este mutante tenía en gp37 una duplicación de un motivo de superhélice, que puede desempeñar por sí mismo un papel en el plegamiento. Por tanto, se cree adicionalmente que puede diseñarse una proteína de fibras de la cola para que contenga un cambio de este tipo de manera que se pliegue apropiadamente sin la necesidad de coexpresar una chaperona relacionada.

Por tanto, las realizaciones de la descripción incluyen una célula bacteriana transfectada con una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína de fibras de la cola alterada por ingeniería genética o modificada, coexpresada opcionalmente con una chaperona, tal como se describe en el presente documento. La expresión de la molécula de ácido nucleico, opcionalmente con una proteína auxiliar (chaperona), da como resultado la producción de fibras de la cola alteradas por ingeniería genética o modificadas de la descripción. La descripción también incluye la expresión de más de una proteína de fibras de la cola alterada por ingeniería genética o modificada a través del uso de más de una molécula de ácido nucleico para dar como resultado fibras de la cola homotriméricas mixtas o incluso fibras de la cola heterotriméricas. Adicionalmente, las secuencias que codifican para la proteína de fibras de la cola y chaperona pueden estar contenidas dentro de una única molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido u otro vector, o por moléculas separadas. Cuando se usa una única molécula de ácido nucleico, las secuencias opcionalmente pueden estar bajo el control de la(s) misma(s) secuencia(s) reguladora(s). Alternativamente, las secuencias codificantes pueden estar bajo control regulador separado.

En algunas realizaciones, la célula bacteriana también puede expresar las subunidades adicionales para formar una bacteriocina de apm que comprende una fibra de la cola alterada por ingeniería genética o modificada. En un grupo

de realizaciones, se inactiva o se deleciona la secuencia que codifica para la proteína de fibras de la cola endógena de la célula bacteriana. Opcionalmente, las otras subunidades pueden estar codificadas por secuencias en una molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido u otro vector, separadas de la que contiene una secuencia que codifica para una proteína de fibras de la cola y/o chaperona. Por tanto, la proteína de fibras de la cola y/o chaperona puede proporcionar una o más moléculas de ácido nucleico en *trans* con respecto a las otras subunidades.

Los ácidos nucleicos, vectores y células bacterianas pueden usarse en un método de producción de una bacteriocina de apm alterada por ingeniería genética o modificada tal como se da a conocer en el presente documento. Un método de este tipo puede comprender el cultivo de células bacterianas que contienen moléculas de ácido nucleico tal como se describió anteriormente en condiciones que dan como resultado la expresión y producción de la fibra de la cola y bacteriocina de apm. En algunas realizaciones de la descripción, las condiciones son *in vivo* dentro de un animal.

En un grupo de realizaciones, un método de preparación de una bacteriocina de apm comprende expresar las subunidades de la bacteriocina, incluyendo la proteína de fibras de la cola alterada por ingeniería genética o modificada, en una bacteria huésped, y recoger la bacteriocina de apm del cultivo bacteriano. La bacteria huésped es una bacteria de producción huésped complementaria que codifica y expresa las otras subunidades necesarias para la producción de la bacteriocina. El término "bacteria huésped" o "bacterias huésped" se refiere a una bacteria o bacterias usadas para producir una bacteriocina de apm dada a conocer en el presente documento. Las bacterias o bacteria huésped también pueden denominarse "bacteria de producción huésped" o "bacterias de producción huésped". La "recogida de una bacteriocina de apm de un cultivo bacteriano" comprende generalmente retirar la bacteriocina del cultivo bacteriano huésped.

En un grupo alternativo de realizaciones, se proporciona un método de preparación de una bacteriocina de apm con una fibra de la cola modificada tal como se describe en el presente documento. El método puede comprender preparar una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína de fibras de la cola modificada por cualquier medio dado a conocer en el presente documento y expresar la molécula de ácido nucleico en una célula en condiciones en las que se produce una bacteriocina de apm.

Las realizaciones de la descripción incluyen una bacteriocina de apm que comprende una proteína de fibras de la cola tal como se describe en el presente documento. En un grupo de realizaciones, la bacteriocina comprende una proteína de fibras de la cola comprendida en parte de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9. En otras realizaciones, la bacteriocina es una piocina, monocina, enterocolitina o meningocina alterada por ingeniería o modificada que comprende una fibra de la cola con un RBD modificado heterólogo. En muchas realizaciones, el RBD modificado heterólogo se une a un factor de adaptación o virulencia bacteriano.

En realizaciones adicionales, se dan a conocer bacteriocinas de apm modificadas por ingeniería genética con fibras de la cola multivalentes. Se ha encontrado mediante análisis de cristalografía de rayos X que el Mtd del bacteriófago BPP-1 de *Bordetella bronchiseptica* es un homotrímero piramidal altamente entrelazado con tres conjuntos de doce residuos de aminoácidos variables formando tres sitios de unión al receptor bastante planos en la base de la pirámide y ubicados en un dominio de lectina de tipo C evolucionado de manera convergente ("CTL"). La comparación de las estructuras de cinco variantes de Mtd a una resolución de 1,5 angstrom mostró que la conformación de la cadena principal de residuos variables es estructuralmente invariante, con insertos en el CTL y el ensamblaje trimérico contribuyendo ambos a la formación de un armazón estático para la presentación combinatoria de residuos variables, minimizando de ese modo la incidencia del mal plegamiento de la proteína (McMahon *et al.*, 2005). Por tanto, puede generarse una fibra de la cola individual que contiene tres monómeros mixtos plegados de manera apropiada ya que las estructuras de las fibras de Mtd variantes son idénticas excepto para los doce residuos de aminoácido, expuestos al disolvente, que no interactúan.

También se ha resuelto mediante cristalografía y caracterizado la estructura de la variante Mtd-P1 dominante unida a su receptor, la pertactina de factor de virulencia de *Bordetella*. Uno de los monómeros de Mtd se une a un dominio estructural en la pertactina; un segundo monómero idéntico de la misma Mtd se une a un dominio estructural no simétrico diferente de la misma molécula de pertactina (monomérica); un tercer monómero de Mtd permanece sin unirse.

Las estructuras de Mtd variantes anteriores y la interacción de unión entre Mtd y su diana, pertactina, pueden aplicarse al diseño y selección de fibras de la cola multivalentes. Por ejemplo, es evidente que un monómero de Mtd puede presentar afinidades por dos dominios estructurales diferentes y aún en formato multimérico tiene suficiente avidez para efectuar la unión e infección al fago funcional. Además, no es necesario que todos los monómeros de una fibra se unan a un receptor para proporcionar avidez adecuada para la unión e infección al fago. Estos datos y conclusiones junto con el conocimiento de que para al menos los bacteriófagos T4, también *Myoviridae*, sólo es necesario que tres fibras de la cola (homotriméricas) estén unidas a receptores para desencadenar la contracción de la vaina de la cola y la penetración del núcleo en las membranas bacterianas, indican varios medios de generación de una bacteriocina de apm multivalente. Tales bacteriocinas de apm multivalentes modificadas por ingeniería tienen espectros de huéspedes más amplios y pueden unirse a más de un factor de virulencia o adaptación individual

incluso en el mismo organismo bacteriano, haciendo de ese modo que sea más difícil para las bacterias seleccionadas como diana desarrollar resistencia mediante pérdida mutacional de expresión de todos los receptores relevantes seleccionados como diana. Una bacteriocina de tipo R puede modificarse por ingeniería para tener dos conjuntos independientes de tres fibras de la cola idénticas, estando compuestas las fibras de un conjunto por los mismos tres monómeros no idénticos, y las fibras del otro conjunto compuestas por tres monómeros no idénticos diferentes. Cada monómero puede tener afinidades de unión por dos epítomos diferentes (por ejemplo dos receptores diferentes), justo como hace Mtd. De ese modo, cualquier bacteria que expresa una cualquiera o más de las 12 moléculas receptoras seleccionadas como diana diferentes (2 "epítomos"/monómero por 3 monómeros/fibra de la cola por 2 conjuntos de diferentes fibras de la cola/bacteriocina de tipo R igual a 12 receptores seleccionados como diana) se uniría a la bacteriocina de apm multivalente modificada por ingeniería y activaría su penetración en la membrana. Tales bacteriocinas de apm modificadas por ingeniería genética tienen un espectro de huésped amplio no natural y, además, hace que sea altamente improbable que una bacteria que expresa más de un receptor seleccionado como diana individual se haga resistente a las bacteriocinas de apm modificadas por ingeniería genética.

En otros aspectos, se proporcionan métodos para el uso de una bacteriocina de apm de la descripción. En algunas realizaciones, se da a conocer un método para comprometer la integridad de la membrana citoplasmática de una bacteria. El método puede comprender poner en contacto una bacteria diana con una bacteriocina de apm, o parte de la misma, tal como se da a conocer en el presente documento. Alternativamente, el contacto puede ser con una bacteriocina de apm que contiene una composición dada a conocer en el presente documento.

En un grupo de realizaciones, el contacto se produce *in vivo* dentro de un sujeto. Por tanto, se da a conocer un método para comprometer la integridad de la membrana de una bacteria en un sujeto. El método puede comprender administrar una bacteriocina de apm o una parte de la misma tal como se describe en el presente documento al sujeto. En otro grupo de realizaciones, el contacto se produce *in vitro*.

Aún en realizaciones adicionales, se proporciona un método de formación de una progenie de bacterias no virulentas o no adaptadas a partir de las bacterias progenitoras virulentas. El método puede comprender poner en contacto bacterias virulentas con una bacteriocina de apm que se une a un factor de virulencia o adaptación de dichas bacterias progenitoras virulentas tal como se da a conocer en el presente documento. Entonces el método puede seguir permitiendo entonces la selección de una progenie de bacterias no virulentas que ya no expresan el factor de virulencia o adaptación.

En una realización alternativa, se proporciona un método de mantenimiento de una población de bacterias no virulentas. El método puede comprender poner en contacto la población con una bacteriocina de apm que se une a un factor de virulencia o adaptación de bacterias virulentas. Entonces el método continúa y previene la propagación de bacterias virulentas. Sin querer restringirse a ninguna teoría, y ofrecido para mejorar el entendimiento de la descripción, un surgimiento de resistencia bacteriana frente a una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética vendrá acompañado por una adaptación o virulencia comprometida de las bacterias patógenas.

Los métodos de la descripción también pueden aplicarse en un entorno en el que no se desea el crecimiento bacteriano o se considera que es perjudicial. Los ejemplos no limitativos incluyen la esterilización de entornos, incluyendo centros médicos y instalaciones de quirófanos; así como zonas de preparación de alimentos, incluyendo zonas en las que se manipula carne o pescado crudos. Los métodos también pueden usarse para esterilizar objetos sensibles al calor, dispositivos médicos e implantes de tejido, incluyendo órganos para trasplante.

Los métodos pueden usarse como una terapia individual o como una terapia adyuvante, tal como para el tratamiento de poblaciones bacterianas. Se conocen numerosos agentes antimicrobianos (incluyendo antibióticos y agentes quimioterápicos) que serían útiles en combinación con estos métodos para tratar estados basados en bacterias.

Bacterias diana

Las bacteriocinas de apm modificadas por ingeniería genética de la descripción pueden modificarse para seleccionar como diana un receptor en una variedad de cepas y especies bacterianas, incluyendo bacterias patógenas, tales como bacterias intrahospitalarias o piógenas, como ejemplos no limitativos. Además de la selección como diana de factores de virulencia de bacterias selectas tal como se describe en el presente documento, bacterias que ya son susceptibles a bacteriófagos son un grupo no limitativo de bacterias que pueden inhibirse por una bacteriocina de apm, tal como una piocina modificada por ingeniería genética, de la descripción. Estas bacterias incluyen las bacterias gram negativas que son susceptibles, así como no sensibles, a piocinas que se producen de manera natural. Los ejemplos no limitativos adicionales incluyen bacterias gram negativas como un grupo así como bacterias gram positivas. Hay informes de entidades similares a bacteriocinas en bacterias gram positivas (Thompson & Pattee, 1981; Birmingham & Pattee, 1981; Zink *et al.*, 1995). En algunas realizaciones, la bacteria diana se identifica o se diagnostica. Los ejemplos no limitativos de tales bacterias incluyen las del género *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* o *Streptococcus*.

Como ejemplo no limitativo de la selección como diana de un factor de virulencia, la descripción incluye el uso de un

RBD de proteína de fibras de la cola de fago como el de la proteína gp37 de un fago similar a T-par o similar a RB-69 denominado AV 17 que infecta a *E. coli* O157:H7 pero que no infecta a una cepa mutante derivada de la misma que ha perdido el antígeno O157. (Véase Yoichi *et al.*, 2005). La unión de este fago parece requerir la presencia del antígeno O157, un factor de virulencia, implicado en la adhesión al intestino del organismo *E. coli* O157:H7 patógeno. Por tanto, una bacteriocina de apm de la descripción puede contener una proteína de fibras de la cola modificada que contiene el RBD de la proteína gp37 (SEQ ID NO:33) del fago AV 17 descrito anteriormente de modo que la bacteriocina de apm modificada selecciona como diana un factor de virulencia, el antígeno O157, de *E. coli* O157:H7. La chaperona relacionada para la fibra de la cola de AV17 tiene SEQ ID NO:34.

Una bacteria diana incluye los responsables de infecciones por *P. aeruginosa* tóxicas o localizadas en seres humanos. Una "infección" se refiere al crecimiento de bacterias, tal como en un sujeto o tejido o célula no bacteriana, en el que las bacterias podrían provocar real o posiblemente una enfermedad o un síntoma en el sujeto, tejido o célula no bacteriana. El tratamiento de una infección puede incluir tratamiento profiláctico de sustancias o materiales. Los ejemplos no limitativos incluyen órganos, tejidos y células donados; equipo médico, como un respirador o máquina de diálisis; o heridas, tales como aquéllas durante o tras la cirugía. Otros usos incluyen la eliminación de bacterias diana que pueden provocar problemas tras el crecimiento adicional. En realizaciones adicionales, se usa una bacteriocina de apm para tratar plantas o partes de plantas recogidas con infecciones o contaminaciones bacterianas, o para tratar apariciones en el medio ambiente de las bacterias diana, tal como en un entorno hospitalario o comercial.

La descripción proporciona el tratamiento, mediante administración o contacto con una bacteriocina de apm dada a conocer en el presente documento para seleccionar como diana las bacterias, de tales infecciones en tejidos y sujetos tal como sigue. Las infecciones incluyen las infecciones comunes de la córnea ("queratitis" y úlceras corneales), al menos dos tercios de las cuales se producen por *P. aeruginosa*. Se notifica que aproximadamente el 30% de estos patógenos son resistentes a múltiples antibióticos (Mah-Sadorra *et al.*, 2005). Se considera la infección bacteriana de la córnea un estado relativamente poco común pero grave que requiere atención médica urgente debido a la posibilidad de reducción de la visión o incluso pérdida de visión en el/los ojo(s) afectado(s). Otras infecciones comunes que pueden tratarse, y que están provocadas por *P. aeruginosa* resistente a antibiótico, incluyen infecciones de oído, por ejemplo "otitis externa aguda" (Roland & Stroman, 2002), las secundarias a quemaduras a quemaduras y heridas graves (Holder, 1993), y fibrosis quística. La fibrosis quística se agrava de manera sistemática mediante infecciones resistentes a antibióticos, crónicas, provocadas por *P. aeruginosa* y su familiar cercano, *Burkholderia cepacia* (Govan & Deretic, 1996), y estos patógenos en fibrosis pueden tratarse mediante el uso de una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética. Debido a que bacteriocinas como piocinas tolerarán el secado por congelación (Higerd *et al.*, 1969), la descripción incluye una formulación secada por congelación de una bacteriocina para su administración para potenciar la probabilidad de administración satisfactoria a las vías respiratorias inferiores y/o superiores del aparato respiratorio.

Tal como se describe en el presente documento, el tratamiento de un sujeto es normalmente el tratamiento de "un sujeto que necesita tratamiento". La determinación, o el diagnóstico, de la necesidad de tratamiento puede hacerse por un experto, tal como un médico, mediante el uso de medios reconocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el sujeto es un animal o planta con una infección bacteriana que es potencialmente mortal o que altera la salud o disminuye la vida del organismo.

En realizaciones adicionales, se proporciona un método para destruir o inhibir el crecimiento de bacterias en una biopelícula. Un método de este tipo puede comprender poner en contacto una biopelícula con una bacteriocina de apm dada a conocer en el presente documento que selecciona como diana bacterias en la biopelícula.

Tal como se describe en el presente documento, se usa una bacteriocina de apm antibacteriana para inhibir el crecimiento, la supervivencia o la replicación de una bacteria particular. La bacteria puede ser una cepa patógena o medioambientalmente perjudicial, o puede tratarse de manera profiláctica. Un microorganismo patógeno generalmente provoca una enfermedad, algunas veces sólo en circunstancias particulares.

Las bacterias también puede ser las de una infección intrahospitalaria (derivada de hospital), bacterias medioambientales y bacterias piógenas (que forman pus). Los métodos y las composiciones de la descripción pueden usarse para inhibir el crecimiento de bacterias intrahospitalarias, incluyendo bacterias que pueblan un entorno hospitalario típico, o bacterias que están presentes en la piel humana o en el tubo digestivo humano, o bacterias que infectan y forman pus en heridas. Las infecciones intrahospitalarias son infecciones que resultan evidentes durante una estancia en el hospital o están relacionadas con un procedimiento realizado en un hospital. Estas infecciones relacionadas con procedimientos a menudo resultan evidentes después de que se dé de alta a los pacientes del hospital. Las infecciones bacterianas intrahospitalarias más comunes son infecciones de las vías urinarias, infecciones en el sitio quirúrgico, neumonía, diarrea asociada a *C. difficile* y colitis pseudomembranosa, e infecciones sistémicas graves en las que pueden crecer bacterias a partir de la sangre.

Los métodos y las composiciones de la descripción pueden usarse para inhibir el crecimiento de bacterias gram negativas o gram positivas. Los ejemplos no limitativos de bacterias gram positivas incluyen *Staphylococcus* (piógena), *Enterococcus* (oportunista), *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*,

Corynebacterium y *Clostridium*. Los ejemplos no limitativos de bacterias gram negativas incluyen *Pseudomonas* (piógena), *E. coli* (oportunistista), *Salmonella* (oportunistista), *Campylobacter* (oportunistista), *Proteus* (piógena), *Klebsiella* (oportunistista), *Enterobacter* (piógena), *Citrobacter* (piógena), bacilos no fermentadores gram negativos (tales como *Acinetobacter*) y *Shigella*. Los cocos piógenos son bacterias esféricas que provocan diversas infecciones supurantes (que producen pus) en animales. Se incluyen los cocos gram positivos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*, y los cocos gram negativos, *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis*.

En realizaciones adicionales, los métodos y las composiciones dados a conocer de la descripción se usan para inhibir el crecimiento, particularmente de bacterias resistentes a antibióticos. Los ejemplos no limitativos incluyen numerosos patógenos bacterianos que se han vuelto resistentes a múltiples fármacos (MDR).

Modificación por ingeniería genética de piocinas como ejemplo representativo no limitativo

Francois Jacob descubrió y describió por primera vez piocinas como bacteriocinas de alto peso molecular (Jacob, 1954). Se han descrito entidades parecidas a bacteriocinas similares en otras múltiples bacterias gram negativas (Coetzee *et al.*, 1968) así como en *Listeria monocytogenes* (Zink *et al.* 1995) y *Staphylococcus aureus* (Thompson y Pattee, 1981), ambas de las cuales son organismos gram positivos. Aunque las piocinas se asemejan morfológicamente a las colas de bacteriófagos contráctiles (*Myoviridae*), no son simples fagos defectuosos; hay diferencias significativas. Por ejemplo, existen diferencias en la estabilidad físicoquímica entre piocinas y colas de fagos (Kageyama & Egami, 1962; Nakayama *et al.*, 2000).

