



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 274**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01) **C12Q 1/18** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) **C07K 14/21** (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01) **G01N 33/53** (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) **A61K 39/104** (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00964546 .6**

96 Fecha de presentación : **09.10.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1218511**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.07.2002**

54 Título: **Composiciones antimicrobianas.**

30 Prioridad: **09.10.1999 GB 9923858**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.06.2009

73 Titular/es: **NEUTEC PHARMA plc.**
St. James's Court, Brown Street
Manchester, Cheshire M2 2JF, GB

72 Inventor/es: **Burnie, James, Peter y**
Matthews, Ruth, Christine

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 321 274 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

Composiciones antimicrobianas.

5 La presente invención se refiere a composiciones antimicrobianas, en particular a composiciones que afectan a *Burkholderia cepacia*, junto con pruebas diagnósticas para las mismas y usos de las mismas.

10 *Burkholderia cepacia* es una de las causas principales de la podredumbre suave en cebollas. A pesar de que no es muy patógena en individuos sanos, ha aparecido como un patógeno oportunista importante en los últimos 15 años, estando más comúnmente asociado a infecciones pulmonares entre individuos con Fibrosis Quística (CF) y enfermedad granulomatosa crónica (Jarvis, W.R. y col., 1987, Eur. J. Epidemiol., 3: 233 - 36). Los pacientes con CF se colonizan con esta bacteria a partir del entorno y datos recientes han mostrado evidencia de la transmisión de persona a persona (Sajjan, U.S. y col., 1992, J. Clin. Invest., 89: 648 - 56; Govan, J.R.W. y col., 1993, Lancet, 342: 15 - 19). Esto ha dado como resultado medidas estrictas para la segregación de individuos colonizados a partir de 15 individuos no colonizados tanto en hospitales como en entornos sociales.

20 La colonización del tracto respiratorio con *B. cepacia* está asociada a un pronóstico clínico escaso: hasta el 20% de individuos colonizados padecen del "síndrome de *B. cepacia*", neumonía asociada a fiebre que da como resultado el deterioro clínico rápido y fatal (Isles, A. y col., 1984, J. Pediatr., 104: 206 - 210; LiPuma, J.J. y col., 1990, Lancet, 336: 527 - 532).

25 Se ha demostrado que *B. cepacia* persiste en el entorno y es resistente a desinfectantes tales como clorhexidina (Sobel, J.D. y col., 1982, American J. Med., 73: 183 - 186). El tratamiento de pacientes colonizados con este organismo es problemático debido a su resistencia intrínseca a la mayor parte de antibióticos clínicamente disponibles (Pitt, T.L. y col., 1996, J. Med. Microbiol., 44 (3): 203 - 210). Los mecanismos de resistencia de *B. cepacia* son cuádruples. En primer lugar, tiene lugar la permeabilidad selectiva de la pared celular externa, que se puede deber a cambios en las proteínas de la membrana externa de formación de poros y lipopolisacáridos (Nelson, J. W. y col., 1994, FEMS Immunol. Med. Micro., 8: 89 - 98). Se ha demostrado que este tipo de mecanismo en *B. cepacia* confiere resistencia a cloranfenicol (Bums, J.L. y col., 1989, Antimicrob. Agents and Chemotherapy, 33: 136 - 141). En segundo lugar, 30 las dianas intracelulares de fármacos se pueden alterar de tal forma que ya no resultan susceptibles al fármaco, por ejemplo, la alteración en dianas de proteínas y susceptibilidad ribosómica reducida. En tercer lugar, la inactivación de antibióticos, por ejemplo la producción de β -lactamasas, incluyendo carbapenasas que son capaces de hidrolizar los antibióticos más potentes y de espectro amplio (Simpson, I.N. *et al.*, 1995, J. Antimicrob. Chemother., 32: 339-341). Se piensa que uno de los mecanismos de resistencia principales en *B. cepacia* es un eflujo activo a través de una bomba de exclusión del fármaco (Bums, J.L. y col., 1996, Antimicrob. Agents Chemother., 40 (2): 307 - 313). Sin embargo, esto 35 no se ha demostrado y no se han identificado bombas de eflujo de fármacos. Anteriormente se ha sugerido la existencia de un Transportador ABC denominado *hdrAB* (Journal of Antimicrobial Chemotherapy Volumen 44. Suplemento A, julio 1999), pero no se ha proporcionado ninguna secuencia o indicación de su identidad.

40 En la actualidad se ha identificado una bomba de eflujo multifármaco nueva en *B. cepacia*, un miembro de la superfamilia facilitadora principal (Dinh, T. y col., 1994, J. Bacteriol., 176: 3825 - 3831; Marger, M.D. y Saier, M.H. 1993, Trends Biochem. Sci., 18: 13 - 20), esto es, no una proteína transportadora ABC (Higgins, C.F., 1992, Annu. Rev. Cell Biol., 8: 67-113) ni miembro de la familia de resistencia a metales pesados/división celular (Saier, M.H. Jr. y col., 1994, Mol. Microbiol., 11: 1841 - 1847). Actúa para producir grandes cantidades de antibióticos y otras 45 moléculas y de ese modo ayuda a proporcionar al organismo su resistencia al fármaco. La inhibición de la bomba dificulta el eflujo de por ejemplo antibióticos y les permite afectar (por ejemplo, dañar) el organismo. Así pues la bomba y su inhibición proporciona una forma nueva para controlar *B. cepacia*. En particular, permite la creación de una clase nueva de composiciones antimicrobianas así como desinfectantes.