Aunque los espectros de huéspedes de piocinas son relativamente estrechos y se restringen habitualmente a cepas de la misma especie, hay excepciones (Morse *et al.*, 1976; Blackwell *et al.*, 1982). Por otro lado, los bacteriófagos de *Myoviridae* pueden presentar espectros de huéspedes amplios, y sus espectros de huéspedes, como los de las piocinas, se determinan mediante las especificidades de unión de las puntas de sus fibras de la cola (Tetart *et al.*, 2001).

Para numerosas fibras de la cola de fagos, el tercer gen distal (3'-terminal) varía en mutantes o variantes con espectros de huéspedes de fagos alterados, o "tropismos" (Ackermann, 2003). Como ejemplo no limitativo, el determinante del tropismo principal (Mtd), la proteína de unión al receptor del bacteriófago de *Bordetella* BPP-1, varía enormemente en secuencia (Liu *et al.*, 2004; Doulatov *et al.* 2004). La variación en Mtd depende de un retroelemento codificado por el fago (retroelemento de generación de diversidad, o DGR) que pertenece a una familia de DGR implicados en la generación de variación de secuencia en diversos genomas bacterianos y de fagos. El DGR de *Bordetella* puede producir más de 10^{13} variantes de secuencia diferentes de Mtd, lo que rivaliza con las 10^{14} - 10^{16} posibles secuencias de anticuerpos. Se producen variantes de Mtd mediante un proceso de mutagénesis específica de adenina único que implica transcriptasa inversa codificada por DGR (bRT) y una región de molde estable (TR). La variabilidad en Mtd se centra en 12 aminoácidos codificados por adenina que están dispersados por su región variable C-terminal (VR) (Doulatov *et al.* 2004). Se han resuelto las estructuras cristalinas tridimensionales de numerosas variantes de Mtd de *Bordetella* y confirman, tal como se describió anteriormente, que la punta de la estructura determina la especificidad de unión y de ese modo el tropismo principal (espectro de huéspedes) del fago (McMahon *et al.*, 2005). Por tanto, tal como se describe adicionalmente a continuación, puede usarse Mtd y su sistema de DGR relacionado en la puesta en práctica de la descripción.

Muchas especies de *Pseudomonas* tienen los genes para las piocinas de tipo R (Takeya *et al.*, 1969; Kageyama, 1975). El locus de piocinas de tipo R consiste en aproximadamente 16 grupos de complementación que incluyen aproximadamente 10 genes estructurales más genes de chaperonas y regulatorios (Shinomiya *et al.* 1983a; Shinomiya *et al.*, 1983b). Morfológica y genéticamente, las piocinas de tipo R se asemejan a las colas de bacteriófagos de *Myoviridae* pero no tienen estructura de cabeza y por tanto no contienen ácido nucleico (Kageyama, 1964; Ishii *et al.*, 1965; Shimizu *et al.*, 1982). Se piensa que han evolucionado de la estructura de la cola de fago de un ancestro relacionado con P2, pero no son simples fagos defectuosos, habiéndose adaptado adicionalmente a su papel como agentes bactericidas defensivos (Nakayama *et al.*, 2000). De manera similar a bacteriófagos, sin embargo, las piocinas se unen "receptores" moleculares específicos en bacterias diana y penetran en sus membranas con un "núcleo" o estructura similar a una aguja (Uratani & Hoshino, 1984). Como consecuencia inmediata de la penetración del núcleo en las membranas, la bacteria se destruye al comprometerse la integridad de su membrana citoplasmática y por la disipación de su potencial de membrana, un acontecimiento bactericida que puede resultar de un ataque por una única piocina (Iijima, 1978; Uratani & Hoshino, 1984; Strauch *et al.*, 2001).

El RBD, o determinante de unión al receptor de la unión de piocinas R, de una piocina de tipo R típica, se une a una molécula de superficie bacteriana. En el caso de un aislado de piocina R2, el RBD reside en la parte carboxilo-terminal de su fibra de la cola. La fibra de la cola es un homotrímero del producto del gen *prf15* (Nakayama *et al.*, 2000). La modificación del RBD en el gen *prf15* y la recombinación del gen *prf15* modificado en un sistema que produce piocinas de tipo R permiten la producción de una piocina modificada por ingeniería genética con especificidad de unión modificada.

El determinante del tropismo principal (Mtd) del bacteriófago de *Bordetella* tiene varias propiedades útiles y únicas como dominio de unión. La forma funcional de Mtd en el bacteriófago de *Bordetella* es un homotrímero que se une a

la proteína de factor de virulencia, pertactina, en *Bordetella*. Por tanto, el gen *mtd* puede fusionarse con el extremo distal del gen *prf15* para aprovechar las propiedades de Mtd. De ese modo, tal como se describe en el presente documento, un aspecto de la descripción incluye la construcción de una proteína de fusión entre la proteína de fibras de la cola de plocina de tipo R de *P. aeruginosa* (*prf15*) y el determinante del tropismo principal (Mtd) del fago de *Bordetella*, BPP-1. Puede usarse una fusión Prf15-Mtd para complementar en *trans* una delección de *prf15* de *P. aeruginosa* PA01 para unirse a y destruir *Bordetella bronchiseptica* que expresa pertactina o *E. coli* que expresa pertactina.

Adicionalmente, el bacteriófago P2 o P4 puede usarse como sustituto para albergar el gen de fusión de fibras de la cola *prf15-mtd* de manera que el genotipo está acoplado al fenotipo de unión de la fibra de la cola. Esto permite la transducción, selección y aislamiento eficaces del gen de fibras de la cola que codifica para el RBD deseado.

Modos de administración

Una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética de la descripción puede administrarse por cualquier medio adecuado. Los ejemplos no limitativos incluyen administración tópica o localizada, así como administración pulmonar (inhalación), gastrointestinal, mediante catéter o tubo de goteo, o sistémica a un sujeto. Los ejemplos representativos y no limitativos de administración sistémica incluyen administración intraperitoneal e intravenosa. Los efectos protectores de las plocinas administradas por vía intraperitoneal e intravenosa se han demostrado en ratones infectados de manera sistémica con dosis letales de cepas de *P. aeruginosa* sensibles *in vitro* a las plocinas administradas (Merrickin & Terry, 1972; Haas *et al.*, 1974). En algunas realizaciones, el contacto entre una bacteriocina de apm dada a conocer en el presente documento y una población bacteriana diana da como resultado una disminución en la población de al menos 10, al menos 100, al menos 1000 o al menos 10.000, o más, veces de disminución en relación con la ausencia de la bacteriocina. En otras realizaciones, el contacto puede dar como resultado una disminución en la detectabilidad de las bacterias en al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, o al menos 50, o más, veces en relación con la ausencia de la bacteriocina.

Una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética de la descripción puede administrarse a cualquier sujeto aquejado de, al que se le ha diagnosticado que está aquejado de, o que se sospecha que está aquejado de una infección o contaminación por bacterias susceptibles a la bacteriocina de apm. Los ejemplos no limitativos de un sujeto de este tipo incluyen especies animales (mamíferos, reptiles, anfibios, aves y peces) así como insectos, plantas y hongos. Los ejemplos representativos y no limitativos de especies de mamíferos incluyen seres humanos; primates no humanos; especies relevantes en agricultura tales como ganado, cerdos, cabras y ovejas; roedores, tales como ratones y ratas; mamíferos para compañía, exhibición o exposición, tales como perros, gatos, cobayas, conejos y caballos; y mamíferos para trabajo, tales como perros y caballos. Los ejemplos representativos y no limitativos de especies de aves incluyen pollos, patos, gansos y pájaros para compañía o exposición, tales como loros y periquitos. Un animal tratado con una bacteriocina modificada por ingeniería genética de la descripción también puede ser un animal cuadrúpedo, bípedo, acuático, un vertebrado o un invertebrado, incluyendo insectos.

En algunas realizaciones, el sujeto que va a tratarse es un niño humano u otro animal joven que aún tiene que alcanzar la madurez. Por tanto, la descripción incluye el tratamiento de estados pediátricos que comprenden la infección con bacterias u otros microorganismos susceptibles a una bacteriocina de apm de la descripción.

La descripción también proporciona el tratamiento o la prevención de una infección oportunista, tal como la que resulta de un crecimiento no deseable de bacterias que están presentes en la flora microbiana de un sujeto humano o un animal no humano. Una infección oportunista puede ser el resultado de un estado inmunosuprimido en un sujeto o el resultado de un tratamiento con antibióticos que altera la flora comensal del tracto genitourinario (GU) o gastrointestinal (GI). Por tanto, la descripción también proporciona el tratamiento o la profilaxis de sujetos inmunosuprimidos y sujetos expuestos a otros agentes farmacéuticos. Puede usarse una bacteriocina de apm con su actividad antibacteriana en combinación con otro agente antibacteriano o antimicrobiano, tal como un antibiótico o agente antifúngico como ejemplos no limitativos. Un "agente antimicrobiano" es un agente o compuesto que puede usarse para inhibir el crecimiento de, o para destruir, organismos unicelulares. Los agentes antimicrobianos incluyen antibióticos, agentes quimioterápicos, anticuerpos (con o sin complemento), inhibidores químicos de la síntesis o las funciones de ADN, ARN, proteínas, lípidos o la pared celular.

En algunas realizaciones, una bacteriocina de apm se formula con un excipiente o portador "farmacéuticamente aceptable". Un componente de este tipo es uno que es adecuado para su uso con seres humanos, animales y/o plantas sin demasiados efectos secundarios adversos. Los ejemplos no limitativos de efectos secundarios adversos incluyen toxicidad, irritación y/o respuesta alérgica. El excipiente o portador es normalmente uno que es acorde con una razón de beneficio/riesgo razonable. En muchas realizaciones, el portador o excipiente es adecuado para administración tópica o sistémica. Los portadores farmacéuticos no limitativos incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, excipientes farmacéuticos convencionales tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas,

incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares.

5 Composiciones farmacéuticas y formulaciones adicionales dadas a conocer en el presente documento comprenden una bacteriocina de apm aislada específica para un huésped bacteriano; una mezcla de dos, tres, cinco, diez o veinte o más bacteriocinas que seleccionan como diana los mismos huéspedes bacterianos; y una mezcla de dos, tres, cinco, diez o veinte o más bacteriocinas que seleccionan como diana diferentes huéspedes bacterianos o
10 diferentes cepas del mismo huésped bacteriano.

Opcionalmente, una composición que comprende una bacteriocina de apm de la descripción puede también liofilizarse usando medios bien conocidos en la técnica. La reconstitución y el uso posteriores pueden ponerse en práctica tal como se conoce en el campo.

15 También se proporcionan formulaciones que comprenden bacteriocina de apm microencapsulada. En algunas realizaciones, éstas pueden proporcionar cinéticas de liberación sostenida o permitir que la ingestión oral pase a través del estómago y al intestino delgado o grueso. En general, las composiciones farmacéuticas pueden prepararse en diversas formas, tales como gránulos, comprimidos, píldoras, supositorios, cápsulas (por ejemplo adaptadas para administración oral), microperlas, microesferas, liposomas, suspensiones, pomadas, pastas,
20 lociones y similares. Pueden usarse portadores y/o diluyentes orgánicos o inorgánicos de calidad farmacéutica adecuados para uso tópico y oral para constituir composiciones que comprenden los compuestos terapéuticamente activos. Pueden incluirse agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la presión osmótica o tampones para garantizar un valor de pH adecuado.

25 Una bacteriocina de apm se usa normalmente en una cantidad o concentración que es "segura y eficaz", lo que se refiere a una cantidad que es suficiente para producir una respuesta terapéutica deseada sin demasiados efectos secundarios adversos como los descritos anteriormente. Una bacteriocina de apm también puede usarse en una cantidad o concentración que es "terapéuticamente eficaz", lo que se refiere a una cantidad eficaz para producir una
30 respuesta terapéutica deseada, tal como, pero sin limitarse a, una cantidad eficaz para ralentizar la velocidad de división celular bacteriana, o para provocar el cese de la división celular bacteriana, o para provocar la muerte o disminuir la velocidad de crecimiento de la población de las bacterias. La cantidad segura y eficaz o cantidad terapéuticamente eficaz variará con diversos factores pero puede determinarse fácilmente por el experto sin demasiada experimentación. Los ejemplos no limitativos de factores incluyen el estado particular que está
35 tratándose, el estado físico del sujeto, el tipo de sujeto que está tratándose, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si hay alguna) y las formulaciones específicas empleadas.

Adicionalmente, y en anticipación de un posible surgimiento de resistencia bacteriana frente a una bacteriocina de apm modificada por ingeniería genética, puede haber un compromiso concomitante de la virulencia o adaptación de
40 los organismos cuando la bacteriocina selecciona como diana el factor de virulencia o adaptación de las bacterias seleccionadas como diana. Debido a que un mecanismo principal, pero no limitativo, mediante el cual una bacteria puede hacerse resistente a una bacteriocina de apm es la pérdida de su receptor para la bacteriocina, la selección como diana de un factor de virulencia o adaptación tal como se da a conocer en el presente documento proporciona muchas ventajas con respecto a los bacteriófagos y antibióticos tradicionales. La resistencia a bacteriófagos y
45 antibióticos tradicionales puede resultar de muchos mecanismos diferentes distintos de la pérdida del receptor o la molécula diana del agente antibacteriano. Como ejemplos no limitativos, una bacteriocina de apm de la descripción no se sometería a una bomba de eflujo bacteriano para eliminar la bacteriocina del entorno celular no sería el sujeto de un mecanismo de desactivación de ácido nucleico bacteriano.

50 Habiendo descrito ahora generalmente el contenido de la invención, la misma se entenderá más fácilmente a través de la referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración, y no pretenden ser limitativos de la descripción, a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplos

55 Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar el contenido reivindicado.

Ejemplo 1: Bacteriocinas de apm modificadas que contienen una proteína de fusión

60 a) Sistema de complementación

Para facilitar la preparación de una bacteriocina de apm modificada tal como se describe en el presente documento, se estableció la construcción de un sistema para complementar fibras de la cola en *trans*. Usando la piocina R2 como modelo representativo, se usó la creación de una delección de la secuencia codificante de *prf15* de R2 en el
65 genoma de *P. aeruginosa* PAO1 para crear una plataforma en la que se expresaba en *trans* una proteína de fibras de la cola de complementación, tal como un producto del gen *prf15* modificado.

Generalmente, se realizó la delección mediante el método de Hoang *et al.* para crear la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 Δ *prf15*. La región codificante de *prf16*, SEQ ID NO:4, para la chaperona de R2 se solapa con el extremo del gen *prf15* de R2 en 8 nucleótidos y el sitio de unión al ribosoma se encuentra dentro de la región codificante de *prf15*, SEQ ID NO:3. Se ha notificado que la proteína Prf16, que no se incorpora necesariamente en la estructura de la proteína, se requiere para una actividad máxima, para el ensamblaje de la fibra de la cola trimérica (figura 8 y Nakayama *et al.*, 2000). Por tanto, tanto el sitio de inicio de la transcripción para *prf16* como su sitio de unión al ribosoma se dejaron intactos de manera que la chaperona se produciría tras la inducción del constructo de piocina modificada que codifica para una piocina defectuosa, "sin cola".

En resumen, se realizó una delección en marco de los codones 11-301 de PRF15 en PAO1 tal como sigue. Se amplificó un fragmento de KpnI-AgeI de 1,1 kb en el sentido de 5' de la delección deseada mediante PCR a partir de ADN genómico de PAO1 usando los cebadores AV085 (5'-GCTTCAATGTGCAGCGTTTGC) (SEQ ID NO:46) y AV088 (5'-GCCACACCGGTAGCGGAAAGGCCACCGTATTTTCGGAGTAT) (SEQ ID NO:47), y se amplificó un fragmento de AgeI-EcoRI de 2,2 kb usando los cebadores AV087 (5'-ATACTCCGAAATACGGTGGCCTTTCCGCTACCGGTGTGGC) (SEQ ID NO:48) y AV086 (5'-TCCTTGAATTCCGCTTGCTGCCGAAGTTCTT) (SEQ ID NO:49). Se clonaron los fragmentos de restricción resultantes en los sitios KpnI y EcoRI de pEX18Gm (Hoang *et al.*) para preparar pEXGm- Δ *prf15*. Se transformó el constructo acabado en la cepa PAO1 mediante electroporación (Chuanchuen *et al.*). Se seleccionaron integrantes con gentamicina 100 μ g/ml, y entonces se seleccionaron segregantes en medios que contenían sacarosa 5 μ g/ml y que carecían de NaCl y gentamicina. Se confirmaron los candidatos de delección mediante análisis de PCR, inducción de piocinas y secuenciación de un fragmento amplificado por PCR.

La cepa PAO1 \square *prf15* crece de manera similar a su cepa original, PAO1, y los genes que codifican para piocinas siguen siendo inducibles a través de la respuesta SOS, que conduce a lisis de la célula. Aunque parece haber algo de producción de productos de genes de piocinas, no parecía que se produjeran partículas de piocinas "sin cola" estables a partir de PAO1 \square *prf15*.

Se expresó en *trans* Prf15 de piocina R2 clonando en primer lugar la secuencia codificante en el vector lanzadera de *Pseudomonas/E. coli* de espectro de huéspedes amplio, pUCP30T. Véase la figura 9. En algunos constructos iniciales, se dirigió la transcripción de manera constitutiva o bajo el control de *lacI* a partir del promotor *tac*. Pero en otros constructos, se modificó la transcripción para que estuviese regulada con un promotor de *prf15* endógeno de manera que la expresión se regulase a través de la respuesta SOS. Esto permitió que la expresión del gen *prf15* modificado se indujera de manera sincrónica con la expresión de los otros genes de piocinas que residen en el genoma de PAO1 \square *prf15*.

En resumen, se modificó el vector de espectro de huéspedes amplio pUCP30T (Schweizer, H.P *et al.*) rellenando el sitio BspHI único para formar pUCP30T \square Bsp. Se amplificó un promotor *tac* mediante PCR a partir de un vector de expresión de Mtd (una donación de Jeffery F. Miller, UCLA) usando los cebadores AV110 (5'-TTTATTAGCGGAAGAGCCGACTGCACGGTGCACCAATG) (SEQ ID NO:50) y AV114 (5'-CCCTCGAATTCATGAATACTGTTTCTGTGTGAAATTG) (SEQ ID NO:51), luego se clonó en pUCP30T \square Bsp para crear pUCP-tac.

Se amplificó la región que codifica para PRF15 de R2 a partir de un subclón usando los cebadores AV 118 (5'-CTTCCTTTCATGACGACCAATACTCCGAA) (SEQ ID NO:52) y AV116 (5'-ACCACGAATTCTTCATCGTCCAAATGCCTC) (SEQ ID NO:53), mientras que se amplificaron *prf15* y *prf16* de R2 usando los cebadores AV 118 y AV086 (5'-TCCTTGAATTCCGCTTGCTGCCGAAGTTCTT) (SEQ ID NO:49). Se clonaron los fragmentos amplificados de *prf15* y *prf15/16* en pUCPtac digerido con BspHI y EcoRI para producir pUCP-tac-*prf15* y PUCP-tac-*prf15/16*.

Para la expresión usando el promotor de *prf15* endógeno, se amplificaron *prf15* y *prf16* junto con la secuencia de 1088 pb en el sentido de 5' de *prf15* a partir de un subclón usando los cebadores AV107 (5'-CACCATCTAGACAATACGAGAGCGACAAGTC) (SEQ ID NO:54) y AV091 (5'-TCCTCAAGCTTACGTTGGTTACCGTAACGCCGTG) (SEQ ID NO:55) y se clonaron en pUCP30T digerido con XbaI e HindIII para crear pUCP-R2p-*prf15/16*.