50 Burnie y col. (1995, FEMS Immunology and Medical Microbiology, 10: 157 - 164) describen una porina de 28 kDa en *B. cepacia*. Esto es distinto a la bomba de eflujo multifármaco de la presente invención que es un tipo diferente de proteína y que tiene un peso molecular previsto de 49 kDa.

55 De acuerdo con la presente invención se proporciona una bomba de eflujo multifármaco que tiene una secuencia de SEQ ID N°: 2 (denominada en la presente memoria descriptiva *bcrA*) o una bomba de eflujo multifármaco que tiene al menos el 90% de homología con ésta.

60 Para determinar la identidad u homología porcentual entre dos secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean a efectos de comparación óptima. Así pues, por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas secuencias, y las secuencias no homólogas (no similares) se pueden descartar a efectos de comparación. En una realización preferida, la longitud de una primera secuencia alineada a efectos de comparación es al menos el 30%, preferiblemente al menos el 40%, más preferiblemente al menos el 50%, incluso más preferiblemente el 60%, e incluso más preferiblemente al menos el 70%, el 80% o el 90% de la longitud de la segunda secuencia en la 65 región alineada. Después se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácidos o residuo de nucleótidos como la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. La identidad porcentual entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (teniendo en cuenta, según convenga, el número y

longitud de huecos introducidos para optimizar la alineación). Para las secuencias de polipéptidos, la sustitución de un aminoácido por otro con características similares se puede realizar sin afectar la estructura o función del polipéptido. Tales sustituciones conservadoras probablemente son fenotípicamente silenciosas. Las sustituciones conservadoras vistas típicamente son los reemplazos, uno por otro, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu e Ile, intercambio de los residuos hidroxilo Ser y Thr, cambio de los residuos ácidos Asp y Glu, sustitución entre los residuos de aminoácidos Ásn y Gln, cambio de los residuos básicos Lys y Arg y reemplazos entre los residuos aromáticos Phe, Tyr. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras que probablemente son fenotípicamente silenciosas se describen en Bowie y col., 1990, Science 247: 1306 - 1310. Cuando se alinean secuencias de aminoácidos, se pueden considerar las sustituciones conservadoras de aminoácidos para proporcionar una puntuación de la homología (también denominada “similitud”) entre las secuencias.

En una realización preferida, la comparación de secuencias y determinación de la identidad porcentual y/u homología porcentual se puede determinar usando un algoritmo matemático (véase, por ejemplo: Lesk, A.M. (ed.), 1988, Computational Molecular Biology, Oxford University Press, Nueva York; Griffin, A. M. & Griffin, H.G. (eds), 1994, Computer Analysis of Sequence DATA, Humana Press, Nueva Jersey; von Heinje, G., 1987, Sequence Analysis in Molecular Biology, Academic Press, New York; and Gribskov, M. & Devereaux, J. (eds), 1991, Sequence Analysis Primer, M. Stockton Press, Nueva York). Los algoritmos adecuados para la alineación de secuencias se han incorporado en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>). Además, las secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos de la presente invención se pueden usar en forma de secuencia de consulta para realizar una búsqueda contra bases de datos para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Por ejemplo, tales búsquedas se pueden realizar usando los programas BLASTN (secuencias de ácidos nucleicos) o BLASTP (secuencias de aminoácidos) (versión 2.0 - Altschul, S.F. y col., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403 - 410; versión 2.1 - Altschul, S.F. y col., 1997, Nucleic Acids Research 25: 3389 - 3402). En una realización preferida, las secuencias se alinean, y se obtienen puntuaciones de identidad y homología, usando la búsqueda BLAST Básica con huecos (Versión 2.1) con parámetros de puntuación y búsqueda por defecto, disponible en la página de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Las búsquedas realizadas en bases de datos de secuencias han mostrado que los genes conocidos más similares son el gen *emrB* de *E. coli* y el gen *qacA* de *Staphylococcus aureus* que son parte de un operón que codifica las bombas de extrusión resistentes a multifármacos que pertenecen a la familia genética MFS (Lomovskaya, O. y Lewis, K., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., 89: 8938 - 8942; Rouch, D.A. y col., 1990, Mol. Microbiol., 4 (12): 2051 - 2062). Estos dos genes son homólogos al 48,8% y al 20,1% respectivamente. Se ha identificado un gen no identificado adicional en *Burkholderia pseudomallei*, que tiene el 84,8% de homología con el gen de la presente invención. Esta proteína (AF 110185) se describe en deShazer, D. y col. (1999, J. Bacteriology, 181 (15): 4661 - 4664) como una proteína de la “ruta secretora general” para la ruta secretora de tipo II necesaria para la secreción de proteasa, lipasa y fosfolipasa C.

Los homólogos de la proteína que tiene SEQ ID N°: 2 pueden ser aquellos que existen en otros organismos o que se generan por medio de la modificación de genes existentes tales como bcrA. Por ejemplo, los homólogos pueden haber conservado sustituciones, o pueden tener adiciones o deleciones de aminoácidos. En particular, los homólogos pueden tener al menos el 95% o por ejemplo al menos el 99% de homología con la secuencia de SEQ ID N°: 2. El campo de la modificación de proteínas por ingeniería genética es bien conocido para el experto en la técnica y una persona como tal sería fácilmente capaz de modificar la proteína de la presente invención mientras que retiene su funcionalidad como una bomba de flujo multifármaco. Los homólogos se pueden realizar por medio de modificaciones que produzcan diferencias en las secuencias, o que no afecten a las secuencias, o ambas. Las modificaciones pueden incluir derivaciones químicas o polipéptidos, por ejemplo, acetilación o carboxilación. Otras modificaciones incluyen glicosilación, por ejemplo durante la síntesis de polipéptidos, procesamiento o en procesamiento adicional, por ejemplo por medio de enzimas (tales como las enzimas de glicosilación en mamíferos) que afectan a la glicosilación. Otras modificaciones incluyen la fosforilación de aminoácidos, por ejemplo fosfotirosina, fosfoserina y fosfotreonina. Otras modificaciones incluyen el uso de aminoácidos D en lugar de los aminoácidos L de origen natural, y aminoácidos que no son de origen natural o sintéticos, tales como aminoácidos β o γ .

Las secuencias de fragmentos de polipéptidos dentro de la bomba de flujo multifármaco que tiene la secuencia de SEQ ID N°: 2 también se describen en la presente memoria descriptiva. Tales fragmentos pueden comprender secuencias de aminoácidos esenciales para las funciones de la bomba de flujo multifármaco. Las variantes de las secuencias de fragmentos que tienen la misma función pueden tener una homología de aminoácidos al 10%, 20%, 50% ó 100% con las secuencias de fragmentos correspondientes dentro de la bomba de flujo multifármaco de SEQ ID N°: 2.

La bomba de flujo multifármaco se puede expresar por medio de un organismo de los géneros *Burkholderia* o *Pseudomonas*. Los experimentos de más abajo muestran la proteína que se expresa en *Burkholderia cepacia*, y se puede esperar que la proteína y sus bombas de flujo multifármaco homólogas se expresen en un intervalo de organismos estrechamente relacionados. En particular, *Burkholderia cepacia* usada para clasificarse como *Pseudomonas cepacia* y debido a la similitud de organismos de los géneros *Burkholderia* o *Pseudomonas*, se espera que la proteína y sus bombas de flujo multifármaco homólogas se expresen en organismos del género *Pseudomonas*. Otros géneros de organismos que expresan la proteína y sus bombas de flujo multifármaco homólogas son *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Salmonella* y *Shigella*.

ES 2 321 274 T3

También se proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con la presente invención. La secuencia de nucleótidos puede tener la secuencia de SEQ ID N°: 1. La presente invención también se extiende a las secuencias de nucleótidos que codifican la misma proteína pero usando codones diferentes.

5

También se describe en la presente memoria descriptiva una molécula de ácido nucleico que hibridiza en condiciones de escasez moderada o elevada hasta conseguir un complemento de las secuencias de nucleótidos anteriormente descritas. Las condiciones de hibridación se estudian en detalle en las páginas 1.101 - 1.110 y 11.45 - 11.61 de Sambrook y col. (1989, *Molecular Cloning*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Un ejemplo de las condiciones de hibridación que se pueden usar implica el uso de una solución de prelavado de 5 x SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0) y un intento de hibridación durante toda la noche a 55°C usando 5 X SSC. La hibridación de secuencias de ácidos nucleicos incluyen sondas, cebadores o fragmentos de ADN.

10

También se proporciona de acuerdo con la presente invención una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con la presente invención para usar en un procedimiento de tratamiento de diagnóstico del cuerpo humano o de animal. Dicho primer uso médico no se ha sugerido o descrito anteriormente para las proteínas de la presente invención.

15

También se proporciona el uso de una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con la presente invención, o un fragmento inmunogénico de la misma que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por medio de un organismo que expresa la misma.

20

Ya que la bomba de eflujo multifármaco de la presente invención está parcialmente expuesta en el exterior del organismo que la expresa, expondrá epitopes inmunogénicos. Estos epitopes se pueden determinar fácilmente usando la identificación de epitopes (Geysen, H.M y col., 1987, *Journal of Immunological Methods*, 102: 259 - 274; Geysen, H.M. y col., 1988, *J. Mol. Recognit.*, 1 (1): 32 - 41; Jung, G. and Beck-Sickinger, A.G., 1992, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 31: 367 - 486). Una vez identificados los epitopes (es decir, fragmentos inmunogénicos) se pueden usar entonces en la formulación de un medicamento. Así como el uso de fragmentos de la bomba que expone epitopes, en la presente memoria descriptiva se describe que se pueden usar mimotopes que exponen el mismo epitope pero que tienen una secuencia diferente. Estos se pueden generar fácilmente como describe Geysen (arriba) usando por ejemplo anticuerpo específico frente a un epitope. De forma alternativa, se puede usar PCR para sintetizar fragmentos inmunogénicos (Gupta, S. y col., 1999, *Biotechniques*, 27 (2): 328 - 332) para permitir la identificación de epitopes.

25

30

Como se puede observar a partir de la Tabla 2 se han identificado 14 hélices transmembrana. Como éstas no están expuestas en el exterior de la membrana, no pueden exponer epitopes. De forma similar, los experimentos (abajo) han mostrado que los primeros 46 aminoácidos de la proteína no exponen epitopes. Por lo tanto, los fragmentos inmunogénicos pueden comprender la secuencia de otras partes de la proteína.

35

Los presentes inventores han tenido éxito en la identificación de una serie de epitopes que se exponen por medio de la proteína BcrA, y éstos forman otro aspecto de la presente invención. Estos epitopes se exponen por medio de polipéptidos que tienen las secuencias de SEQ ID N°: 11 - 20. Así pues, de acuerdo con la presente invención se proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20 y que expone un epitope. En la presente memoria descriptiva, la referencia a "fragmentos inmunogénicos" de la proteína BcrA se considera que hace referencia a los polipéptidos de SEQ ID N°: 11 - 20.