Se trataron bacterias en crecimiento en suspensión en fase logarítmica y que contenían los plásmidos de expresión con 3 μ g de mitomicina C/ml para inducir la producción de piocinas. Se produjeron piocinas estables tras la inducción con rendimientos similares a los de PAO1 de tipo natural. Las piocinas tenían el mismo espectro bactericida y nivel de actividad que la piocina R2 producida a partir de PAO1. Parece que la producción de un complejo de piocinas estables requiere la expresión de una proteína de fibras de la cola además de la expresión de los otros genes que codifican para piocinas, y la expresión del gen de fibras de la cola en *trans* es suficiente.

Cuando se expresó *prf15* de manera constitutiva a partir del promotor *tac*, el crecimiento celular era marcadamente más lento que cuando se regulaba mediante *lacI* o el promotor endógeno. Aunque parece que la producción de PRF15 sola en la célula es perjudicial, los rendimientos de piocinas generadas a partir de ambos promotores son

comparables.

Se preparó un constructo de plásmido a partir del cual se coexpresó *prf16* de R2 con *prf15* de R2 para garantizar la expresión temporal apropiada de *prf16* para el plegamiento de PRF15 expresada en *trans*.

5

b) Bacteriocinas de apm recombinantes

Tal como se describe en el presente documento, se han reconocido cinco piocinas de tipo R diferentes, basándose en los espectros y denominándose R1-5. Debido a que sólo se conocían las secuencias génicas que codificaban para las proteínas de fibras de la cola para R1 (SEQ ID NO:1) y R2 (SEQ ID NO:3), se usó PCR para aislar y secuenciar los genes de fibras de la cola de las piocinas R3 (SEQ ID NO:5), R4 (SEQ ID NO:7) y R5 (SEQ ID NO:9) junto con sus secuencias que codifican para chaperonas relacionadas presentes en sus cepas productoras, SEQ ID NO: 6, 8 y 10, respectivamente. También se clonaron y secuenciaron los genes de chaperonas de las piocinas R1 y R2, SEQ ID NO:2 y 4, respectivamente. Para confirmar la hipótesis de que la fibra de la cola dicta los espectros, se obtuvieron las secuencias que codifican para las proteínas de fibras de la cola de las piocinas R1, R3, R4 y R5 y se expresaron en *trans* en PAO1 \square *prf15* de manera que pudiesen incorporarse en la estructura de la piocina R2. Se indujo entonces cada una de las cepas recombinantes resultantes para que produjese piocinas y se determinó el espectro de cada una mediante ensayos de puntos, tal como se muestra en las figuras 2 y 8.

10

15

20

c) Proteínas de fusión como proteínas de fibras de la cola

Se creó una fusión del gen *prf15* de la fibra de la cola de R2 y secuencias del gen *H* del bacteriófago P2, se expresó y se usó para producir bacteriocinas de apm modificadas adicionales de la descripción. El bacteriófago P2, que infecta a muchas cepas de *E. coli*, tiene un gen que codifica para fibras de la cola, *H*, (SEQ ID NO:25) que tiene similitud de secuencia significativa con *prf15* de R2 (SEQ ID NO:3), particularmente en la parte que codifica para el extremo N-terminal. Se fusionó la parte del gen *H* que codifica para los 551 residuos de aminoácido C-terminales de la proteína de fibras de la cola de P2, que es la supuesta región que confiere especificidad de diana (RBD), con la parte de *prf15* que codifica para la parte de unión a la placa basal (BPAR) N-terminal de 164 aminoácidos de PRF 15 de R2 para codificar para una proteína de fibras de la cola modificada (SEQ ID NO:27).

25

30

El bacteriófago P2 también codifica para una supuesta chaperona de fibras de la cola, codificada por el gen *G* (SEQ ID NO:26), similar a la codificada por *prf16* de la piocina R2 (SEQ ID NO:4), y las chaperonas de muchos de los otros fagos *Myoviridae*. Debido a que es probable que la chaperona codificada por el gen *G* sea importante para el plegamiento de la parte C-terminal de la proteína de la cola de P2 en la fusión, se prepararon constructos para coexpresar el gen *G* de P2.

35

Se amplificó la parte de *prf15* de R-2 que codifica para los aminoácidos 1-164 a partir de un subclón usando los cebadores AV118 y AV127 (5'-TTCTTTAAGCTTTTCCTTCACCCAGTCCTG) (SEQ ID NO:56) y se digirió con BspHI e HindIII. Se amplificó la parte del gen *H* de P2 que codifica para los aminoácidos desde la posición 158-669 a partir de una reserva de fagos P2 (Richard Calendar) usando los cebadores AV124 (5'-CCTCCTGAATTCTTATTGCGGCATTTCCG) (SEQ ID NO:57) y AV126 (5'-TCCTTGAATTCTTACACCTGCGCAACGT) (SEQ ID NO:58). Se amplificó el gen *H* de P2 158-669 más el gen *G* usando los cebadores AV124 y AV125 (5'-CCTCCTGAATTCTTATTGCGGCATTTCCG) (SEQ ID NO:59). Se digirió cada uno de los productos de PCR de P2 con HindIII y EcoRI. Se creó pUCP-tac-R2-P2H clonando el fragmento de *prf15* que codifica para el fragmento de aminoácidos 1-164 junto con el fragmento del gen *H* de P2 que codifica para el fragmento de aminoácidos 158-669 en pUCP-tac digerido con BspHI y EcoRI. Se generó pUCP-tac-R2-P2HG clonando el fragmento *prf15* que codifica para el fragmento de aminoácidos 1-164 junto con el fragmento del gen *H* de P2 que codifica para el fragmento de aminoácidos 158-669 más el gen *G* en pUCP-tac digerido con BspHI y EcoRI.

40

45

50

En resumen, se transformó PAO1 \square *prf15* con los constructos de fusión del gen *H* de *prf15*-P2 y se indujo la producción de piocinas con mitomicina C. Se purificaron las partículas de piocinas y se sometieron a prueba para determinar la actividad mediante pruebas de puntos y mediante el ensayo de supervivencia bacteriana (véase la figura 2). Las partículas de piocinas purificadas que contenían la fibra de la cola con la fusión R2-P2 tenían actividad bactericida frente a la cepa de *E. coli* Cla pero no podían destruir la cepa de *P. aeruginosa* 13s. Además, era necesaria la expresión del gen *G* de P2 para producir piocina activa. Esto apoya la hipótesis de que se requiere la chaperona para el plegamiento apropiado de la parte C-terminal de la fibra de la cola, tal como se muestra en la figura 8.

55

60

Se exploraron las capacidades de una gama de diferentes fusiones de proteínas de fibras de la cola R2-P2 para formar piocinas funcionales que destruyen *E. coli* C1a mediante una serie de diferentes fusiones R2-P2. Se muestran ejemplos representativos de estas fusiones en las figuras 4-7, junto con la indicación de sus actividades bactericidas frente a *E. coli* C1a.

65

d) Fusiones adicionales

Se ha producido una bacteriocina de apm modificada adicional para seleccionar como diana *Y. pestis*. L-413c es un yersiniofago que infecta a la mayoría de las cepas de *Y. pestis* (Richard Calendar, comunicación personal). La mayor parte del genoma de L-413c es altamente similar a P2 con la notable excepción del gen *H* de la fibra de la cola, SEQ ID NO:28, que divergía considerablemente. Sin querer restringirse a la teoría, y ofreciéndose para mejorar la comprensión de la descripción, la variación en el gen *H* de la fibra de la cola, y por tanto la proteína codificada, es la característica que explica lo más probablemente su diferente espectro de huéspedes.

El extremo N-terminal del gen *H* de L-413c (SEQ ID NO:28), sin embargo, comparte una considerable similitud de secuencia con su homólogo P2 (SEQ ID NO:25), probablemente debido a su función de unión a la placa basal. Se construyó una fusión para crear una fibra de la cola de fusión con los aminoácidos 1-164 N-terminales a partir de PRF15 de R2 fusionada con la parte C-terminal (posiciones 158-913) de la fibra de la cola de L-413c para crear una fibra de la cola modificada, tal como se muestra en la figura 10 (SEQ ID NO:30). Se expresó la fusión en PAO1 \square *prf15* junto con la chaperona relacionada de la fibra de la cola de L-413c, gen *G* (SEQ ID NO:29), tal como se describió anteriormente. Tras la inducción, las partículas de piocinas producidas destruían *Y. pestis* KIM así como *E. coli* C y tienen por tanto un espectro de destrucción análogo al espectro de huéspedes del yersiniofago L-413c. Las piocinas modificadas no destruían ninguna de las cepas de *Pseudomonas*.

Se ha preparado una partícula de piocina de apm modificada adicional con una fibra de la cola de fusión novedosa creada entre la BPAR de fibra de la cola de piocina de tipo R de *P. aeruginosa* (codificada por *prf15*) y el gen de fibra de la cola *orf34* y/o el RBD del gen de fibra de la cola *orf35* de VHML (SEQ ID NO:21 y 22, respectivamente). Para crear las partículas de piocinas, se coexpresó el gen de chaperona relacionada de VHML (SEQ ID NO:23) con los genes de fusión de fibras de la cola modificadas. Se formaron y analizaron piocinas con las fibras de la cola modificadas. La bacteriocina de apm modificada resultante con el RBD derivado de VHML puede someterse a diversificación mediante la DGR natural de VHML.

El determinante del tropismo principal (Mtd) del bacteriófago de *Bordetella* BPP-1 tiene un dominio de lectina de tipo C (CTL), que sirve como determinante de unión para muchos tipos de moléculas diferentes y en muchos contextos biológicos diferentes (Drickamer, 1999; McMahon *et al.*, 2005). En BPP-1, Mtd se incorpora como un dominio globular homotrimérico ubicado en el extremo de la cola del fago, donde puede unirse a la proteína pertactina de superficie, un factor de virulencia expresado en la superficie externa de *Bordetella bronchiseptica* y *Bordetella pertussis* (Liu *et al.*, 2004). En este contexto, Mtd es también la diana de la mutagénesis "homing" mediada por fagos, que puede dar como resultado que el bacteriófago adquiera un determinante de unión novedoso para infectar su siempre cambiante huésped.

Estudios estructurales recientes sobre el dominio Mtd y varias de sus variantes diversificadas han mostrado cómo la punta de la fibra trimérica forma un armazón rígido que puede contener más de 10 trillones de ligandos de unión variantes (McMahon *et al.* 2005). La fusión del dominio Mtd sobre la proteína de fibras de la cola de piocinas y luego la diversificación del dominio Mtd usando el sistema de DGR descrito por Miller y colaboradores (Liu *et al.*, 2004; Doulatov *et al.*, 2004), crea una biblioteca de variantes muy grande, a partir de la cual seleccionar y obtener los genes que codifican para colas de piocinas con especificidad de unión alterada.

Ejemplo 2: Ensayos de proteínas de fusión

a) Purificación de piocinas y ensayos

Se hicieron crecer PAO1 y derivados agitando a 200 rpm a 37°C en medio G complementado con gentamicina 50 µg/ml cuando sea necesario para mantener los plásmidos. Cuando los cultivos alcanzaron una DO600 de 0,250, se añadió mitomicina C hasta una concentración final de 3 µg/ml. Se incubaron los cultivos durante otras 2,5 horas hasta que se produjo la lisis. Se añadieron cinco µl de ADNasa I, y se dejó incubar el cultivo 30 min. adicionales. Se eliminaron los residuos mediante centrifugación a 12.000 rpm en un rotor Beckman JLA-16.250 durante 1 hora. Se añadió lentamente sulfato de amonio saturado, a una velocidad de 1 ml/min., al sobrenadante agitando sobre hielo, hasta un volumen añadido final de 65 ml por 100 ml del sobrenadante del lisado. Se almacenó esto a 4°C durante la noche. Se recogió el precipitado de sulfato de amonio mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 1 hora, y se resuspendió el sedimento en 10 ml de tampón TN50 (tris 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5). Se sedimentaron entonces las partículas de piocinas en la disolución resuspendida a alta velocidad, 20.000 rpm (65.000 x g) en un rotor Beckman JA-25.50 durante 1 hora, y se resuspendieron en 3-5 ml de tampón TN50. Se consideró que las preparaciones de piocinas eran >90% puras mediante análisis electroforético en gel de SDS poliacrilamida.

Se realizaron análisis de piocinas cuantitativos contando la supervivencia bacteriana en un método ligeramente modificado tal como se describe por Kagayama *et al.*, 1964. Se incubaron muestras de piocinas con bacterias diana (aproximadamente 1×10^9 UFC/ml) durante 40 minutos a 37°C. Entonces se diluyeron las muestras y se sembraron en placa para contar los supervivientes. El número de partículas de piocinas se refiere a la fracción de supervivientes bacterianos en una distribución de Poisson, $m = -\ln S$, en la que m = el número promedio de acontecimientos letales / célula y S es la fracción de supervivientes. El número total de partículas de piocinas activas/ml = $m \times$ células/ml. La cepa 13s era la *Pseudomonas aeruginosa* usada en estos ensayos y es un aislado clínico resistente a muchos antibióticos, pero sensible a las 5 piocinas de tipo R. La diana de *E. coli* era C1a,

amablemente proporcionada por Richard Calendar.

Se realizaron también análisis semicuantitativos mediante un método de puntos en el que se diluyeron en serie muestras de piocinas en tampón TN50 y se sembraron por puntos sobre cultivos de bacterias diana. Tras la
 5 incubación durante la noche a 37°C, pudo observarse actividad de piocinas mediante una clara zona de destrucción en el cultivo. La figura 2 muestra resultados representativos a partir de este formato de ensayo.

Ejemplo 3: Bacteriófago recombinante para examinar fibras de la cola modificadas por ingeniería genética

10 Se usa el bacteriófago P4 como sustituto para albergar el gen de fusión de fibras de la cola basado en Prf15 de manera que el genotipo está acoplado al fenotipo de unión de la fibra de la cola. Esto permite una transducción y selección eficaces del gen de fibras de la cola deseado.

15 El bacteriófago P2 es un colifago temperado que puede infectar otras especies entéricas, y puede replicarse en, pero no infectar a, *P. aeruginosa* (Bertani & Six, 1988; Kahn *et al.*, 1991). Las piocinas de tipo R están estrechamente relacionadas genética y estructuralmente con P2, y la proteína de fibras de la cola de P2, codificada por el gen *H*, muestra homología con *prf15* en la parte N-terminal, donde se produce la unión a la placa basal (Haggard-Ljungquist *et al.*, 1992; Nakayama *et al.*, 2000). La utilización del bacteriófago P2 o P4 como fago sustituto, en el que se incorporan fibras de la cola codificadas por plásmidos en lugar de fibras codificadas por el
 20 fago P2, permite la presentación y selección de fibras de fusión en un contexto que se asemeja estrechamente a un contexto funcional previsto en la piocina.

25 El genotipo de fibra de la cola puede acoplarse físicamente al fenotipo de unión en una partícula de fago de transducción para selección genética, similar a la tecnología de presentación en fago. Cuando un fago P2 con una mutación ámbar en su gen de proteína de fibras (H) infecta a *E. coli* que alberga un plásmido con un sitio de empaquetamiento *cos*, que normalmente actúa como señal para empaquetar el ADN genómico del bacteriófago (Ziermann & Calendar, 1991; Kahn *et al.*, 1991), empaquetará el plásmido que contiene *cos* en las cabezas de fago P2 recién sintetizado. El plásmido codifica y expresa el gen de fusión de la cola basado en *prf15* y confiere resistencia a gentamicina. La fibra de la cola de fusión expresada a partir del plásmido en la *E. coli* infectada por P2
 30 se incorpora en el bacteriófago P2 en lugar del producto del gen H defectuoso (ámbar truncado) (proteína de fibras de la cola de P2). Tras la lisis de las bacterias, las partículas de transducción basadas en P2 liberadas portan el plásmido que contiene *cos* que contiene en gen de fusión de la cola basado en *prf15* en vez del genoma de P2 y tiene fibras de la cola de fusión de Prf15 en vez de fibras de la cola de P2.

35 Partículas de fago de transducción con la capacidad para unirse a células y desencadenar el mecanismo de inyección del bacteriófago confieren entonces resistencia a gentamicina para seleccionar como diana satisfactoriamente bacterias, a partir de las cuales se aísla el gen de fusión de fibras seleccionado a partir del plásmido tras la replicación de las bacterias en selección con gentamicina. El gen de fibras de la cola en los plásmidos se manipula fácil y adicionalmente para crear muchas uniones de fusión y diversificar el RBD con el fin de
 40 rediseñar y optimizar la función el RBD de fibras de la cola modificado.

45 Este enfoque también supera muchas de las dificultades impuestas por la presentación C-terminal de una proteína trimérica cuando se usan sistemas de presentación en fago convencionales (Held & Sidhu, 2004). El bacteriófago P2 tiene fibras de la cola que se asemejan genética y morfológicamente a las de piocinas (Nakayama *et al.*, 2000). Las fibras de la cola se unen a las placas basales de P2 y piocinas mediante sus extremos N-terminales, y hay una similitud de secuencia significativa de los extremos N-terminales de P2 y fibras de la cola de la piocina R2 (Nakayama *et al.*, 2000; Haggard-Ljungquist *et al.*, 1992). Además, el gen de fibras de la cola del fago relacionado con P2, PS17, puede complementar el gen de fibras de la cola de la piocina R-2, *prf15* (Shinomiya, 1984; Shinomiya & Ina, 1989).
 50

Alternativamente, el RBD se fusiona directamente con el dominio N-terminal de la fibra de la cola del gen H, o los genes de fibras de la cola del fago VHML de *Vibrio harveyi* (que como BPP-1 también contiene un DGR que funciona) se fusionan con el dominio N-terminal del gen H de P2.

55 Ejemplo 4: Métodos para recuperar el gen de fibras de la cola deseado

Un bacteriófago P2, P4 o Φ CTX que porta un gen de fibras de la cola modificado por ingeniería genética actúa como sustituto para acoplar el genotipo de fibras de la cola de piocinas al fenotipo de unión. Seleccionando o examinando fenotipos de unión específicos a partir de las bibliotecas diversificadas o mutagenizadas de los genes de fibras de la cola albergados en bacteriófagos sustitutos, puede aislarse los genes de fibras de la cola que codifican para una
 60 especificidad de unión deseada. La selección puede llevarse a cabo mediante ciclos de enriquecimiento individuales o múltiples de adsorción de los bacteriófagos sustitutos o partículas de transducción sobre moléculas diana de fase sólida, o bien eliminando en primer lugar los elementos de unión no deseados y luego aislando, de entre los sustitutos restantes, lo que se unen a las moléculas diana previstas, o bien viceversa. Alternativamente, la selección puede producirse aplicando cualquier etapa de unión sola. En última instancia, el sustituto que presenta el fenotipo
 65 de unión deseado puede someterse a extracción y aislamiento del ADN del gen de fibras de la cola albergado

clonando fragmentos de enzimas de restricción o mediante reacciones de PCR usando cebadores oligonucleotídicos que se unen a secuencias de ADN específicas periféricas a la parte diversificada del gen de fibras de la cola.

5 El bacteriófago sustituto deseado puede purificarse por placas sobre un cultivo de bacterias que expresan la diana molecular de interés, por ejemplo, un factor de virulencia o adaptación mediante el cual los bacteriófagos sustitutos infectan al huésped. Las bacterias que expresan factores pueden ser el patógeno de interés, por ejemplo *Pseudomonas aeruginosa*, o un no patógeno, por ejemplo *E coli* modificada por ingeniería genética para expresar el factor de virulencia o adaptación seleccionado como diana. Pueden utilizarse técnicas de siembra en placa en serie o siembra en placa duplicada para garantizar que el bacteriófago sustituto no forma placas en cepas bacterianas estrechamente relacionadas que no expresan el factor diana. Por ejemplo, pueden usarse mutantes de inserción de *Pseudomonas aeruginosa* que han perdido la expresión de factores de virulencia específicos para examinar o, para reducir mediante adsorción, bacteriófagos sustitutos antes o después de formar placas sobre, o cribado sobre, sus bacterias homólogas (isogénicas) que expresan factores de virulencia o adaptación.