40

Por ejemplo, la proteína o fragmento inmunogénico de la presente invención se puede usar en la fabricación de una vacuna. La proteína o fragmento inmunogénico se puede usar en particular en la fabricación de una vacuna para el tratamiento de infecciones producidas por organismos que expresan las mismas en pacientes con Fibrosis Quística. También se describe en la presente memoria descriptiva un procedimiento para tratar infecciones en un paciente, en particular un paciente con Fibrosis Quística, producidas por organismos que expresan la bomba de eflujo multifármaco de la presente invención, que comprende la administración de la bomba de eflujo multifármaco o un fragmento inmunogénico de la misma al paciente. Tales vacunas para la administración a pacientes se pueden proporcionar en una forma que adicionalmente comprende un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable o por ejemplo un adyuvante apropiado. Tales compuestos serán fácilmente evidentes para el experto en la técnica.

50

Los medicamentos de acuerdo con la presente invención también pueden comprender un vehículo, diluyente o excipiente adecuado (véase por ejemplo *Remington's Pharmaceutical Sciences* y *US Pharmacopeia*, 1984, Mack Publishing Company, Easton, PA, EE.UU.). Las dosis exactas de medicamento que se proporcionan a un paciente serán fácilmente evidentes para el experto en la técnica y se pueden determinar fácilmente usando un experimento simple de respuesta-dosis.

55

60

También se proporciona el uso de un inhibidor de una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por medio de un organismo que expresan la misma. El inhibidor está constituido por un anticuerpo o fragmento de unión a un antígeno del mismo específico frente a un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20. También se puede usar junto con al menos un antibiótico, por ejemplo una tetraciclina y/o quinolona. El antibiótico de quinolona puede ser ácido nalidíxico. La administración a un paciente del medicamento que comprende un inhibidor de una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con la presente invención y el al menos un antibiótico puede ser simultánea o secuencial. También se proporciona una preparación combinada de un inhibidor de una bomba de eflujo multifármaco

65

de acuerdo con la presente invención y al menos un antibiótico, por ejemplo una tetraciclina y/o quinolona, para el uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de una infección por medio de un organismo que expresa dicha bomba de eflujo multifármaco. El inhibidor está constituido por un anticuerpo o fragmento de unión a un antígeno del mismo específico frente a un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20.

5 También se proporciona el uso de un inhibidor de una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con la presente invención en la fabricación de un desinfectante para un organismo que expresa la misma. El inhibidor está constituido por un anticuerpo o fragmento de unión a un antígeno del mismo específico frente a un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20. También se podría usar junto con al menos un desinfectante de amonio cuaternario, por ejemplo, clorhexidina. Como se discute anteriormente, *B. cepacia* y otros organismos que expresan bombas de eflujo multifármaco de acuerdo con la presente invención pueden ser persistentes en el entorno. Los experimentos anteriormente reseñados han mostrado que por ejemplo *Burkholderia* y *Pseudomonas* pueden sobrevivir en soluciones desinfectantes, siendo resistentes a por ejemplo compuestos de amonio cuaternario. Así pues, la presente invención no está limitada al tratamiento de la infección por tales organismos, sino que también se extiende a desinfectantes eficaces contra la misma. En particular, un desinfectante eficaz como tal contra un organismo que expresa una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con la presente invención puede comprender un inhibidor de una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con la presente invención junto con un compuesto desinfectante de amonio cuaternario.

20 Una ventaja particular proporcionada por la presente invención es que por medio de la inhibición de la bomba de eflujo multifármaco, permite a los antibióticos y desinfectantes existentes que son por lo demás ineficaces o de efecto limitado contra organismos que expresan la bomba de eflujo llegar a ser eficaces o tener eficacia potenciada contra los organismos. Así pues, una modificación relativamente simple a las composiciones antimicrobianas y desinfectantes existentes puede hacerlas eficaces o potenciar su eficacia contra los organismos que expresan la bomba de eflujo.

25 También se proporciona de acuerdo con la presente invención una composición antimicrobiana que comprende un inhibidor de una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con la presente invención y al menos un antibiótico. El inhibidor está constituido por un anticuerpo o fragmento de unión a un antígeno del mismo específico frente a un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20. También se describe en la presente memoria descriptiva un procedimiento de tratamiento de infección de un paciente por medio de un organismo que expresa una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con la presente invención que comprende la administración al paciente de dicha composición antimicrobiana.

30 La clase de antibiótico es amplia pero en combinación con un inhibidor de una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con la presente invención expone una tendencia general a inhibirla (es decir, dificulta el crecimiento o reproducción o mata) microorganismos que expresan dicha bomba de eflujo multifármaco. En particular, los miembros de las clases de tetraciclinas (por ejemplo, tetraciclina) y quinolonas (por ejemplo, ácido nalidíxico) son particularmente eficaces. También se describe un kit que comprende un inhibidor de una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con la presente invención y al menos un antibiótico. El kit se puede usar en el tratamiento de la infección de un paciente por medio de un organismo que expresa una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con la presente invención.

35 También se proporciona una composición antimicrobiana que comprende un inhibidor de una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con la presente invención y al menos un desinfectante, por ejemplo un desinfectante de amonio cuaternario. El inhibidor está constituido por un anticuerpo o fragmento de unión a un antígeno del mismo específico frente a un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20. También se proporciona un procedimiento de desinfección de que comprende la aplicación a una pieza (por ejemplo una superficie) que se va a desinfectar de una composición antimicrobiana como tal.

40 Como se ha explicado anteriormente, los inhibidores están constituidos por anticuerpos o fragmentos de unión a un antígeno del mismo específicos frente a un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20. La fabricación, síntesis y uso de anticuerpos y fragmentos de unión a un antígeno del mismo será fácilmente evidente para el experto en la técnica (Harlow, E. y Lane, D., "Using Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1998).