15 Aún cuando los fagos sustitutos o partículas de transducción no formen placas sobre las bacterias que expresan la diana, las bacterias infectadas o transducidas adquirirán todavía resistencia a antibióticos junto con el plásmido o plásmido albergado y por tanto pueden hacerse crecer selectivamente y extraerse posteriormente para aislar el plásmido de múltiples copias y su gen de fibras de la cola deseado.

20 Estas técnicas permiten la identificación y el aislamiento de bacteriófagos sustitutos o partículas de transducción que presentan los fenotipos de unión deseados, específicos a partir de los cuales se extraen los genes de fibras de la cola de bacteriocinas de apm deseados, específicos, no naturales. Además, puede utilizarse la unión de sustitutos a moléculas, células o tejidos de mamífero para reducir de las bibliotecas cualquier gen que codifique para fibras de la cola que pueda provocar acontecimientos adversos si se incorpora en bacteriocinas de apm terapéuticas.

25 Está disponible una biblioteca de cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* mutantes de inserción que difieren de la *Pseudomonas aeruginosa* PA14 altamente patógena original sólo por la falta de expresión de una serie de factores de virulencia específicos, faltando uno de cada mutante isogénico, no redundante (véase el sitio web en ausubellab.mgh.harvard.edu/cgi-bin/pal4/home.cgi). Estas cepas mutantes isogénicas proporcionan herramientas para garantizar la especificidad de los bacteriófagos sustitutos para los factores de virulencia seleccionados como diana y no para otras moléculas de superficie prevalentes. Por ejemplo, la población de bacteriófagos P4 sustitutos puede incubarse con un cultivo de alta densidad de un mutante de *Pseudomonas aeruginosa* del que falta un factor de virulencia seleccionado como diana particular con el fin de absorber y reducir de una población de bacteriófagos sustitutos o partículas de transducción, los que se unen a moléculas de superficie presentes en tanto el mutante isogénico como la cepa original virulenta. La población reducirá estará enriquecida en sustitutos que se unen al factor de virulencia deseado. Una vez aislados bacteriófagos sustitutos que se unen a e infectan las bacterias que expresan el factor de virulencia o adaptación particular, puede examinarse cada uno directamente para determinar su incapacidad para infectar la cepa mutante isogénica que carece del factor seleccionado como diana. El plásmido seleccionado puede reempaquetarse en partículas de transducción sustitutas y reciclarse cualquier número de veces a través del proceso de adsorción-reducción e infección para enriquecer adicionalmente y purificar finalmente el plásmido basado en pUC que codifica para las fibras de la cola deseadas para seleccionar como diana el factor de virulencia o adaptación.

45 Ejemplo 5: Métodos para producir bacteriocinas de apm modificadas por ingeniería genética

El gen de fibras de la cola modificado se recombina o bien (i) en un plásmido bajo un promotor regulado para su expresión en bacterias de producción que también albergan, por ejemplo en un cromosoma artificial bacteriano (BAC), la agrupación génica de piocinas R (incluyendo los genes de endolisina) de las que se han delecionado o inutilizado de otra forma los genes de prtR, prtN, prf15 y holina (prf9 o PA0614) residentes, o bien (ii) en la agrupación de piocina que contiene el propio vector BAC, usando una reacción de intercambio alélico mediado por plásmido.

55 Tras la inducción de los genes de piocinas y el gen de fibras de la cola modificado por ingeniería genética, tal como mediante la inducción de prtN directamente mediante un promotor regulable modificado por ingeniería genética tal como *lac* o *tac*, las células huésped sintetizan piocinas hasta que sus nutrientes se agotan y dejan de crecer (Young, Ry, 2006). Las bacterias productoras no se lisan en ausencia de cloroformo, porque la inactivación del gen de la holina impide el acceso de la endolisina citoplasmática a la pared celular bacteriana, como es necesario para la lisis celular. Se recogen las células agotadas mediante centrifugación o filtración y entonces se congelan hasta que se desee recoger las piocinas solubles que han rellenado el citoplasma celular. Tras descongelar, se rompe la membrana celular interna, liberando endolisina para lisar las bacterias y de ese modo liberar la recogida de piocinas modificadas. La ruptura de las membranas bacterianas puede acelerarse o completarse si es necesario mediante la adición de pequeñas cantidades de cloroformo al disolvente acuoso en el que se descongela la pasta bacteriana.

65 **Referencias**

Ackermann HW. 2003. Bacteriophage observations and evolution. Res Microbiol. 154:245-251

- Aiache JM, S Meski, E Beyssac, G Serpin. 1997. The formulation of drug for ocular administration. *J Biomater Appl.* 11:329-48
- 5 Anantharaman *et al.* "Application of comparative genomics in the identification and analysis of novel families of membrane-associated receptors in bacteria." *BMC Genomics*, 4:34, 2003
- Bad Bugs, No Drugs: As Antibiotic Discovery Stagnates A Public Health Crisis Brews, July 2004. Infectious Diseases Society of America
- 10 Beisel KW, LD Hazlett, RS Berk. 1983. Dominant susceptibility effect on the murine corneal response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Soc Exp Biol Med.* 172:488-491
- 15 Bertani LE, y EW Six. 1988. The P2-like phages and their parasite, P4. In R. Calendar (ed.), *The Bacteriophages*, vol. 2. Plenum Publishing Corp., Nueva York. págs. 73-143
- Birmingham VA, PA Pattee. 1981. Genetic Transformation in *Staphylococcus aureus*: Isolation and Characterization of a Competence-Confering Factor from Bacteriophage 80a Lysates. *Journal of Bacteriology* 148:301-307
- 20 Blackwell CC, y Law JA. 1981. Typing of non-serogroupable *Neisseria meningitidis* by means of sensitivity to R-type pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect.* 3(4):370-8.
- Blackwell CC, FP Winstanley, WA Telfer-Brunton. 1982. Sensitivity of thermophilic campylobacters to R-type pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med Microbiology.* 15:247-51
- 25 Bonev *et al.* "Targeting extracellular pyrophosphates underpins the high selectivity of nisin." *The FASEB Journal.* 18:1862-1869, 2004
- Burda MR, Miller S. Folding of coliphage T4 short tail fiber in vitro. Analysing the role of a bacteriophage-encoded chaperone. *Eur J Biochem.* 1999 Oct;265(2):771-8.
- 30 Burns RP. 1969. *Pseudomonas aeruginosa* keratitis: mixed infections of the eye. *Am J Ophthalmol.* 67:257-262
- Calamita, "The *Escherichia coli* aquaporin-Z water channel." *Molecular Microbiology* 37(2):254-262, 2000
- 35 Chappell JD, AE Prota, TS Dermody, T Stehle. 2002. The crystal structure of reovirus attachment protein $\sigma 1$ reveals evolutionary relationship to adenovirus fiber. *The EMBO Journal* 21:1-11
- Cheng KH, SL Leung, HW Hoekman. 1999. Incidence of contact lens-associated microbial keratitis and its related morbidity. *Lancet.* 354:181-185
- 40 Choi HK, JB Gaynor, KG White, C Lopez, CM Bosio, RR Karkhoff-Schweizer, HP Schweizer. 2005. A T-7 based broad-range bacterial cloning and expression vector. *Nature Methods.* 2:443-448
- 45 Chuanchuen, R, Narasaki, C.T. and Schweizer, H.P., Benchtop and microcentrifuge preparation of *Pseudomonas aeruginosa* competent cells, *BioTechniques* 33:760-763 (octubre de 2002).
- Coetzee HL, HC De Klerk, JN Coetzee, JA Smit. 1968. Bacteriophage-tail-like particles associated with intra-species killing of *Proteus vulgaris*. *J Gen Virol.* 2:29-36.
- 50 Cole N, MDP Willcox, SMJ Fleiszig. 1998. Different Strains Of *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated From Ocular Infections Or Inflammation Display Distinct Corneal Pathologies In An Animal Model. *Curr Eye Res.* 17:730-735
- Cooper RL, IJ Constable. 1977. Infective keratitis in soft contact lens wearers. *Br J Ophthalmol.* 61:250-254
- 55 Cowell BA, C Wu, SMJ Fleiszig. 1999, Use of an Animal Model in Studies of Bacterial Corneal Infection. *Inst Lab Animal Res J.* 40:43-50
- Desplats C, Krisch HM. The diversity and evolution of the T4-type bacteriophages. *Res Microbiol.* 2003 May;154(4):259-67.
- 60 Doulatov S, A Hodes, L Dai, N Mandhana, M Liu, R Deora, RWSimons, S Zimmerly, JF Miller. 2004. Tropism switching in *Bordetella* bacteriophage defines a family of diversity-generating retroelements. *Nature.* 431:476-481
- 65 Drickamer K. 1999. C-type lectin-like domains. *Current Opinion in Structural Biology.* 9:585-590 Farmer JJ, LG Herman. 1969.

- Dyke J, Berk R S. Growth inhibition and pyocin receptor properties of endotoxin from *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Soc Exp Biol Med. 1974;145:1405-1408.
- 5 Epidemiologic Fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* by the Production of and Sensitivity to Pyocin and Bacteriophage. Applied Microbiol. 18:760-765
- Filiatrault MJ, Munson RS Jr, y Campagnari AA. 2001. Genetic analysis of a pyocin-resistant lipooligosaccharide (LOS) mutant of *Haemophilus ducreyi*: restoration of full-length LOS restores pyocin sensitivity. J Bacteriol. 183(19):5756-61.
- 10 Fleiszig SMJ, DJ Evans. 2002. The pathogenesis of bacterial keratitis: studies with *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Exp Optom. 85.5:271-278
- 15 Gerke JR, MV Magliocco. 1971. Experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection of the mouse cornea. Infect Immun. 3:209 -216
- Gillor, O, LM Nigro, A. Riley. 2005. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. Curr. Pharm. Des. 11:1067-1075
- 20 Goodman *et al.* "A Signaling Network Reciprocally Regulates Genes Associated with Acute Infection and Chronic Persistence in *Pseudomonas aeruginosa*." Developmental Cell 7:745-754, 2004
- Govan, JRW & V Deretic. 1996. Microbial Pathogenesis in Cystic Fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*, Microbiological Reviews. 60:539-574
- 25 Haas H, Sacks T, Saltz N. Protective effect of pyocin against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. J Infect Dis. 1974 Apr;129(4):470-2.
- 30 Haggard-Ljungquist E, Halling C, Calendar R. NA sequences of the tail fiber genes of bacteriophage P2: evidence for horizontal transfer of tail fiber genes among unrelated bacteriophages. J Bacteriol. 1992 Mar; 174(5):1462-77.
- Hashemolhosseini S, Montag D, Kramer L, Henning U. Determinants of receptor specificity of coliphages of the T4 family. A chaperone alters the host range. J Mol Biol. 1994 Aug 26; 241(4):524-33.
- 35 Hazlett LD, D Rosen, RS Berk. 1976. Experimental eye infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Ophthalmic Res. 8:311-318
- He *et al.* "The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes." PNAS 101:2530-2535, 2004
- 40 Held H, SS Sidhu. 2004. Comprehensive Mutational Analysis of the M13 Major Coat Protein, J Mol Biol. 340:587-97
- Hensley S, B Wysocki. As Industry Profits Elsewhere, U.S. Lacks Vaccines, Antibiotics, The Wall Street Journal November 8, 2005: p A1
- 45 Higerd TB, CA Baechler, RS Berk. 1969. Morphological Studies On Relaxed and Contracted Forms of Purified Pyocin Particles. J. Bacteriology. 98:1378-89
- 50 Hoang, T.T., Karkhoff Schweizer, R.R., Kutchma, A.J. and Schweizer, H.P., A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants Gene 212 (1), 77-86 (1998)
- Hobden JA, DS Rootman, RJ O'Callaghan, JM Hill. 1988. Iontophoretic application of tobramycin to uninfected and *Pseudomonas aeruginosa*-infected rabbit corneas. Antimicrob Agents Chemother. 32:978-981
- 55 Holder IA. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* Bum Infections: Pathogenesis and Treatment,. In M Campa, M Bendinelli, and H Friedman (ed.) *Pseudomonas aeruginosa* as an Opportunistic Pathogen. Plenum Press, Nueva York, N.Y. págs. 275-295
- 60 Iijima M. 1978. Mode of Action of Pyocin R1. J. Biochem (Tokyo) 83:395-402
- Ishii S, Y Nishi, and F Egami. 1965. The fine structure of a pyocin. J. Mol. Biol. 13:428-431
- 65 Ito, S., Kagayama, M. and F. Egami. Isolation and characterization of pyocins from several strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Appl. Microbiol. 16 205-214 (1970).

- Jabrane A, Sabri A, Compere P, Jacques P, Vandenberghe I, Van Beeumen J, Thonart P. Characterization of serracin P, a phage-tail-like bacteriocin, and its activity against *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Nov; 68(11):5704-10.
- 5 Jacob F. 1954. Biosynthèse induite et mode d'action d'une pyocin, antibiotique de *Pseudomonas pyocyanea*. *Annals Inst. Pasteur.* 86:149-60
- Jacobs *et al.* "Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*." *PNAS* 100(24):14339-14344, 2003
- 10 Kageyama M, F Egami. 1962. On the purification and some properties of a pyocin, a bacteriocin produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Life Sciences* 9: 471-6
- 15 Kageyama M, K Ikeda, and F Egami. 1964. Studies of a pyocin. III. Biological properties of the pyocin. *J. Biochem.* 55:59-64.
- Kageyama M, Shimomiya T, Aihara Y, Kobayashi M. 1979. Characterization of a bacteriophage related to R-type pyocins. *J Virol.* 32:951-957.
- 20 Kageyama M. 1964. Studies of a pyocin I. Physical and chemical properties. *J. Biochem.* 55:49-53
- Kageyama, M. Bacteriocins and bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa*, in: *Microbial Drug Resistance*, University Park Press, Baltimore. pp 291-305 1975.
- 25 Kahn ML, RG Ziermann, DW Deho, M Ow, G Sunshine, R Calendar. 1991. Bacteriophage P2 and P4. *Methods Enzymol.* 204:264-280
- Kumazaki T, Y Shimizu, SI Ishii. 1982. Isolation and Characterization of Pyocin R1 Fibers. *J. Biochemistry.* 91:825-35
- 30 Lee EJ, DJ Evans and SMJ Fleiszig. 2003. Role of *Pseudomonas aeruginosa* ExsA in Penetration through Corneal Epithelium in a Novel in vivo Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 44:5220-5227
- 35 Lee FK, Dudas KC, Hanson JA, Nelson MB, LoVerde PT, Apicella MA. 1999 The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* C is a bacteriophage tail-like particle that contains single-stranded DNA. *Infect Immun.* 67(2):717-25.
- Liu M, M Gingery, SR. Doulatov, Y Liu, A Hodes, S Baker, P Davis, M Simmonds, C Churcher, K Mungall, MA Quail, A Preston, ET Harvill, DJ Maskell, FA Eiserling, J Parkhill, and JF Miller. 2004. Genomic and Genetic Analysis of *Bordetella* Bacteriophages Encoding Reverse Transcriptase-Mediated Tropism-Switching Cassettes. *J. Bacteriology.* 186 476-481
- 40 Mah-Sadorra JH, SG Yavuz, D M Najjar, PR Laibson, CJ Rapuano, EJ Cohen. 2005. Trends in contact lens-related corneal ulcers. *Cornea.* 24:51-58
- 45 Matsui H, Sano Y, Ishihara H, Shinomiya T. Regulation of pyocin genes in *Pseudomonas aeruginosa* by positive (prtN) and negative (prtR) regulatory genes. *J Bacteriol.* 1993 Mar; 175(5):1257-63.
- McMahon SA, JL Miller, JA Lawton, DE Kerkow, A Hodes, MA Marti-Renom, S Doulatov, E Narayanan, A Sali, JF Miller, P Ghosh. 2005. The C-type Lectin Fold as an Evolutionary Solution for Massive Sequence Variation. *Nature Struct. & Molecular Biol.* 12:886 – 892
- 50 McNamara NA, KA Polse, SA Fukunaga, JS Maebori, RM Suzuki. 1998. Soft lens extended wear affects epithelial barrier function. *Ophthalmology.* 105:2330-2335
- 55 Meadow, P.M., and Wells P.L. Receptor sites for R-type pyocins and bacteriophage E79 in the core part of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* PAC1. *J. Gen. Microbiol.* 108:339-343. 1978
- Merrickin DJ, Terry CS. Use of pyocin 78-C2 in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Appl Microbiol.* 1972 Jan; 23(1):164-5.
- 60 Michel-Briand, Y., y Baysse, C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie.* 2002 May-Jun; 84(5-6):499-510.
- 65 *Microbial Threats To Health: Emergence, Detection, And Response*, March 2003 Institute of Medicine, Washington, DC

- Mitchell *et al.* "Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients." *Nature Structural Biology* 9:918-921, 2002
- 5 Morse SA, Jones BV, and Lysko PG. 1980. Pyocin inhibition of *Neisseria gonorrhoeae*: mechanism of action. *Antimicrob Agents Chemother.* 18(3):416-23.
- Morse SA, Vaughan P, Johnson D, and Iglewski BH. 1976. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by a bacteriocin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 10(2):354-62.
- 10 Mosig G and F Eiserling. 2006. T4 and Related Phages: Structure and Development, in *The Bacteriophages. Calendar*, R. ed. Second edition, Oxford University Press, NY, NY. págs. 225-267
- Nakayama K, Kanaya S, Ohnishi M, Terawaki Y, Hayashi T. The complete nucleotide sequence of phi CTX, a cytotoxin-converting phage of *Pseudomonas aeruginosa*: implications for phage evolution and horizontal gene transfer via bacteriophages. *Mol Microbiol.* 1999 Jan;31(2):399-419.
- 15 Nakayama K, Takashima K, Ishihara H, Shinomiya T, Kageyama M, Kanaya S, Ohnishi M, Murata T, Mori H, Hayashi T. The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Mol Microbiol.* 2000 Oct; 38(2):213-31.
- 20 Papanikolopoulou K, V Forge, P Goeltz, y A Mitraki. 2004. Formation of Highly Stable Chimeric Trimers by Fusion of an Adenovirus Fiber Shaft Fragment with the Foldon Domain of Bacteriophage T4 Fibrin. *Journal of Biological Chemistry.* 279: 8991-8998
- 25 Preston MI, SML Fleiszig, TS Zaidi, JB Goldberg, VD Shortridge, M1 Vasil, GB Pier. 1995. Rapid and Sensitive Method for Evaluating *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors during Corneal Infections in Mice. *Infection and Immunity.* 63:3497-3501
- 30 Qu Y, Hyman P, Harrah T, Goldberg E. In vivo bypass of chaperone by extended coiled-coil motif in T4 tail fiber. *J Bacteriol.* 2004 Dec; 186(24):8363-9.
- Ramphal R, MT McNiece, FM Polack. 1981. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to the injured cornea: a step in the pathogenesis of corneal infections. *Ann. Ophthalmol.* 13:421-425
- 35 Rich, *et al.* "ACE is a collagen binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*." *J. Biol. Chem.* 274:26939-26945, 1999
- Riley MA, JE Wertz. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:117-137
- 40 Roland PS, DW Stroman. 2002. Microbiology of Acute Otitis Externa. *Laryngoscope.* 112:1166-1177
- Rudner *et al.* "A family of membrane-embedded metalloproteases involved in regulated proteolysis of membrane-associated transcription factors." *PNAS* 96(26):14765-14770, 1999
- 45 Schweizer HP. 2001. Vectors to express foreign genes and techniques to monitor gene expression in *Pseudomonads*. *Current Opinion in Biotechnology.* 12:439-445
- Schweizer, H.P., Klassen,T. and Hoang,T., Improved methods for gene analysis and expression in *Pseudomonas*, Unpublished
- 50 Shimizu Y, T Kamazaki, SI Ishii. 1982. Specific Cleavage at Fibers of a Bacteriophage-Tail-Like Bacteriocin, Pyocin R1 by Successive Treatment with Organomercurial Compounds and Trypsin. *J Virology* 44:692-695
- Shinomiya T & S Ina. 1989. Genetic Comparison of Bacteriophage PS 17 and *Pseudomonas aeruginosa* R-Type Pyocin. *J. Bacteriology* 171:2287-2292
- 55 Shinomiya T, S Shiga, A Kikuchi, M Kageyama. 1983b. Genetic determinant of pyocin R2 in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. II. Physical characterization of pyocin R2 genes using R-prime plasmids constructed from R68.45. *Mol Gen Genet.* 189:382-389
- 60 Shinomiya T, S Shiga, M Kageyama. 1983a. Genetic determinant of pyocin R2 in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. I. Localization of the pyocin R2 gene cluster between the *trpCD* and *trpE* genes. *Mol Gen Genet.* 189:375-38
- 65 Shinomiya T, S Shiga. 1979. Bactericidal Activity of the Tail of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophage PS17. *J of Virology* 32:958-967

- Shinomiya T. 1984. Phenotypic Mixing of Pyocin R2 and Bacteriophage PS17 in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Virology*. 49:310-314
- 5 Sreedhar *et al.* "Enterococcus faecalis Adhesin, ACE, Mediates Attachment to Extracellular Matrix Proteins Collagen Type IV and Laminin as well as Collagen Type I." *Infect. Immun.* 68(9):5218-5224, 2000
- Strauch E, Kaspar H, Schaudinn C, Dersch P, Madela K, Gewinner C, Hertwig S, Wecke J, Appel B. Characterization of enterocolitacin, a phage tail-like bacteriocin, and its effect on pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Dec; 67(12):5634-42.
- 10 Takeya K, Y Minamishima, Y Ohnishi, K Amako. 1969. Rod-shaped pyocin28, *J. Gen. Virol.* 4:145-149
- Talbot GH, J Bradley, JE Edwards, D Gilbert, M Scheld, JG Bartlett. 2006. Bad Bugs Need Drugs: An Update on the Development Pipeline from the Antimicrobial Availability. *Clin Infect. Dis.* 42:657-668
- 15 Tamber *et al.* *J. Bact.* 188(1):45-54, 2006
- Tetart F, C Desplats, M Kutateladze, C Monod, H-W Ackermann, HM Kirsch. 2001. Phylogeny of the Major Head and tail genes of the Wide-Ranging T4-Type Bacteriophages. *J Bacteriology* 183:358-366
- 20 Tetart F, Desplats C, Krisch HM. Genome plasticity in the distal tail fiber locus of the T-even bacteriophage: recombination between conserved motifs swaps adhesin specificity. *J Mol Biol.* 1998 Sep 25; 282(3):543-56.
- Thompson NE, PA Pattee. 1981. Genetic transformation in *Staphylococcus aureus*: demonstration of a competence-conferring factor of bacteriophage origin in bacteriophage 80a lysates. *J. Bacteriol.* 148:294-300
- 25 Twining SS, X Zhou, DP Shulte, PM Wilson, B Fish, J Moulder. 1996. Effect of vitamin A deficiency on the early response to experimental *Pseudomonas keratitis*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37:511-522
- 30 Uratani, Y., and Hoshino, T. Pyocin R1 inhibits active transport in *Pseudomonas aeruginosa* and depolarizes membrane potential. *J Bacteriol.* 1984 Feb; 157(2):632-6.
- van Horn DL, SD Davis, RA Hyndiuk, TVP Alpren. 1978. Pathogenesis of experimental *Pseudomonas keratitis* in the guinea pig: bacteriologic, clinical, and microscopic observations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 17:1076-1086
- 35 van Raaij MJ, A Mitraki, G Lavigne, S Cusack. 1999. A triple β -spiral in the adenovirus fibre shaft reveals a new structural motif for a fibrous protein. *Nature.* 401:935-38.
- van Raaij MJ, G Schoehn, MR Burda, S Miller. 2001. Crystal Structure of a Heat and Protease-stable Part of the Bacteriophage T4 Short Tail Fibre. *J. Mol. Biol.* 314:1137-1146
- 40 Weigele PR, E Scanlon, and J King. 2003. Homotrimeric, β -Stranded Viral Adhesins and Tail Proteins. *J of Bacteriology.* 185:4022-4030
- 45 Wenzel RP. 2004. The Antibiotic Pipeline - Challenges, Costs, and Values *New Engl J Med.* 351:523-526
- West SHE, HP Schweizer, AK Sample, LJ Runyen-Janecky. 1994. Construction of Improved *Escherichia-Pseudomonas* Shuttle Vectors Derived from pUC18/19 and Sequence of the Region Required for Their Replication in *Pseudomonas aeruginosa* Gene 128:81-86
- 50 Wong *et al.* "Insertion Mutagenesis and Membrane Topology Model of the *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Protein OprM." *J. Bacteriol.* 182(9):2402-2410, 2000
- Yoichi M, M Abe, K Miyanaga, H Unno, Y Tanji. 2005. Alteration of tail fiber protein gp38 enables T2 phage to infect *Escherichia coli* 0157:H7. *J. Biotech.* 115:101-107
- 55 Young, Ry, "Phage Lysis" in *Phages*, Waldor, Friedman and Adhya, eds. ASM Press, Washington, DC, p95, 2006
- Ziermann R, R Calendar. 1991. Characterization of the cos site of bacteriophages P2 and P4. *Gene.* 96:9-15
- 60 Zink R, MJ Loessner and S Scherer. 1995. Characterization of cryptic prophages (monocins) in *Listeria* and sequence analysis of a holin/endolysin gene. *Microbiology.* 141:2577-2584
- Zolfaghar *et al.* "Mutation of retS, encoding a putative hybrid two-component regulatory protein in *Pseudomonas aeruginosa*, attenuates multiple virulence mechanisms." *Microbes Infect.* Jul 15, 2005 Epub ahead of print
- 65

Tal como se usa en el presente documento, los términos “un”, “una” y “cualquiera” pretenden incluir cada uno tanto las formas singulares como plurales.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína de fibras de la cola de bacteriocina de alto peso molecular (apm), en la que dicha proteína de fibras de la cola comprende una región de unión a la placa basal (BPAR) de una piocina de tipo R y un dominio de unión al receptor heterólogo (RBD), en la que el RBD es de una fibra de la cola de otra bacteriocina o una fibra de la cola de un bacteriófago o profago, en la que la BPAR consiste en los aminoácidos 1-164 ó 1-240 de la fibra de la cola de piocina de tipo R.
- 10 2. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, en la que dicho RBD de una proteína de fibras de la cola de bacteriófago comprende desde 347 aminoácidos de longitud hasta 755 aminoácidos de longitud, incluyendo el extremo C-terminal de dicha proteína.
- 15 3. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, que comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica para una chaperona relacionada de la proteína de fibras de la cola.
- 20 4. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, en la que el RBD expresado se une a un factor de virulencia o adaptación en una superficie de una célula bacteriana.
5. Bacteriocina de apm que comprende una proteína de fibras de la cola codificada por una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 25 6. Bacteriocina según la reivindicación 5, en la que la fibra de la cola de piocina de tipo R comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 ó 9.
7. Bacteriocina según la reivindicación 5, en la que dicho RBD se une a un factor de virulencia o adaptación bacteriano.
- 30 8. Célula bacteriana transfectada o transformada con, o que contiene, una molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
9. Célula bacteriana según la reivindicación 8, en la que una chaperona relacionada de la proteína de fibras de la cola se expresa en la célula.
- 35 10. Método de producción de una bacteriocina de apm, comprendiendo dicho método cultivar la célula bacteriana según la reivindicación 9 en condiciones que dan como resultado la producción de la bacteriocina.
- 40 11. Método para comprometer la integridad de una membrana citoplasmática de una célula bacteriana, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha bacteria con la bacteriocina según la reivindicación 5.
12. Bacteriocina según la reivindicación 5, para su uso en un método para comprometer la integridad de una membrana citoplasmática de una célula bacteriana en un sujeto.
- 45 13. Método de formación de una progenie de bacterias no virulentas o no adaptadas a partir de bacterias progenitoras virulentas, comprendiendo dicho método poner en contacto bacterias virulentas con una bacteriocina según la reivindicación 7, en el que la bacteriocina se une a un factor de virulencia o adaptación de dichas bacterias progenitoras virulentas, y seleccionar la progenie de bacterias no virulentas que ya no expresan el factor de virulencia o adaptación.

Piocina de tipo R

A)



B)

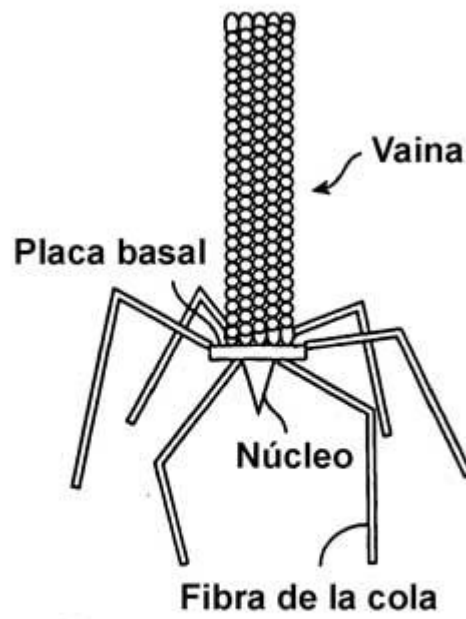


FIG. 1

Ensayos de dilución en serie de puntos

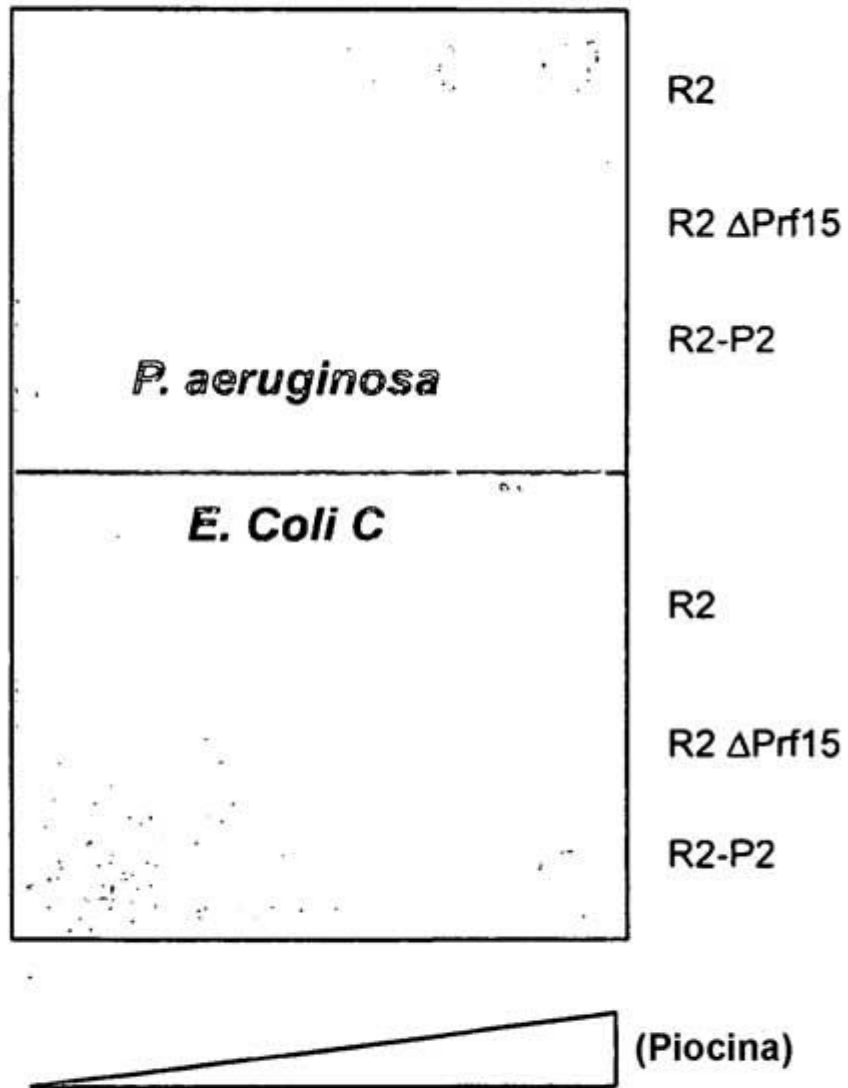


FIG. 2

Fusiones R2-P2 múltiples y sus actividades bactericidas

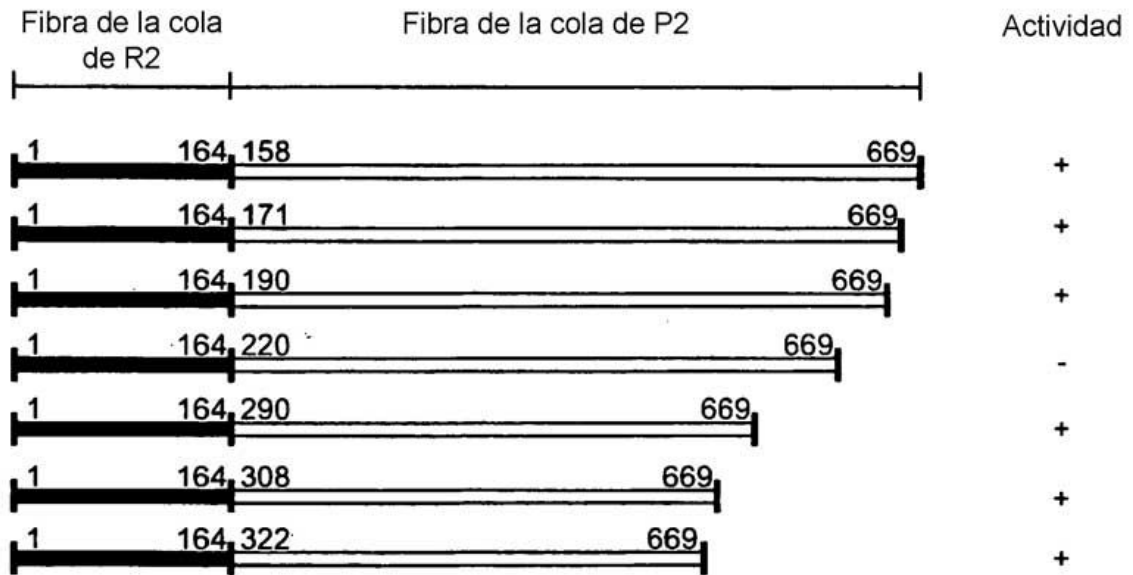


FIG. 4

Diversas partes del extremo N-terminal de la fibra de la cola de R2 (BPAR) fusionadas a la parte C-terminal 158-669 (RBD) de la fibra de la cola de P2

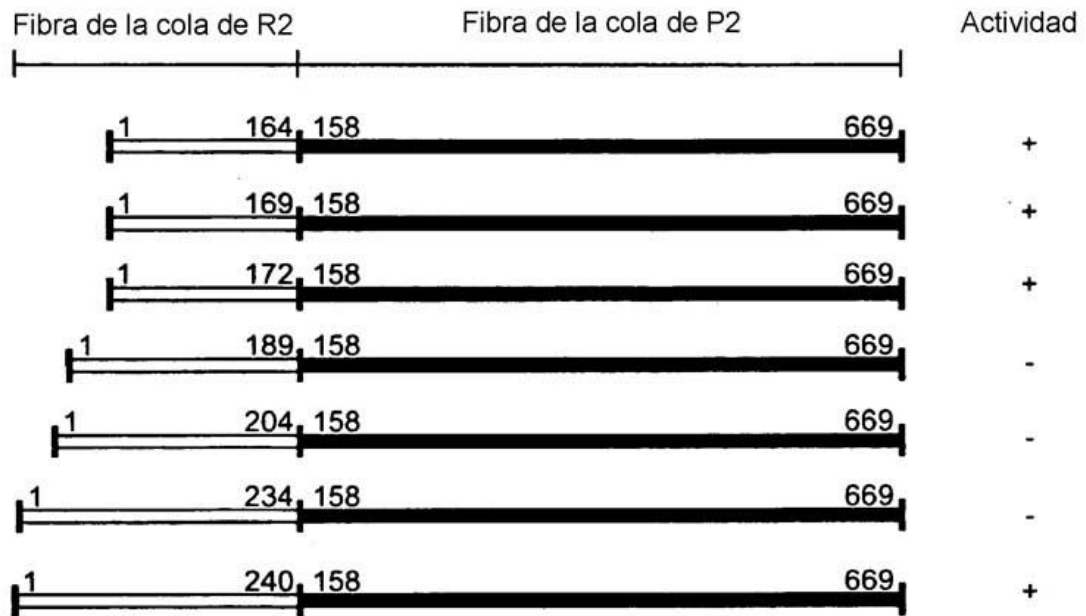


FIG. 5

Fusiones R2-P2 múltiples y sus actividades bactericidas

Fibra de la cola de R2		Fibra de la cola de P2		Actividad
1	240	158	669	+
1	240	171	669	-
1	240	190	669	-
1	240	203	669	-
1	240	220	669	-
1	240	254	669	+/-
1	240	290	669	-
1	240	308	669	-
1	240	322	669	+

FIG. 6

Diversas partes del extremo N-terminal de la fibra de la cola de R2 (BPAR) fusionadas a la parte C-terminal 322-669 (RBD) de la fibra de la cola de P2

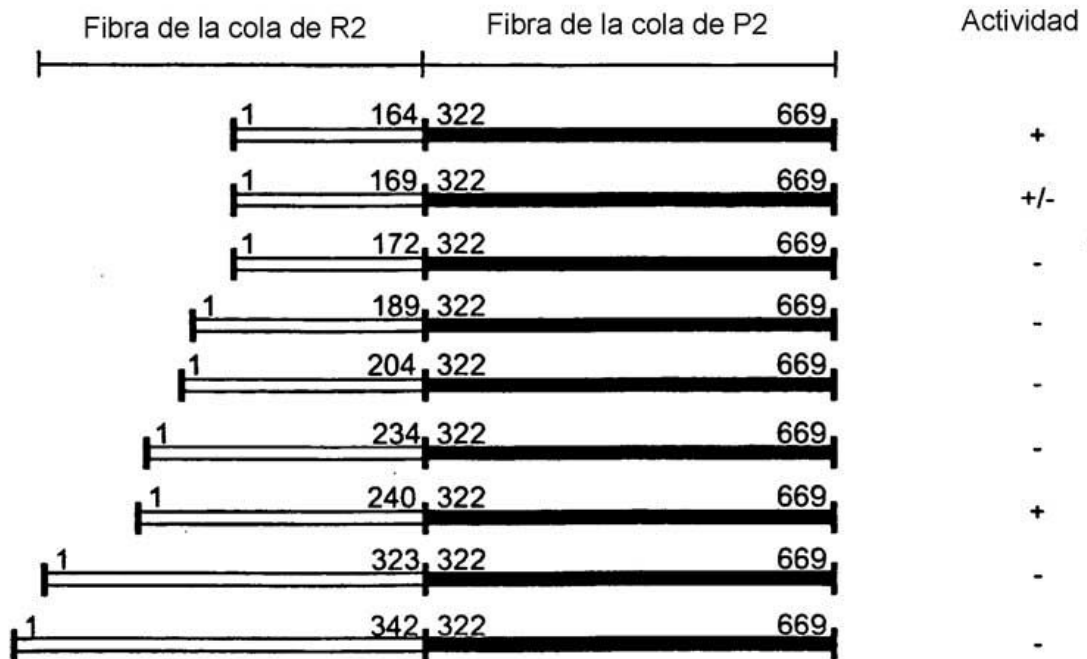


FIG. 7

Complementación *trans* de la estructura de la pioquina R2 de PA01 $\Delta prf15$ con diversas fibras de la cola de pioquinas de tipo R, fusiones de fibras de la cola y chaperonas