45 También se proporciona de acuerdo con la presente invención un procedimiento para detectar una resistencia al multifármaco en una bacteria que comprende las etapas de:

(i) poner en contacto la bacteria con un reactivo específico a la bomba de eflujo multifármaco de la invención, estando el reactivo seleccionado del grupo que está constituido por:

60 (a) un anticuerpo o fragmento de unión a un antígeno del mismo específico frente a un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20, y

(b) una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID N°: 2;

65 (ii) detectar cualquier reacción de unión anticuerpo - antígeno o reacción de hibridación de la secuencia de nucleótidos; y

ES 2 321 274 T3

(iii) correlacionar los resultados de la etapa de detección (ii) con la presencia o ausencia de resistencia al multifármaco en la bacteria.

5 También se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de una bacteria que tiene multifármaco otorgado por la presencia de una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con la presente invención, que comprende las etapas de:

- 10 (i) con una muestra tomada de un paciente;
- (ii) poner en contacto dicha muestra con un reactivo específico a dicha bomba de eflujo multifármaco, estando seleccionado dicho reactivo del grupo que está constituido por:
 - 15 (a) un anticuerpo o fragmento de unión a un antígeno del mismo específico frente a un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20, y
 - (b) una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID N°: 2;
- 20 (iii) detectar cualquier reacción de unión anticuerpo - antígeno o reacción de hibridación de la secuencia de nucleótidos; y
- (iv) correlacionar los resultados de la etapa de detección (iii) con la presencia o ausencia de una bacteria que tiene resistencia al multifármaco.

25

Las muestras de pacientes usadas en cualquiera de tales procedimientos puede comprender por ejemplo sangre, suero, aspirados bronquiales o esputo.

30 También se describe en la presente memoria descriptiva un procedimiento para el tratamiento de infección de un paciente por medio de un organismo que expresa una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con la presente invención, que comprende la administración al paciente de una composición antimicrobiana de acuerdo con la presente invención, es decir, que comprende un inhibidor de una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con la presente invención y al menos un antibiótico.

35

Tales procedimientos de tratamiento son particularmente útiles para los enfermos de Fibrosis Quística, quienes son particularmente propensos a la infección por parte de organismos resistentes a multifármacos, y por eso el paciente puede ser un enfermo de Fibrosis Quística.

40 También se proporciona de acuerdo con la presente invención un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20 y que expone un epítipo. También se describe en la presente memoria descriptiva secuencias inmunogénicas homólogas a las secuencias de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20 y que exponen un epítipo (es decir, variantes reconocidas por el mismo anticuerpo) y secuencias heterólogas que comprenden secuencias inmunogénicas (una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20 que exponen un epítipo y secuencias inmunogénicas homólogas a ésta) fusionadas a otra secuencia.

45

También se describe en la presente memoria descriptiva un procedimiento para otorgar resistencia antibiótica a un organismo que comprende introducir una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con la presente invención en dicho organismo. Así pues, de acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona un organismo no humano distinto a *Burkholderia cepacia* en el que se ha introducido una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con la presente invención.

50

Adicionalmente se describe en la presente memoria descriptiva un vehículo de datos que comprende la secuencia de una molécula de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID N° 1 - 4, 7 - 22. El vehículo de datos puede ser un vehículo de datos legible por máquina, por ejemplo un disco de ordenador o CD.

55

También se describe en la presente memoria descriptiva un procedimiento para analizar una secuencia de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID N° 1 - 4, 7 - 22, comprendiendo dicho procedimiento uno o más de lo siguiente: determinar el grado de identidad de la secuencia de homología de dicha secuencia con otra secuencia, determinar la estructura secundaria de la secuencia, determinar el peso molecular de la estructura, y determinar las características químicas e inmunológicas de la secuencia. Los procedimientos para analizar las secuencias de proteínas y ácidos nucleicos de la presente invención incluyen los conocidos en la técnica, por ejemplo como se describe en: Lesk, A.M. (ed.), 1988 (arriba); Griffin, A. M. & Griffin, H.G. (ed.), 1994 (arriba); von Heinje, G., 1987 (arriba); and Gribskov, M. & Devereaux, J. (ed.), 1991 (arriba).

65

También se describe en la presente memoria descriptiva una base de datos que incorpora una cualquiera de SEQ ID N° 1 - 4, 7 - 22 y un ordenador establecido para analizar una cualquiera de SEQ ID N° 1 - 4, 7 - 22.

ES 2 321 274 T3

La invención será además evidente a partir de la siguiente descripción que muestra a modo de ejemplo solamente una forma de bomba de flujo multifármaco.

Experimentación

5

Materiales y procedimientos

Cepas bacterianas de plásmidos

10 *B. cepacia* J2315 Edinburgh se obtuvo de un paciente con Fibrosis Quística. Se obtuvieron sueros de pacientes infectados con Fibrosis Quística con cultivo de esputo positivo repetido para detectar la presencia de *B. cepacia*. El cultivo microbiano y la identificación bioquímica se llevó a cabo para confirmar la identidad.

Aislamiento de ADN y preparación de la genoteca de lambda ZAPII

15

Se aisló ADN y se restringió de acuerdo con Goldbang, N. y col. (1996, J. Clin. Pathol., 49: 861 - 863) para producir un digerido parcial con la enzima Sau 3a. Se preparó una genoteca ZAPII lambda con un intervalo de tamaño de inserción de 3 - 5 kb de acuerdo con los protocolos de Clontech Laboratories Inc., Cambridge, Inglaterra.

20

Selección de anticuerpos

Se tomó suero de un paciente con infección del torax debida a *B. cepacia* y se usó para la selección de anticuerpos. Se infectaron células de *Escherichia coli* XL1 - Azul con el fago lambda ZAPII sobre agar en caldo L (bacto-triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, maltosa 2 g/l, bacto-agar 15 g/l) en placa c. 3000 pfu/85 mm. Esto se incubó a 42°C durante 3 horas. Las placas se transfirieron a filtros de nitrocelulosa (0,45 µm de tamaño de poro; Sartorius AG, Goettingen, Alemania), impregnadas con isopropil β-D tiogalactopiranosida (IPTG) 10 mM, a 37°C durante 2 horas. Estos filtros se bloquearon durante toda la noche a 4°C con albúmina de suero bovino (BSA; Sigma) al 3% en solución salina tamponada (NaCl 150 mM, Tris 10 mM). Se añadió el suero diluido 100 veces en BSA al 3% a los filtros y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas, los filtros se lavaron durante 30 minutos en solución de lavado (NaCl 150 mM, Tween 20 al 0% - 05%), antes de añadir el segundo anticuerpo, anti IgG humano conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma) diluida 1000 veces en BSA al 3%. Después de 1 hora a temperatura ambiente, los filtros se volvieron a lavar y se tiñeron con volúmenes iguales de naftol ASMX fosfato (0,4 mg/ml en agua destilada, Sigma) y sal de Fast Red TR (6 mg/l en Tris 0,2 M, pH 8,2; Sigma) (el tinte de Fast Red). Las placas positivas se transfirieron a tubos de 1,5 ml que contenían 200 µl de SM (NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgSO₄ 10 mM, gelatina al 0,001%), y de dos a tres gotas de cloroformo. Se realizó la purificación de las placas repitiendo lo anterior. Esto lleva a la identificación de una placa positiva que se secuenció posteriormente y esto produjo una fase de lectura abierta que comienza en el aminoácido 46 y que continúa en el extremo carboxi de la proteína.

40

La búsqueda de la base de datos reveló que ésta no era una secuencia completa de tal forma que se necesitó clonación adicional para identificar el extremo aminoácido completo de la molécula. A este efecto se realizó una sonda marcada con digoxigenina por medio de la reacción en cadena con polimerasa de tal forma que se podía volver a seleccionar la genoteca. Los cebadores para esto eran el extremo amino EMRC (SEQ ID N°: 4) y el extremo carboxi EMRN (SEQ ID N°: 3).

45

Síntesis de la reacción en cadena con polimerasa (PCR) derivada de la sonda marcada con digoxigenina

Se usaron alícuotas de 2 µl de ADN de plásmido pMKC purificado para la PCR en un volumen de reacción final de 100 µl en Tris-HCl 10 mM (pH 8,8) KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM (Perkin Elmer) que contenía 100 pmol/µl de cada de cebador EMRC y EMRN (véase Tabla 1), 200 µM de cada digoxigenin-11-uridina-5'-fosfato marcado dNTPs (Boehringer Mannheim) y 5U Taq ADN polimerasa (Perkin Elmer). La mezcla de la reacción se sometió a una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos y la PCR se realizó sobre un ciclador térmico GeneAmp 9600 (Roche Diagnostic Systems) como sigue: 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto. Después de la terminación de 30 ciclos, la reacción se mantuvo a 72°C durante 7 minutos y después se enfrió a 4°C. Se incluyeron los tubos de control sin plantilla ADN.

55

Los productos amplificados se resolvieron por electroforesis en gel en 100 ml de gel de agarosa al 1,0% (p/v) en tampón 1 X Tris - acetato (TAE), que contiene 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Se incluyeron los marcadores moleculares (el ADN digerido con EcoRI/HindIII de Goldbang, N. y col., 1996, arriba) y los productos por PCR se resolvieron por electroforesis a 80 V durante 1 hora.

60

Medios y reactivos

Caldo NZY (por litro):

65

NaCl 5 g, MgSO₄ 2 g, 7H₂O, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NZ amina (hidolisato de caseína) se añadió a agua desionizada hasta un volumen final de 1 litro. El pH se ajustó a 7,5 con NaOH y se esterilizó por medio de autoclave a 15 lb/sq.in durante 15 minutos.

ES 2 321 274 T3

Agar NZY (por litro)

NaCl 5 g, MgSO₄ 2 g, 7H₂O, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NZ amina (hidolisato de caseína) y 15 g de agar se añadió a agua desionizada hasta un volumen final de 1 litro. El pH se ajustó a 7,5 con NaOH y se esterilizó por medio de autoclave a 15 lb/sq.in durante 15 minutos. El agar se dejó enfriar y después se vertió en placas de petri.

Top agar NYZ (por litro)

A 1 litro de caldo NZY al 0,7% (p/v) se añadió agarosa y se esterilizó por medio de autoclave a 15 lb/sq.in durante 15 minutos. Antes de usarse, el top agar se fundió y se enfrió a 48°C.

Agar LB-kanamicina (por litro)

NaCl 10 g, triptona 10 g, 5 g de extracto de levadura y 20 g de agar se añadió a agua desionizada hasta un volumen final de 1 litro. El pH se ajustó a 7,5 con NaOH y se esterilizó por medio de autoclave a 15 lb/sq.in durante 15 minutos. El agar se dejó enfriar a 55°C antes de la adición de 50 mg de kanamicina esterilizada por filtro y después se vertió en placas de petri.