Fibra de la cola (Prf15)	Actividad bactericida	Actividad bactericida	Actividad bactericida	% de identidad de secuencia de PRF15 con respecto a PRF15 de R2	% de identidad de secuencia de los aa 1-429	% de identidad de secuencia de los aa 430-extremo	% de identidad de secuencia de Prf16 con respecto a Prf16 de R2
R1	+	+++	+++	82	99	52	32
R2	++	+++	+++	100	100	100	100
R3	++	+++	+++	99	99	98	98
R4	++	+++	+++	98	99	99	99
R5	-	+++	+++	83	97	58	35
R2-P2	-	+++ (P2)	+++	14	na	na	6
R2-L413c	-	+++ (413)	+++	19	na	na	6

FIG. 8

Vector de expresión de fibras de la cola de piocinas y chaperonas

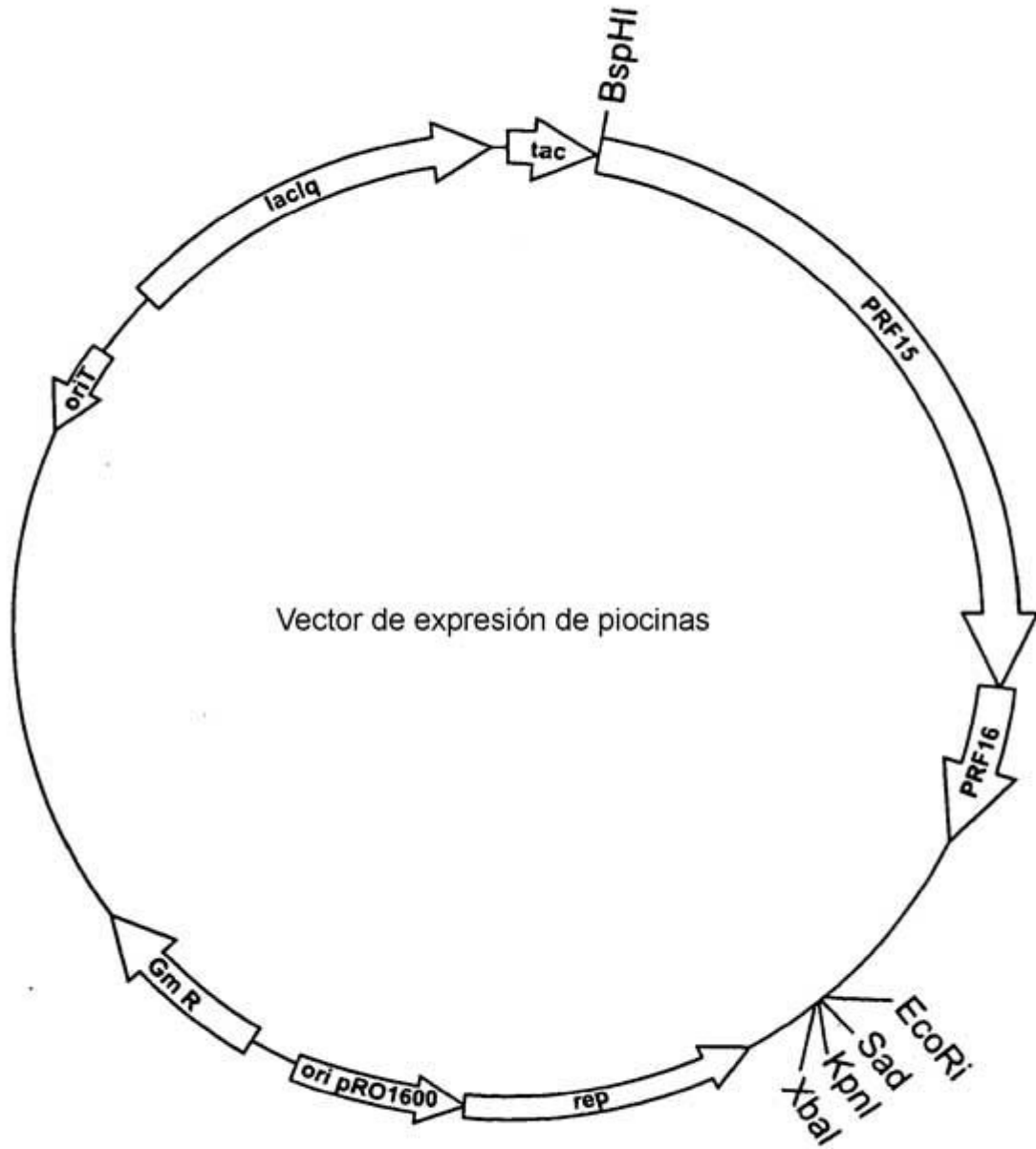


FIG. 9

Construcción de fibra de la cola de piocina
especifica de *Yersinia pestis*

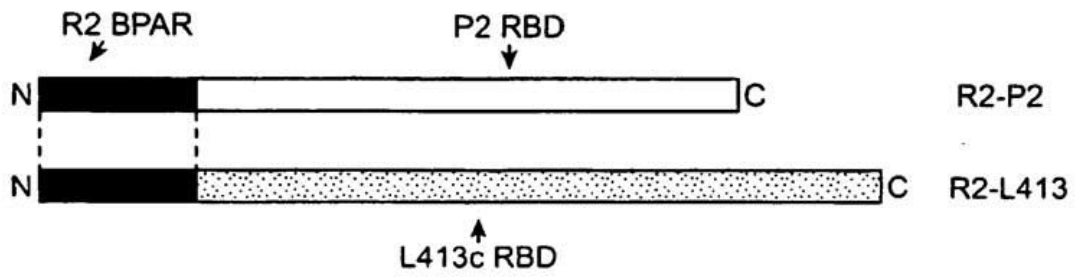


FIG. 10

LISTAS DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 >prf15 de R1
 MTTNTPKYGGLLTDIGAAALAAASAAGKKWQPTHMLIGDAGGAPGDTPDPLPSAAQKSLI
 NQRHRAQLNRLFVSDKNANTLVAEVVLPVEVGGFWIREIGLQDADGKFFVAVSNCPPSYKA
 AMESGSARTQTIRVNIALSGLENVQLLIDNGI IYATQDWVKEKVAADFKGRKILAGNGLV
 GGGDLSADRSIGLAPSGVTAGSYRSVTVNANGVVTQGSNPTTLAGYAI GDAYTKADTDGK
 LAQKANKATTLAGYGITDALRVDGNAVSSSRLAAPRSLAASGDASWSVTFDGSANVSAPL
 SLSATGVAAGSYPKVTVDTKGRVTAGMALAATDI PGLDASKLVSGVLAEQRLPVFARGLA
 TAVSNSSDPNTATVPLMLTNHANGPVAGRYFYIQSMFYPDQNGNASQIATSYNATSEMYV
 RVSYAANPSIREWLPWQRCDIGGSFTKTTDGSIGNGVNINSFVNSGWLQSTSEWAAGGA
 NYPVGLAGLLIVYRAHADHIYQTYVTLNGSTYSRCCYAGSWRPWRQNWDDGNFDPASYLP
 KAGFTWAALPGKPATFPSPGHNDTSQITSGILPLARGGLGANTAAAGARNNIGAGVPATA
 SRALNGWWDNDTGLIVQWQVNVGDHPGGI IDRTLTFPIAFPSACLHVVPVKEVGRPA
 TSASTVTADVSVSNTGCVIVSSEYYGLAQN YGIRVMAIGY

SEQ ID NO: 2 >prf16 de R1
 MIFFHAATGGFYKSKEIHGSRMPLEDEMHPLEDAEYQALLRAQSEGKRI VTDHTGRPICVD
 PPAPAKDILVQRERIWDRQLQLTDGPLARHRDEQDLGKTTTLSQEQLRELTLYRAVLRD
 WPAAEF PDLNARPEPPAWLQSLITP

SEQ ID NO: 3 >prf15 de R2
 MATNTPKYGGLLTDIGAAALATASAAGKKWQPTHMLIGDAGGAPGDTPDPLPSAAQKSLI
 NQRHRAQLNRLFVSDKNANTLVAEVVLPVEVGGFWIREIGLQDADGKFFVAVSNCPPSYKA
 AMESGSARTQTIRVNIALSGLENVQLLIDNGI IYATQDWVKEKVAADFKGRKILAGNGLL
 GGGDLSADRSIGLAPSGVTAGSYRSVTVNANGVVTQGSNPTTLAGYAI GDAYTKADTDGK
 LAQKANKATTLAGYGITDALRVDGNAVSSSRLAAPRSLAASGDASWSVTFDGSANVSAPL
 SLSATGVAAGSYPKVTVDTKGRVTAGMALAATDI PGLDASKLVSGVLAEQRLPVFARGLA
 TAVSNSSDPNTATVPLMLTNHANGPVAGRYFYIQSMFYPDQNGNASQIATSYNATSEMYV
 RVSYAANPSIREWLPWQRCDIGGSFTKEADGELPGGVNLD SMVTSGWWSQSFTAQAASGA
 NYPVIRAGLLHVYAASSNF IYQTYQAYDGESFYFRCRHSNTWFPWRRMWHGGDFNPSDYL
 LKSGFYWNALPGKPATFPSPAHNHDVGLTSGILPLARGGVGSNTAAGARSTIGAGVPAT
 ASLGASGWWRDNDTGLIRQWQVTCPADADASITFPI PFPTLCLGGYANQTSAPHPGTA
 STGFRGATTTTAVIRNGYFAQAVLSWEAFGR

SEQ ID NO: 4 >PRF16 de R2
 MKGEYFSPSQVAFYPASLREVYEYAGCWPVDGEVWSAELHEQLMNEQAAGRAI SSDVNG
 NPVAIERPPLSRQQRSTHERRWRDSQLLATDGLVVRHRDQLETGKETTL LVPQYHELMSY
 RASLRDWPEEPLFPDSGGRPSVPDWLRRYVTP

SEQ ID NO: 5 >prf15 de R3
 MTTNTPKYGGLLTDIGAAALAAASAAGKKWQPTHMLIGDAGGAPGDTLDPLPSAAQKSLI
 NQRHRAQLNRLFVSDKNANTLVAEVVLPVEVGGFWIREIGLQDADGKFFVAVSNCPPSYKA
 AMESGSARTQTIRVNIALSGLENVQLLIDNGI IYATQDWVKEKVAADFKGRKILAGNGLL
 GGGDLSADRSIGLAPSGVTAGSYRSVTVNANGVVTQGSNPTTLAGYAI GDAYTKADTDGK
 LAQKANKATTLAGYGITDALRVDGNAVSSSRLAAPRSLAASGDASWSVTFDGSANVSAPL
 SLSATGVAAGSYPKVTVDTKGRVXAGMALAATDI PGLDASKLVSGVLAEQRLPVFARGLA
 TAVSNSSDPNTATVPLMLTNHANGPVAGRYFYIQSMFYPDQNGNASQIATSYNATSEMYV
 RVSYAANPSIREWLPWQRCDIGGSFTKEADGELPGGVNLD SMVTSGWWSQSFTAQAASGA
 NYPVIRAGLLHVYAASSNF IYQTYQAYDGESFYFRCRYSNWLPWRRMWHGGDFNPSDYL
 LKSGFYWNALPGKPATFPSPAHNHDVGLTSGILPLARGGVGSNTAAGARSTIGAGVPAT
 ASLGASGWWRDNDTGLIRQWQVTCPADADASITFPI PFPTLCLGGYANQTSAPFPQPTDA
 STGFRGATTTTAVIRNGYFAQAVLSWEAFGR

FIG. 11A

SEQ ID NO: 6 >prf 16 de R3
 MKGEYFSPSPQVAFYPASLREVYEHAGCWPVDGEWVSAELHEQLMNEQAAGRAISSDVNG
 NPVAIERPPLSRQQRSTHERRWRDSQLLATDGLVVRHRDQLETGKETLLPVQYHELMYSY
 RASLRDWPEEPLFPDSSGGRPSVPDWLRRYVTP

SEQ ID NO: 7 >prf15 de R4
 MTTNTPKYGGLLTDIGAAALAAASAAGKKWQPTHMLIGDAGGAPGDTDPDPLPSAAQKSLI
 NQRHRAQLNRLFVSDKNANTLVAEVVLPVEVGGFWIREIGLQDADGKFVAVSNCPPSYKA
 AMESGSARTQTIRVNIALSGLENVQLLIDNGIYATQDWWKEKVAADFKGRKILAGNGLV
 GGGDLSADRSIGLAPSGVTAGSYRSVTVNANGVVVQGSNPTTLAGYAIQDAYTKADTDGK
 LAQKANKATTLAGYGITDALRVDGNAVSSRLAAPRSLAASGDASWSVTFDGSANVSAPL
 SLSATGVAAGSYPKVTVDTKGRVTAGMALAATDI PGLDASKLVSGVLAEQRLPVFARGLA
 TAVSNSSDPNTATVPLMLTNHANGPVAGRYFYIQSMFYPDQNGNASQIATSYNATSEMYV
 RVSYAANPSIREWLPWQRCDIGGSFTKEADGELPGGVNLDMSVTSGWWSQSFTAAQATGA
 NYPPIVRAGLLHVYAASSNFYQTYQAYDGESFYFRCHRSTWFPWRRMWHGGDFNPSDYL
 LKSGFYWNALPGKPATFPPSAHNHDVQQLTSGILPLARGGVGSNTAAGARSTIGAGVPAT
 ASLGASGWWRDNDTGLIRQWQVTCPADADASITFPIPFPTLCLGGYANQTSAFHPGTD
 A STGFRGATTTTAVIRNGYFAQAVLSWEAFGR

SEQ ID NO: 8 >prf16 de R4
 MKGEYFSPSPQVAFYPXSLREVYEYAGCWPVDGEWVSAELHEQLMNEQAAGRAISSDVNG
 NPVAIERPPLSRQQRSAHERRWRDSQLLATDGLVVRHRDQLETGKETLLPVQYHELMYSY
 RASLRDWPEEPLFPDSSGGRPSVPDWLRRYVTP

SEQ ID NO: 9 >prf15 de R5
 MTTNTPKYGGLLTDIGAAALAAASAAGKKWQPTHMLIGDAGGAPGATPDPI PAATQTKLI
 NQRYRAQLNRLFVSDKNINTLVAEVVLPVEVGGFWIREIGLQDADGKFVAVSNCPPSYKA
 AMESGSARTQTIRVNIALSGLENVQLLIDNGIYATQDWWKEKVAADFKGRKILAGNGLV
 GGGDLSADRSIGLAPSGVTAGSYRSVTVNANGVVVQGSNPTTLAGYAIQDAYTKADTDGK
 LAQKANKATTLAGYGITDALRVDGNAVSSRLAAPRSLAASGDASWSVTFDGSANVSAPL
 SLSATGVAAGSYPKVTVDTKGRVTAGMALAATDI PGLDASKLVSGVLAEQRLPVFARGLA
 TAVSTSDPNTATVPLMLTNHANGPVAGRYFYIQSMFYPDQNGNASQIATSYNATSEMYV
 RVSYAANPSARDWLPWKRCDIGGSFSKEADGALGGAVNLNSLITSGWYQNTANAQAESGA
 NYPVPRAGLLQVHNAGTNFYQTYQVYDGEQFYFRCRYTNTWYFWRRVWHGADFNPNNDYL
 LKSGFTWAALPGKPATFPPTGHNHDAQAITSGLPLARGGLGSNTAAGARNNIGAGVPAT
 ANRSLNGWWDNDTGLIVQWMTVSVGDHPGGIVNRSLTFPIAFPTTCLHVVPVSKELGRP
 ATSASTVTLADVSVSTTGCVIVATEYHGAVQNYAIRLVAIGC

SEQ ID NO: 10 >prf16 de R5
 MIFPHAATGGFYSKDVHGRMPIDARMYPLEEAEYLALLVAQSEGKQIVADAAGRPFCD
 PPAPAEVLAHRERIWRDRQLTLDGPIARHRDELDLGKITTLNQAQLELTLYRASLRD
 WPASAAFPDLGARPEPPLWLEPLITP

SEQ ID NO: 11 > OprM
 MKRSFLSLAVAAVVLSGCSLIPDYQRPEAPVAAAYPQGQAYGQNTGAAA VPAADIGWREF
 FRDPQLQLIGVALENRDLRVAALNVEAFRAQYRIQRADLFPRIGVDGSGTRQRLPGDL
 STTGSPAISSQYGVTLGTTAWELDLFGRLRSLRDOALEQYLAQEAQSAQTTLVASVAT
 AYLLTKADQAQLQTLTKDTLGTQYQKSFDLTQRSYDVGVASALDLRQAQTAVEGARATLAQY
 TRLVAQDQNALVLLGSGIPANLPQGLGLDQTLLEVPAGLPSDLLQRRPDILEAEHQLM
 AANASIGAARAAFFPSISLTANAGTMSRQLSGLFDAGSGSWLFQPSINLPIFTAGSLRAS
 LDYAKIQKDINVAQYKAIQTAFQEVADGLAARGTFTEQLQAQRDLVKASDEYYQLADKR
 YRTGVDNYLTLDDAQRSLFTAQQQLITDRLNQLTSEVNLYKALGGGWNQQTVTQQQTAKK
 EDPQA

FIG. 11B

SEQ ID NO:12 > OprJ
 MRKPAFGVSALLIALTLGACSMAPTYERPAAPVADSWSGAAAQRQGAAIDTLDWKSFIVD
 AELRRLVDMALDNNRSLRQTLDDIEAARAQYRIQRADRVPLNAAATGNRQRQPADLSAG
 NRSEVASSYQVGLALPEYELDLFGRVKS LTDAALQQYLASEEAAAARIALVAEVSQAYL
 SYDGLRRLALTRQTLVSRYSFALIDQRRAGAATADYQEAALGLVEQARAEQERNLRQ
 KQAFNALVLLLGSDDAQAIPRSPGQRPKLLQDIAPGTPSELIERRPDI LAEHRRLRAR
 NADIGAAAAFFPRI SLTGSFGTSSAEMSGLFDGGSRSWSFLPTLTLPIFDGGRNRANLS
 LAEARKDSAVAA YEGTIQTAFREVADALAASDTLRREEKALRALANSNEALKLAKARYE
 SGVDNHLRYLDAQRSSFLNEIAFIDGSTQRQIALVDLFRALGGGWDEGRSLVVRHGGRS

SEQ ID NO:13 > OprN
 MIHAQSIRSGLASALGLFSLALSACTVGPDYRTPDTAAAKIDATASKPYDRSRFESLWV
 KQFDDPTLNQLVEQSLSGNRDLRVA FARLRAARALRDDVANDRFPVVTSRASADIGKQQ
 PGVTEDRVNSERYDLGLDSAWELDLFGRIRRRQLESSDALSEAAEADLQQLQVSLIAELVD
 AYGQLRGAQLREKIALSNLENQKESRQLTEQLRDAGVGAELDVLRADARLAATAASVPQL
 QAEARARHRIATLLGQRPEELTVDLSPRDLPAITKALPIGDPGELLRRRPNIRAAERRV
 AASTADVGVATADLFPAGQPQRLPRLHRRAGSQIGSSAARAWSVGPSISWAAF DLG SVRA
 RLRGAKADADAALASYEQVLLALEESANAFSDYGKRQERLVSLVRQSEASRAAAQQAII
 RYREGTTDFVLVLLDAEREQLSAEDAQAQAEVELYRGI VAIYRSLGGGWQPSA

SEQ ID NO:14 > AprF
 MRRLMTWLFGAFLLLLREDAFALGLLDGYHLALENDPQFQAIIQEHEAGRQYRALGRAAL
 LPRLVYSYNRGRSWSVDVTQTTRGDFKEDRDYDSYVSTLSLQQLPFDYEA FSRYRKGVAQ
 ALLSDERFRSQSQELLVVRVLEAYTGALLAQDQIELARAQKRSYREQFQLNQRQFERGNGT
 RTDTLETQARFNLAQAQEI EARDSQDAALRELERLVGAPLEIADLAPLGERFQVRPLSPA
 SYTAWRDALALAENPELASLRHAVDVARYEVEQNRADFLPRLGLYASTGKSKSGSENTYNQ
 RYETDSVGIQLSVPLFSGGETLAATRQATHRMEKSHYDLDDKVRETLNQRKMYNQSSSS
 AAKIRAYEMTVDSARTLVMATRKSIAAGVRVNLDDLNAEQALYSAMNELSKAKYDYLTAW
 ARLRFYAGVLDEADLELVAANFVSGETPARRRDCATTDCPAPLHLSKTDTEENRSALN

SEQ ID NO:15 > OpmM
 MNRLRACLSSALLSASSAQALGLLDAYQLAVRHDPTFQAALHERRAGSENRAIGRAGLL
 PSLRYDYNKARNSTVSGQDARVERDYRSYASTLSLEQPLFDYEA YARYRQGEAQALFAD
 EQFRGRSQELAVRLF AAYSETLFAREQVVLAEARRALETQLAFNQRAFEEGEGRTRTDLL
 ETRARLSLTRAEE IAASDRAAAARRTLEAMLGQALEDRELAAPIERFPALRLQPATFEGW
 RQVALQRSaelgaQRHALEAAAYEVERNRAGHLPRLSLYASSSKTHSASESTYEQKYD TD
 SVGLRLSLPLFEGGRVSAATRQAGDKYAQAQAE LDAQVASVINDLHSQFDLTASSLAKVR
 AYEMAVAAAAREQVTATRRSVAGGERVNRDVLDAEQQFYGARRDLAEARYAYLNAWLRLRQ
 LAGVLEDDRDLAVLAA YFGAGEGRAQVTAIR

SEQ ID NO:16 > OpmA
 MKGTPLLLIASLALGACSLGPDFTRPDRPAPGEWSLQAAAAGNPSHLAAAPLAAQWWTFLD
 DAQLNALLQVRQANLDRSAAARLQQSRAIRRS LGGDALPSVDASGNYQRQRTTSAGLF
 DPSGKAGKGNYNHALAGFDASWELDFWGRVRRLEAADATVEASENELRDVQVSVLAEAA
 RDYIQLRGEQNRAAI IRDNLETARRSLELTRRLANGVATDLEVAQALAQVASM EARLPE
 VEKNQAHLVNALGYLVGASPGSLLAELGPARAI PRPPGSVPVGLPSELAQRRPDIRRAEA
 RLHAATASIGVAKADFYPRITLNGNFGFESLQLSSLGWDHRRQFAIGPAFSLPIFEGGRL
 RGRLELREAQQQEAIDYQRTVLRWQEVDDAMHDYAAANQRRQERLGEAVAQNRRLQSA
 REQYRAGAVDFLSVLDSQRQLLDNQEQQVASDEAVSLTLVNLYKALGGGWSPTSDPASG

SEQ ID NO:17 > OpmD
 MKRSYPNLSRLALALAVGTGLAACSVGPDYQRQSPPPRVASEHLGEFSGERREAPWWSF
 FDDPQLVRLVDQALARNHDI REARANLRSARALFDDRWDQLPQVTSQAGYSRSIEQQLD
 YDGEPRRRLAESYRAGFDAQWEIDLFGRLGRLSDAALARAEAADLRLVRLSIAADTAR
 AYFEIQGYQRRLDVARAQVRSWRDTLELTRSSLQLGSGLPEDVENAQANLLRSEAAIPPL
 TTALESARYRLDVL RGEAPGSGAPI LDGGAAPLAKNPLGDDVDRLILQRPDVVSAERQL
 AASTEDVGAATAELYPRDLGGF IGFFALRSGLDGSASRAFELAPSVSWPAPFR LGNVRRAR
 LRAVEAQSDAALARYQRSLLLAQEDVGNALNQLAEHQRRRLVALFQSATHGANALEIANER
 YRAGAGSYLAVLENQRALYQIREELAQAETASFVNVI ALYKALGWGSGDLAPGAGQLAAG
 ETAGANR

FIG. 11C

SEQ ID NO:18 > OpmE
 MKPYLRSSLSALILLGGCAAVGPDYAPPSASAPASFGAMPAGIDGSGVEIEWWRGFDEPA
 LESLIQRALAAANLDIALAGARLDEAKALLRENREEFLPRGGPAFDYQARRRGEVETPAGQ
 QORDIETYRGALDASWEIDLFGVRVRSVEAAEAQAGSREALLRNVQASVAATVAMSWFQLQ
 GIEAELAVVHDIAGNQDLSLEMVRLVLSAGSAHEFDRLRAEALLHNVEAAVVDLERRRAA
 TRNALAVLLAEAPQAFSPVARASGERLTLRTLGVGDPAGLLARRADIAAAERNLAAATA
 RIGVETAGLYPQVEVRGSI GLVAGNLDALDESGTSFNVLNPVIRWALLDRGRVWARIAAS
 EARAQEALILYDRTVLRLAQETDDAFNGYGAADRLRLRLLLEATANREARLARERFVQG
 DGEYLDVLEAERSDYLSRRALS IARTEQRLAVVGIYKALGGGWEACAGARRCGVATDDTS
 PGVARQRDSRS

SEQ ID NO:19 >gen H de PS17
 MSTNQYGGFLTDKGAAKQVEAASGGLRNITHMLIGDAGGAPGQTPDPVPSPLQTKLVRQ
 RYRVKLNRLVAADNSPSVLIAEAILPQDVGGWWMRELGLESDGDMI AVANCAPSYKPLV
 NEGSGRTQTVRLHIAFSHAETVDLLIDPNVVTATVADLQNALLEVRAINDATGQMRGTD
 GKALPLSLSLTGIAAGTYRSLTVDAKGRATSGSNPTTLGGYGITDALAKSDAVDVPAPN
 KLLRLNAASQLPASITGNAATATKLA VPRMLSFTGDATGGASFDGSANAVALTLANSV
 TAGTYAKVTVNGKGLVTGGAQLTAADI PALDAGKVVSGVLP IARGGTGNAIGQAATAVKL
 ASPRTLAIAGDATGSAAFDGSANASISVTLANTGVAVGTYTKVRVNAKGLVTSAA SLTAD
 DVPWLDASKVTSGMFADARLPVYAQGLCTSA PNTTDPNTNI PLILTNHENGPI PGTFY
 IQTMMYNQRNGNAAQIAVRYAANAEMYVRYMYDVGNKRGVWSAWKRCVGGSF AKEADGE
 LGGGVNLDTMIASGWHQPF SANAKNGTNYPVGEAGLLTVHAPTSTMIYQTYRGYAAGGL
 YWRCRYNGTWSAWYRAWDSGNFN PANYVARSEYSWASLPGK PATFPPSGHNHDATQITSG
 ILPLARGGLGANNAVTARSNIGAGTIATASLGSSGWWRDNDTGYIRQWGRVTVPGDGSAA
 ITFPIAFPSVCLGGFAGQTANFHPGTDASTSFYNQSTTGATLENGYQFQAVLLWEAFGR

SEQ ID NO:20 >gen G de PS17
 MSASDYVFP SARVFY PVALREVYETGEGWPADAVPVSNERYLHLLAGQEAGMRIAANAS
 GQPVLVDPPPLTEAERRTKARAWRDAQLAQT DGMVARHRDERDLGNDDTLQPEQFVEVMN
 YRAALRNWPDPAFPDPASRPEPPAWLAEEGTN

SEQ ID NO:21 >VHML 34
 MAGLKLQFTEAGLAELISAKEQGIKGAISHLAFGDMAYTPNKSQTRLQREQERVEIADYQ
 DGGLSLRMAAVFSGEKEYAIREIGVFLSTGTL LGVYSQSGKTIGYRTPSVKVMQWLTLNI
 TALPDSVTVVVG TENLNLILDAEFMESAASFMRLGAATIRQALWNLQLSEKIRALES

SEQ ID NO:22 >VHML 35
 MGTITEQIESLKTASAEXTAAXQALAQEVSGKMAAIDKKTND SIAKVKSTYDQKANGLTI
 IATDGYRKA VEHNSSGGRNTVIYDAQGNPNIMCVIPRFNIEDLGLTELDLGTGVHPAFVTN
 GAPRGEILV GKYLASSAAGGS AVIGGPQRTSVNYDTAKQLCTQKGDNWHLMSIHEWAAI
 ALWSLANGTVPRGNTNYGRSHEAKWETARRADNGLPGDTS GTGRDGTGKGPATWNHDHTE
 FGVCDLVGNVWEIDQMKLDDGQILTTLDN NPGVAEANWHRHPAYFDS TSDNQSGAGNNG
 SPVLSNSVTKRNGPADDDSHDY PYMHNPHFAAITKSAGYXPNELLRRLLESATATTVGG
 GLWCRNYGDRFP LRGYWNNGSSAGLGALYLSYARSNSNSSIGFRPAFFV

SEQ ID NO:23 >VHML 38
 MFSYIFQGRTHDTTRS YMNLSGMTQEQVDSVLQ QKFEEAQN LVKRQEAYRLES DPLFM
 EWQYDNTPESEQAWRDKVAEIKARYPLPSES

SEQ ID NO:24 >MTD
 MSTAVQFRGGTTAQHATFTGAAREITVDTDKNTVVVHDGATAGGFPLARHDLVKTAFIKA
 DKS AVAPTRTGNATASIKAGTIVEVNGKLVQFTADTAITMPALTAGTDYAIYVCDGTVR
 ADSNFSAPTGYTSTTARKVGGFHYAPGSNAAAQAGGNTTAQ INEYSLWDIKFRPAALDPR
 GMTLVAGAFWADIYLLGVNHLTDGTSKYNV TIADGSASPKKSTKFGGDGSAAYS DGAWYN
 FAEVMT HHGKRLPNYNEFQALAFGTTEATSSGGTDVPTTG VNGTGATSAWNI FTSKWGVV
 QASGCLWTWGNFPGGVNGASEYTANTGGRGSVYAQPAAALFGAWNGTSLSGSRAALWYS
 GPSFSFAFFGARGVCDHLILE

FIG. 11D

SEQ ID NO:25 >gen H de P2
 MSIKFRVITTAGAAKLAATAPGRRKVGITTMVAGDGGGKLPVPDAGQTGLIHEVVRHA
 LNKISQDKRNSNYIIAELVIPPEVGGFWMRELGLYDDAGTLIAVANMAESYKPALAEGSG
 RWQTCRMVIVSSVASVELTIDTTVMATQDYVDDKIAEHEQSRRHDPASLTAKGFTQLS
 SATNSTSETLAATPKAVKAAAYDLANGKYTAQDATTARKGLVQLSSATNSTSETLAATPKA
 VKTVMDETNKKAPLNSPALTGTPTPTARQGTNNTQIANTAFVMAAIAALVDS SPDALNT
 LNELAAALGNPNFATTMTNALAGKQPKDATLTALAGLATAADRFPYFTGNDVASLATLT
 KVGRLILAKSTVAAVIEYLGLQETVNRAGNAVQKNGDTLSSGGLTFENDSILAWIRNTDWA
 KIGFKNDADGDTDSYMWVFETGDNGNEYFKWRSRQSTTTKDLMTLTKWDALNILVNAVINGC
 FVGTTNALGGSSIVLGDNDTGFKQNGDGLDVIYANSQRVFRFQNGVAIAFKNIQAGDSK
 KFSLSSTSTKNITFNLWGASTRPVVAELGDEAGWHFYSQRNTDNSVIFAVNGMQPNS
 WGNFDSRYVKDVRVLGTRVVQLMARGGRYEKAGHTITGLRIIGEVDGDDEAIFRPIQKYIN
 GTWYNVAQV

SEQ ID NO:26 >gen G de P2
 MQHLKNIKSGNPKTKEQYQLTKNFDVIWLWSEDKNWEVKNFQPDITIKIVYDENNIIV
 AITRDASTLNPEGFVVEVPDITSNRRADDSGKWMFKDGAIVKRIYTADEQQQAESQKA
 ALLSEAENVIQPLERAVRLNMATDEERARLESWERYSVLVS RVPANPEWPEMPQ

SEQ ID NO:27 >R2-P2 1-164:158-669
 MATNTPKYGGLLTDIGAAALATASAAGKKWQPTHMLIGDAGGAPGDTDPDPLPSAAQKSLI
 NQRHRAQLNRLFVSDKNANTLVAEVVLPVEVGGFWIREIGLQDADGKFVAVSNCPSPYKA
 AMESGSARTQTI RVNIALSGLENVQLLIDNGIIYATQDWVKEKLAEHEQSRRHDPASLTA
 KGFTQLSSATNSTSETLAATPKAVKAAAYDLANGKYTAQDATTARKGLVQLSSATNSTSET
 LAATPKAVKVTMDETNKKAPLNSPALTGTPTPTARQGTNNTQIANTAFVMAAIAALVDS
 SPDALNTLNELAAALGNPNFATTMTNALAGKQPKDATLTALAGLATAADRFPYFTGNDV
 ASLATLTKVGRDILAKSTVAAVIEYLGLQETVNRAGNAVQKNGDTLSSGGLTFENDSILAW
 IRNTDWAKIGFKNDADGDTDSYMWVFETGDNGNEYFKWRSRQSTTTKDLMTLTKWDALNILV
 NAVINGCFVGTTNALGGSSIVLGDNDTGFKQNGDGLDVIYANSQRVFRFQNGVAIAFKN
 IQAGDSKKFSLSSSTSTKNITFNLWGASTRPVVAELGDEAGWHFYSQRNTDNSVIFAVN
 GQMOPSNWGNFDSRYVKDVRVLGTRVVQLMARGGRYEKAGHTITGLRIIGEVDGDDEAIFR
 PIQYINGTWYNVAQV

SEQ ID NO:28 >gen H de L-413c
 MSTKFKTVITTAGAAKLAATVPGGKKVNL SAMAVGDGNGKLPVPDAGQTKLVHEVVRHA
 LNKVSVDNKNKNYIVAEVLPPEVGGFWMRELGLYDDAGTLIAVSNMAESYKPELAEGSG
 RAQTCRMVILSNVASVELSIDASTVMATQDYVDDKIAEHEQSRRHDPATLEKGFQLS
 SATNSTSEKLAATPKAVKAANDNANSRLAKNQNGADIQDKSAFLDNIGVTSLTFMKHNGM
 IPTDNDLSYGPPEKYLGTWSCPSQSTAKPESGYPEDKNGVLEVFNAGRPHCTQRYTTR
 TGNIIYIRMLDAEWNPASPTWSAWRVITSGTRPLSTSIDLNSLGGAEHLGIWRNSSTSIAS
 FERHFPEDGSFGQGLEVFEGGLYGRMQRYYTTRSGTMYIRGLTASWDAENPWEDWIAVG
 YQSTGWYSGDLDDLKPGIYSVTQATNAPVTDKDLAVGSIVEVKKRCDIESYIQTYT
 TVSATDAYKNRTFQRTRASGEADWGEVAEVYNSKSLTLKLVGGVTDRLSSLDWQTYDFV
 PGSMITVRLSDMTNIPDGMWGVIDTNLINITVGPSEGGGVARSMQVWRSTSNKNTNYRFF
 TVRLYGNPGRSFNIRRLPIIDEAQTWEAKQTF SAGLSGELSGNAATATKLKTARKINNV
 SFDGTSIDLNTPKNIGAFASGKTGDTVANDKAVGWNWSSGAYNATTGGASTLILHFNIGE
 GSCPAAQFRVNYKNGGI FYRSARDGYGFEADWSEFYTTTRKPTAGDVGALSLSGGQLNGA
 LGIGTSSDLGGNSIVLGDNDTGFKQNGDGNLDVIYANSVHVMRFVSGSIQSNKINITGRV
 NPSDYGNFDSRYVRDVRVLGTRVVQTMQKGVMEKSGHVITGLGIVGEVDGDDPAVFRPIQ
 KYINGTWYNVAQV

SEQ ID NO:29 >gen G de L-413c
 MQHLKNIKSGNPKTKEQYQLTKNFDVIWLWSEDKNWEVSNFQEDTIKIVYDENNIIV
 GITRDASTFNPEGFVVEVPDITANRRADDSGKWMFKDGAIVKRIYTADEQQQAESQKA
 ALLSEAESVIQPLERAVRLNMATDEERSRLEAWERYSVLVS RVPANPEWPEMPQ

FIG. 11E

SEQ ID NO:30 >R2-L-413c 1-164:158-913
 MATNTPKYGGLLTDIGAAALATASAAGKKWQPTHMLIGDAGGAPGDTDPDPLPSAAQKSLI
 NQRHRAQLNRLFVSDKNANTLVAEVVLPVEVGGFWIREIGLQDADGKFFAVSNCPPSYKA
 AMESGSARTQTIRVNIALSGLENVQLLIDNGIIYATQDWVKEKVAEHEQSRRHPDATLTE
 KGFTQLSSATNSTSEKLAATPKAVKAANDNANSRLAKNQNAGADIQDKSAFLDNIGVTSLT
 FMKHNGMIPTTDNLDSYGPEEKYLGWSCPSPQSTAKPESGYPEDKGNVLEVFNAGRPHC
 TQRYTTRTGNIIYIRMLDAEWNPASPTWSAWRVITSGTRPLSTSIDLNSLGGAEHLGIWRN
 SSTSIAFERHFPEDGSFGQILEVFEGGLYGRMQRYTTRSGTMYIRGLTASWDAENPQW
 EDWIAVGYQSTGWYSGDLDDLKPGIYSVTKQATNAPVTDKDLAVGSIVEVKKRCDIE
 SYIQTYTTVSATDAYKNRTFQTRASGEADWGEWAEVYNSKSLTCLGVGGVTDRLSSLD
 WQTYDFVPGSMITVRLSDMTNIPDGMWGVITDNLINITVGPSEGGVARSQVWRSTSN
 KTNRYRFTVRLYGNPGRSFNIRRLPIIDEAQWTEAKQTFSAAGLSELSGNAATATKTKT
 ARKINNVSFDGTSIDNLTTPKNIGAFASGKTGDTVANDKAVGWNWSSGAYNATTGGASTLI
 LHFNIGEGSCPAAQFRVNYKNGGI FYRSARDGYGFEADWSEFYTTTRKPTAGDVGALSLS
 GGQLNGALGIGTSSDLGGNSIVLGDNDTGFKQNGDGNLDVYANSVHVMRFVSGSIQSNKT
 INITGRVNPSPDYGNFDSRYVRDVRVLGTRVVQTMQKGVMEYKSGHVITGLGIVGEVDGDDP
 AVFRPIQKYINGTWYNVAQV