20 X SSC (por litro)

Se disolvieron NaCl 175,3 g y 88,2 g de citrato de sodio en 800 ml de agua desionizada. El pH se ajustó a 7,0 usando NaOH, y el volumen se completó hasta 1 litro con agua desionizada y después se esterilizó por medio de autoclave a 15 lb/sq.in durante 15 minutos.

Tampón 50 X Tris-acetato (TAE):

Se añadió 242 g de base de Tris a 57,1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0,5 M (pH 8,0) y el resto del volumen se completó hasta 1 litro con agua desionizada y después se esterilizó por medio de autoclave a 15 lb/sq.in durante 15 minutos.

Acetato de sodio - pH 5,2

Se disolvió 4,08g de NaC₂H₃O₃·3H₂O en 8 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 5,2 con ácido acético diluido, el volumen se completó hasta 10 ml y la solución se esterilizó por medio de autoclave a 15 lb/sq.in durante 15 minutos.

Selección de la genoteca genómica de B. cepacia

Preparación de los cultivos en placas:

Se inoculó caldo de NZ amina y extracto de levadura (NZY), suplementado con maltosa al 0,2% (p/v) y MgSO₄ 10 mM, con una sola colonia de *E. coli* XL 1-Azul MRF y se cultivó durante toda la noche a 37°C. El cultivo bacteriano se recogió por centrifugación a 4500 x g durante 15 minutos y el sedimento se volvió a suspender en MgSO₄ 10 mM muy frío hasta obtener una densidad óptica (OD) (600 nm) de 0,5. Se añadió 200 µl del cultivo bacteriano vuelto a suspender a la genoteca de bacteriófagos diluidos 10⁻² y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Se añadió 3 ml de NZY top agar (48°C) y las células infectadas se vertieron sobre una placa de NZY agar y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

Recubrimiento de las membranas de nylon

Cada placa de agar, que contiene placas, se recubrió con una membrana de nylon durante 2 minutos. La membrana se desnaturalizó en NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M durante 2 minutos y después se desnaturalizó en NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M (pH 8,0) durante 5 minutos antes de lavarse brevemente en Tris-HCl 0,2 M (pH 7,5) 2 x solución tamponada con citrato de sodio salino (SSC). La membrana se transfirió brevemente sobre papel Whatman (RTM) 3 mm y el ADN se reticuló a la membrana usando el reticulador Stratalinker (RTM) UV establecido a una energía UV de 120.000 µJ durante 30 segundos. Las placas de agar de la transferencia se almacenaron a 4°C.

Hibridación de las membranas de nylon

Las membranas de nylon se pre-hibridaron a 68°C en tampón de hibridación (5 x SSC, reactivo de bloqueo al 1% (p/v) (añadido a partir de solución de bloqueo estéril al 10%), N-lauroilsarcosina al 0,1% (p/v), sodio dodecil sulfato (SDS) al 0,02% (p/v)). Después de 2 horas, el tampón de hibridación se sustituyó con tampón de hibridación recién preparado que contiene una sonda marcada con digoxigenina a una concentración final de 500 ng/ml y se incubó durante toda la noche a 68°C. Los filtros se volvieron a lavar 2 x 5 minutos en 2 x SSC, SDS al 0,1% a temperatura ambiente y después 2 x 15 minutos en 0,1 x SSC, SDS al 0,1% a 68°C.

ES 2 321 274 T3

Detección inmunológica

Se identificaron los clones positivos usando el Kit de Detección de ADN DIG (Boehringer Mannheim). La membrana se lavó brevemente en tampón de lavado (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M (pH 7,5)) que contiene Tween 20 al 0,3% (p/v) antes de incubar durante 30 minutos en 100 ml de solución de bloqueo (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M (pH 7,5) que contiene reactivo de bloqueo hasta una concentración final del 1% (p/v)). La membrana se transfirió al conjugado anti-digoxigenina-AP 150 mU/ml en 20 ml de solución de bloqueo y se incubó durante 30 minutos. Se eliminó cualquier conjugado de anticuerpo no unido por medio del lavado 2 x 15 minutos en 100 ml de tampón de lavado (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M (pH 7,5)). La membrana se equilibró durante 2 minutos en tampón que contiene Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM (pH 9,5) antes de la incubación con 10 ml de solución de sustrato de color (solución madre 200 μ l NBT/NCIP (Boehringer Mannheim) a 10 ml de Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM (pH 9,5) en la oscuridad. Después de la incubación durante toda la noche la reacción se detuvo por medio del lavado de la membrana en 50 ml de tampón que contiene Tris-HCl 100 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0). Todas las etapas, excepto la reacción de color, se llevaron a cabo con agitación. Se purificaron adicionalmente aislados positivos por medio de selección secundaria y terciaria.

Escisión de un solo clon del vector Express ZAP

(i) *Preparación del vector fagémido pBK-CMV escindido*

Se cultivaron a 37°C durante toda la noche cultivos distintos de *E. coli* XL 1-Azul MRF, suplementados con maltosa al 0,2% (p/v), y *E. coli* XL0LR en caldo NZY. Los cultivos bacterianos se recogieron por centrifugación a 4500 x g durante 15 minutos y se volvieron a suspender en MgSO₄ 10 mM muy frío hasta obtener una OD (600 nm) de 1,0. En un tubo de polipropileno Falcon 2059 se añadió lo siguiente: 200 μ l de *E. coli* XL1-Azul MRF a una OD (600nm) de 1,0, 250 μ l de solución madre de fago (>1 x 10⁵ partículas de fago) y 1 μ l de fago auxiliar ExAssist (> 1 x 10⁶ pfu/ml) y se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Se añadió 3 ml de caldo NZY y la mezcla de la reacción se incubó a 37°C durante 3 horas, con agitación. La mezcla de la reacción se calentó a 65°C - 70°C durante 20 minutos seguido de centrifugación a 4500 x g durante 15 minutos. El sobrenadante (que contenía el vector fagémido pBK-CMV escindido envasado en forma de partículas de fago filamentosas) se decantó en un tubo de polipropileno Falcon 2059 recién preparado y se almacenó a 4°C.