SEQ ID NO:31 >fibra de la cola de T4 (gp37)
 MATLKQIQFKRSKIAGTRPAASVLAEGELAINLKDRTIFTKDDSGNIIDLGFAKGGQVDG
 NVTINGLLRLNGDYVQTGGMTVNGPIGSTDGVTKIFRSTQGSFYARATNDTSNAHLWFE
 NADGTERGVIYARPQTTTDEIRLRVRQGTGSTANSEFYFRSINGGEFQANRILASDSL
 TKRIAVDTVIHDAKAFGQYDSHSLVNYVYPGTGETNGVNYLRKVRKSGGTIYHEIVTAQ
 TGLADEVSWWSGDTPVFKLYGIRDDGRMIIRNSLALGFTTNFPSSDYGNVGMGDKYLV
 LGDVTVTGLSYKKTGVFDLVGGGYSVASITPDSFRSTRKGI FGRSEDQGATWIMPGTNAAL
 LSVQQTADNNNAGDGQTHIGYNAGGKMNHYFRGTGQMNINTQQGMEINPGILKLVGTGSNN
 VQFYADGTISSIQPIKLDNEIFLTKSNNTAGLKFAGPSQVDGTRTIQWNGGTREGQNKNY
 VIKAWGNSFNATGDRSRETQVSDSQGYFYAHRKAPTGDETIGRIEAQFAGDVYAKG
 I IANGNFRVVGSSALAGNVTMSNGLFVQGGSSITGQVKIGGTANALRIWNAEYGAIFRRS
 ESNFYIIPTNQNEGESGDIHSSLRPVRIGLNDGMVGLGRDSFIVDQNNALTTINSNSRIN
 ANFRMQLGQSAYIDAECTDAVRPAGAGSFASQNNEDVRAPFYMNIDRTDASAYVPILKQR
 YVQNGCYSLGTLINNGNFRVHYHGGDNGSTGPQTADFGWEIFKNGDFISPRDLIAGKV
 RFDRTGNITGGSGNFANLNSTIESLKTDMSSYPIGAPIPWPSDSVPAGFALMEGQTFDK
 SAYPKLAVAYPSGVI PDMRGQTIKGKPSGRAVLSAEADGVKAHSHSASASSTDLGKTTSS
 SFDYGTGKTNSTGGHTHSGSGSTSTNGEHSYIEAWNGTGVGGNKMSSYAI SYRAGGSNT
 NAAGNHSHTFSPGTSSAGDHSVVGIGAHTHTVAIGSHGHTITVNSTGNTENTVKNIAFN
 YIVRLA

SEQ ID NO:32 >chaperona de T4 (gp38)
 MKIYHYFFDTKEFYKEENYKPVKGLGLPAHSTIKKPLEPKEGYAVVFDERTQDWIYEEDH
 RGKRAWTFNKEEIFISDIGSPVGITFDEPGEFDIWTDDGWKEDETYKRVLIRNRKIEELY
 KEFQVLNNMIEASVANKKEKFYYKNLKRFFALLEKHEHLGGEPSPWPEKEQKPWKRLF
 HYV

FIG. 11F

SEQ ID NO: 33 >fibra de la cola de AB17
 MATLKQIQFKRSKTAGARPAASVLAEGELAINLKDRVLFKDDQGNIIDLGFPAKGGSIDG
 NVIHTGNYNQTDYTLNGVFTQTGNFNLTGIARVTRDI IAAGQIMTEGGELITKSSGTAH
 VRFDDNNSRERGI IYAPANDGLTTQVLNIRVQDYAAGSESTYAFSGSGLFTSPEVSAWKS
 ISSPQILTNKVITNNKSTGDYDIYSMADNVPLSESTTAINHLMVRMNAVVGSGIFHEVKDN
 DGITWYSGDGLDAYLWSFTWSSGGIKSSHSISIGLTPGNKDYSLILGPSSIALGDNDTGFKW
 HQDGYFVSVNNGTKTFLFNPSETSLRKFVAGYSTNGTDLTTPPTENYALATVVVYHDNN
 AFGDQQLLGGYQGGNYHHYFRGKGTNTNINTHGGLLVTGNIDVIGGSVNI DGRNNSSTL
 MFRGNTTGYSSVDNMDIKVWGNTFVDPSSGGIRKNIMEISDATSWMSYIQRLLTTEVEMNV
 NGSFESSGVTAGDRGVHTTGEISSGAVNALRIWNADYGAI FRRSEGLHI I PTAYGEGKN
 GDIGPLRPFSLALDTGKVTI PDLQSSYNTFAANGYIKFVGHGAGAGGYDIQYAQAAP I FQ
 EIDDDAVSKYYPVVKQKFLNGKAVWSLGTINSFTFVIHHLKEDGSQGHSTRFNQDGTVN
 FPDNVSVGGGEATIARNGNISWDIWKFTSAGDTTNRDAIATRVSKEGDTMTGTLWINK
 DAAGIVLNPPLTSDSSFIRSDTAGANNWYIGKGGADNGLGFYSYVTQGGVYITNNGEISL
 SPQGGQTFNFRDRHLINGTQWAAHQGGGWNQWQEAQVDFVDFGNVGNDSYYP I IKGKS
 GITNEGYISGVDFGMRRITNTWAQGI I RVGNQENGYDPQAVYEFHHNGTFYAPSLLKSSR
 VSAGGGDPAWGGPCI VLGDNDTGLLWENDGIFNAYANGQGVFSFRPGLAQTFGDVNFHCN
 AGMYVRDNI DVNDVYIRSDIRCKSEIKLIKNAQEKSKLLGGYTYLLKNSVTDVKKPSAGL
 IAQEVQVLPPELVSEDKETGLLRLNNGYI IGLNTAAINEHTDEIKELKSEITELKALIKS
 LIK

SEQ ID NO: 34 >ensamblaje de fibra de la cola de AB17
 MAVVGI PGWIGTSAVAETGQRWMTAASRELRLGNPSWMSQFAGRSREI IHTLGADHNFNG
 QWFRDRCFEAGSAPI VFNITGNLVSYSKDVPLFFMYGDT PNEYVTLNIHGGVHMWGRGGN
 GTVNGNPGTNGGDVIONDIGGRLRIWNYGVIASGGGGGAVSLXNSWAPNATAGGGGRRP
 FGIGGGGVNWPGGNASYDAPGGAGYTSQFGGGNGGDAGGRGGDGWGNHLSRSGGGAPGRA
 VFGSSPSWGATGTIYGSWI

SEQ ID NO: 35 > OpmQ
 MKNLSLISACLLLGACGSTPAPLDSGLAAPSQWRYLAAGRSDASDIRQWKAFGAPELDS
 LLQRALLNSQDLGAAVARVRQAQASAVIAGAPLLPELNATLGASRQKLLRDSGYSGTDAT
 SDNDAVDSFSAGLSASYEVDWFWGGRQAAYRSALSLKASEYDRATVELTLLSGVANSYLQ
 VLALREQRIARLNLDNAEHVLRVETRHAAGSATALEVAQSSSLVASQRKQLPILLEQQA
 HEALITLATLIGEPVQALQVAERPFDSLRLWPEAGLPSSELLSRRPDI ANAEAQLAAQA
 DVQVARAALFPKLTLSASLSSGANRAADTFRNPYINLGANLLAPI FNHGRLEAERDRSLA
 RQEELETYRKAILTAFADTERSLSNIDGLDRQLHWQQQELLEQAQRAFLLSDSRVQAGAE
 TLLTVLETQRTLYAAQDAAVQLRLARLQASVGLYKALGGGWQSDRQGLARKD

SEQ ID NO: 36 > OpmB
 MKHTPSLLALVAALGGCAIGPDYQRPDLAVPAEFKEAEGWRRAEPRDVFQRGAWWELY
 GDQTLNDLQMHLENSNQTLAQSVAFRQAEALVRGARAFFPSITGNVKGTRSGQGGGDS
 TVLLPGGSTVSSGGSGAISTSYSTNLSVSEVDLWGKLRQLEANQASLHASAADLAAVR
 LSQQSQAQNYLQLRVMDEQIRLLNDTVTAYERSLKVAENKYRAGIVTRADVAQARTQK
 STQAQAIDLKYQRAQLEHAI AVLVLGLPPAQFNLPVAVSPKLPDLPAVVPVPSQLLERRPDI
 ASAERKVISANAQIGVAKAAYFPDLTSAAGGYRSGSLSNWI STPNRFWSIGPQFAMTLF
 DGGLIGSQVDQAEATYDQTVATYRQTVLDGPFREVEDYLVQLSVLDEESGVQREALESARE
 ALRLAENQYKAGTVDYTDVVTNQATALSNERVTLTLLGSRLTASVQLIAMGGGWDSADI
 ERTDERLGRVEEGLPPSP

SEQ ID NO: 37 OpmJ
 MPLASHLRCVALALGISTALGCANRNQPAPRAESLDPGLSRVAGTRGDALPAQWWTLYQD
 PGLNHLVAALRHNRDLAAADAHARALLGHLRGAQGERWPRTEVGYGYQYGRDGGDDQTLA
 EATDEDLHSQWKHTVRLDLSYQLDLWGEVRARIAAAKADAEAAQAARDLLRVSVASQTTL
 AYVRACALARRAEVQRRSVGLLDASLALSERQLAAGLSSELQRRRLALRERTRALPML
 EARRRAALYELALLSGRSPRQLDAPAAATCAGI PQLRRALPTGDGWSLLARRPDVRAAERR
 LAAADARRALAEAEYPRISFAVGAETSAAATLAGLGGSGALAYAAGPILLSWRFPNRESAR
 GRLDAAAERDAALARFDGAVLGALEVERALALYAGERQRRADLQRALDEQRHAYRLAR
 SNYRAGALDALELLDSQRSVLADRARLVDAEMRVAERQVELFRALGGGWQAASSPSHQEN
 GQ

FIG. 11G

SEQ ID NO:38 > OpmG

MPFPLLHPWPQRLALASAILLAAGCVTSEGLEPNARLQAPAGALQAGRSLDGVALSPAAWP
 RQDWWTGLGDRQLDQLIGEALQGTPLDQIAEARARQAAATAQAQDAARQPTLDAKASYSG
 IRAPTSVAPAPLGGRYSAIKYLSLGFNYDFDLWGGERRAAWEAALGQANAARIDSQAARIG
 LSASIARAYSDLAHAFTRDLAEELKRSQRMTELSQKRMSAGLDSKVQLQQTQTQLATA
 RQQLSAAEQDIASARIALAVLLGKGPDRGLELQRPQPLNPASLSLPSVLPSELLGRRADI
 VAARWRVEAARNIDSAKTEFYPNLNLGAMAGLAALHTSDVLQAPSRFFQVAPAIISLPIF
 DGGRRRANLAERDADYDLAVGQYNKTLVQALGEVSDDLGKLRSLSEQQVIDQRQARDIARS
 NFDLAMRRYGEVGSYLDALSVQQQLLVAERQLASLESQQIDLSVQLVQALGGGFQPDSSR
 SAALATAKAPAE

SEQ ID NO:39 > OpmI

VPRALRKELTLVGSFVGFVLVFSASISGCVSTGDIPEAATLDANALATDHAIQAAAREAG
 WPQAQWVKVYADPQLDAWIEKALDGNPGLAVAHARVRQAKSMAGLVESIESPQIEGKGS
 VRHRWPDYFYGPGDLARTTSWNNSTEIGLNYKLDLWGRDRSDSERAVDLAHMAAAEARQ
 AQLELEGNIVRAYVQLSLQYAEMDIKAMLQQQRDILALAQRRLRGGIGTHFEVSQAEV
 LPETERRIEVIDEEIQLTRNLLAALAGKGPGEGRIRRRPSLNLAQPSLPSALPAELLGR
 RPDVVARRWQVAALAKGVDVARADFYPNVDLMASVGFSAVGGGMLEFFRSKAYTYSAGPA
 VTLPIFDGGRLRSQLGEEAAGYDAAVEQYNQTLVDALKNISDQLIRLHSVDIQKDFAAQS
 VASAQKTYDIATLAYQRGLTDYLNVLNAQTRLFQQQLVQEQQVQARLAAHASLLTALGGG
 VGAGADTPAQRKLAPENVVRAVSSR

SEQ ID NO:40 > OpmH

MLRRLSLAAVAATAATGVAVAAQPTPLPTKTDLISVYKEAVDNNADLAAAQADYLARKEVV
 PQARAGLLPQLGAGARVGDTRIAFDERPATVKRNSQVVQATLSQPLFRADRWFQWQAAKE
 TSDQARLEFSATQQDLILRSAETYFTVLRAQDNLATSKAEEAAFKRQLDQANERFDVGLS
 DKTDVLEAQASYDTARANRLIAEQRVDDAFQALVTLTNRDYSIAIEGMRHTLPVVPAPND
 AKAWVDTAVQONLRLLASNYAVNAAEETLRQRKAGHLPTLDAVAQYQKGDNDALGFANSA
 ANPLVHYGKYVDERSIGLELNIPIYSGGLTSSQVRESYQRLNQSEQSREGRRQVVQDTR
 NLHRAVNTDVEQVQARRQAIISNQSSLEATEIGYQVQTRNIVDVLNAQRQLYAAVRDYN
 SRYDYILDTRLKQAAGTSLSPADLEALSAYLKQDYDPDKDFLPPDLAKAAAQQLQSKPRQ
 QY

SEQ ID NO:41 > OpmK

MRALAGLLCGLLGLVPGAAAYEPDVFVGTGQVAGQAVYDLGGSGLPCRGGPPPELSLEE
 AIERILCHDPQTRLAWANAKAQAQVIGKSAYLPRLDGRLDASRGYSMDYRDAPYLSG
 DGHRHRRGASLQLSWVLFDFGRRSAALRNAQQLLLAANASQDATLQNTFALAAQAYDAL
 AAQRSLAASRQVAELAAQNLEAADAKYRAGAAALSDRLQAQTALSQASLAQVRDEGALS
 ALGVIALRMGLAPDTPRLSGLAEQPDTFVKAIDEMLAEARREHPALLAQARLKAAA
 ASVEESRAAGRPSLALSANLARSHSDQAMAFNGDTRERDRSIGLQLNIPLEGFERTYQV
 RNALARREASEAELADTEQVSVLEVWNNYQSLSVETRSLARTRELVEQSRQSLVVQGRY
 RSGVGSMIELLNALTAYASAEDQHIRALGNWQTSRLRLAASLGRLLGFWSLR

SEQ ID NO:42 > OpmN

MPILRPLASAGKRACWLLMGLCLGLPALANEAPVSFNGTSSISLEQALERALSNPPELAAV
 GRETEIASGARQQAGLIPNPDLSWSVEDTROGNRQTSVSIAPLELGGKRGARVEVAKRG
 SEIAWTQLEVRRALRAQVRGAYYAALTAQERVRLAKTSLDLARRALQAADRRVKAGSIS
 SVERVRAQVLADNAQLDLSQAELEQQRITYVQLSSWDEPQPGFARVGGALDAVPASITRG
 ALLRHLDESPTLRLAAQEVARGEAVDLEKRQRIPNLTVSIGSKYDQTARDGRGERVNI
 GLSMPLPLFDRNQGNIIYAAQSRADQARDLQRATLLRLRSEAVQAYDQLRTSEQELALVRR
 DLLPGAQSALDSMTRGFEMGKFNFLDVLDAQRTLGVVRAQYVVRALDAAAQARVSMERLLG
 EDIGHLGQ

FIG. 11H

SEQ ID NO:43 > OpmF
MNRWGLGVLWLVLTALPVAASVNPALSPDVPSMAREQGRSVLLSEQVIDLSLSDAVYLGRLR
NNRGIRSAYLQRIAQKFDLRVAADAFNPKLVVRGDYRANRATEDRTRTSNVSPATLLGE
YGTRFSLAWVKQFRTADEAGRYRSDGLDLTVVQPLLRDAGWDVTTAPLRLARLSEANRL
QLKASVSQTISQVIGAYRELLRAEQARIAREALARTQELLEVNRAMIRAGRMAEFEIVQ
TEADVASQELNVEESTNOVDSARLALLQLLALDLSTQIRASDALAATPIEVDRQQAIRTA
LQQQPEYLQRLIGSRQADLNVLAKNQRLWDVSLVGGASQIRDRYSEGGDNSRSWDSYA
GVQVEIPIGDLRRQAEVRAQVDVENQKILIEDARQTLQNVIDAVRDLGTRWRQYQIAQ
RATALSRRKLEIEREKLRVGRSSNFQVLSFETDLRNVENTQLNALISFLNAQTQLDLIVG
MTLDSWEISLNDH

SEQ ID NO:44 > OpmL
MRGRRQYARKGRRHGKGAIWLLSLGLPMFASAMPLDQAVRAGLAIHPEVRSAMAEADRAG
TEVEMAKGGYYPVMSGGPQEFDFGEIVYDLTASQMLYDWGRVTSKVDSASATQRKLSE
AVLVARDDAALDIVETYLDVLAERRVEAVREHIQRLDGIEMTQARGGDGYADRSELDR
ANLELSRAQEQLSLEKGNLQDARNQYAILVGQEPADLVEPEPMSLQRYLAASDMARVIRE
SPLQRKALLEDANVAEAEVREAKASLLPQLNLEASALRREIGGHPESDSVVSRLRFMDTFQ
GLSNFRRTAAQQRLESASADAMQRDIRRQLQNLFDNGDTLRWREQSLTQOVTESEVQ
GELYREQFEVGRRDVIDLLNVQRERFEAERQLINLRIERKRIEYRAAAQVGLLPLENR
LNHGS

SEQ ID NO:45 >gen H de phiCTX
MTSPKYGGLLTDIGAAALIAASEAGKKWQPTHMLIGDAGGAPGETADPIPSAAQTKLIRO
RYRAQLNRLFVSEQSANVLVAELVLPMAIGGFWIREIGLEDADGKFVAVANCPPSPFKASV
ESGSARTQTIRVQIILSGMEHVELIIDDGIYATQDHWVAKVAADFGRKVLVAGNGLVGG
GDLSADRTIALPASGVGAGTYRAVTVNANGIVTAGSNPTLGGYGITDALHASEAVTPT
ANKLLRLNAAGLLPASITGNAATASRLAAPITLSASGDATWSARFDGATNVNGVLTANS
GVTAGTYAKVTVNAKGLVTGATGLVASDIPALDAGKITSGILPAARGGTGNGIGQAATAV
KLVAPRTIYLGGDVSGSTTFDGSANAGITVTLANGVNAGSYPKVTVNAKGLVTGGGGLTA
ADI PALDASKIATGRDLRLPLVSQGLATAVHTSVDPNSVVIPLVLTNHANGPVAGRY
YIQTMEFYPTVEGNATQIATGYAGVADMYVRAYASPATTDSSKREWSAWVRCDLGGFAH
APDDELGGYVNLDSMIASGWWHPFTANAKNGANYPVGEAGLLTVHAPTASMIYQTYRGY
AAGGLYWRCRYNGTWSAWYRAWDSGNFNPNANYVAKSEYSWASLPGKPSNFPSPVHVHSA
SRGVS GWYKNDTGVIFQWVNLSIGDHPGGVIDRVVTPPIAFPNAACLHVVPVRENGRPA
IPASTVVAEKARTATNCTIVSSEYIGNVQNFGINVFAIGY

SEQ ID NO:46 > AV085
GCTTCAATGTGCAGCGTTTGC

SEQ ID NO:47 > AV088
GCCACACCGGTAGCGGAAAGGCCACCGTATTTCGGAGTAT

SEQ ID NO:48 > AV087
ATACTCGAAATACGGTGGCCTTCCGCTACCGGTGTGGC

SEQ ID NO:49 > AV086
TCCTTGAATTCGCTTGCTGCCGAAGTTCTT


SEQ ID NO:50 > AV110
TTTATTAGCGGAAGAGCCGACTGCACGGTGCACCAATG

SEQ ID NO:51 > AV114
CCCTCGAATTCATGAATACTGTTTCTGTGTGAAATTG

SEQ ID NO:52 > AV118
CTTCTTTCATGACGACCAATACTCCGAA

SEQ ID NO:53 > AV116
ACCACGAATTCCTCATCGTCCAAATGCCTC

FIG. 11I

SEQ ID NO:54 > AV107 
CACCATCTAGACAATACGAGAGCGACAAGTC

SEQ ID NO:55 > AV091
TCCTCAAGCTTACGTTGGTTACCGTAACGCCGTG

SEQ ID NO:56 > AV127
TTCTTTAAGCTTTTCCTTCACCCAGTCCTG

SEQ ID NO:57 > AV124
CCTCCTGAATTCTTATTGCGGCATTTCCG

SEQ ID NO:58 > AV126
TCCTTCGAATTCTTACACCTGCGCAACGT

SEQ ID NO:59 > AV125
CCTCCTGAATTCTTATTGCGGCATTTCCG

FIG. 11J