(ii) *Sembrado en placas de los vectores de fagémidos escindidos*

200 μ l de células XL0LR recientemente cultivadas a una OD (600 nm) de 1,0 se añadieron a 10 μ l y 100 μ l del sobrenadante del fago y se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Se añadió 300 μ l de caldo NZY y la mezcla de la reacción se incubó durante 45 minutos adicionales. 200 μ l de la mezcla de células de cada mezcla de la reacción se sembraron en placas de agar LB-kanamicina (50 μ g/ml) y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Las placas se almacenaron a 4°C y se realizaron soluciones madre de glicerol de una sola colonia purificada y se almacenaron a -80°C.

(iii) *Purificación de ADN con Wizard (RTM) Plus SV Midiprep*

ADN de plásmido, que contiene inserciones de ADN, se purificó usando el Kit de purificación Wizard (RTM) Plus SV Midiprep (Promega). 50 ml caldo NZY, suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina, se inoculó con una sola colonia de *E. coli* (que contiene la inserción y plásmido pBK-CMV) y se cultivó durante toda la noche a 37°C. El cultivo bacteriano se recogió por centrifugación a 4500 x g durante 15 minutos y el sedimento se volvió a suspender en 3 ml de solución de resuspensión celular en Wizard (RTM) Plus SV Midiprep. Las células se lisaron por medio de la adición de 3 ml de solución de lisis celular en Wizard (RTM) Plus SV Midiprep. El lisado se dejó en hielo durante 30 minutos antes de agitar enérgicamente y después se centrifugó a 14000 x g durante 30 minutos a 4°C. El lisado depurado se añadió a 10 ml de resina de resuspensión a 30°C en Wizard (RTM) Plus SV Midiprep y se transfirió a una midicolumna de Wizard (RTM) Plus SV Midiprep. Se aplicó vacío para empujar la resina / ADN en la midicolumna y la columna se lavó 2 x en 15 ml de solución de lavado en columna de Wizard (RTM) Plus SV Midiprep y se secó durante 30 segundos. La midicolumna se transfirió a una eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 10000 x g en una microcentrifugadora durante 2 minutos para eliminar cualquier solución de lavado de columna residual. El ADN de plásmido se eluyó con 300 μ l de agua libre de nucleasa a 65°C - 70°C por centrifugación a 10000 x g durante 20 segundos. Se eliminó cualquier resina fina por centrifugación a 10000 x g durante 5 minutos.

La concentración de ADN se calculó usando el Gene Quant (Pharmacia Biotech) y se comprobó la pureza por electroforesis en gel sobre un gel de agarosa al 1% (p/v) en 1 x TEA teñido con 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio.

Secuenciación de ADN en ABI

50 ng/kb de ADN de plásmido e inserción, en un volumen de reacción final de 10 μ l, se añadió a 1,6 pmol de cebador apropiado (véase Tabla 1) y 4 μ l de mezcla de terminador con colorante grande de d-Rhodamina (Applied Biotechnologies). La mezcla de la reacción se sometió a una desnaturalización inicial a 96°C durante 4 minutos y después se amplificó parcialmente en un ciclador térmico GeneAmp 9600 (Roche Diagnostic Systems) como sigue: 96°C durante 30 segundos, 50°C durante 15 segundos, 60°C durante 4 minutos. Después de completar 25 ciclos, la mezcla de la reacción se completó hasta 100 μ l con agua libre de nucleasa. El ADN se precipitó por medio de la

ES 2 321 274 T3

adición de 2,5 volúmenes de etanol muy frío al 95% y 3 μ l de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de la reacción se centrifugó a 18000 x g durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se añadió 250 μ l de etanol muy frío al 70% al sedimento de ADN y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de la reacción se centrifugó a 18000 x g durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se secó por exposición al aire. El ADN se secuenció sobre un ABI 377 Prism.

Identificación de epitopes de la proteína BcrA

Una serie de nonapéptidos de solapamiento que cubren la secuencia de aminoácidos derivados de la proteína BcrA (SEQ ID N° 2) se sintetizaron sobre varillas de polietileno con reactivos a partir de un kit de exploración de epitopes (Cambridge Research Biochemicals, Cambridge, Reino Unido) como describieron Geysen y col. (1987, Journal of Immunological Methods, 102: 259 - 274). Después los péptidos se usan como base de un ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) para detectar anticuerpos específicos en suero de pacientes con CF infectados con *B. cepacia*. Los valores de absorbancia resultantes del ELISA se usan para determinar dónde están situados los epitopes.

Generación de programas de síntesis

Los 518 aminoácidos y residuos de la proteína BcrA de *B. cepacia* (SEQ ID N° 2) se metieron en el programa de software Chiron Development (Chiron Technologies). A partir de estas secuencias se generaron programas de síntesis que permitieron que la proteína BcrA estuviera representada en forma de una serie de péptidos de solapamiento secuencial, cada nueve aminoácidos de longitud. Cada péptido difería del anterior por un solo aminoácido: es decir, el péptido uno estaba constituido por los aminoácidos 1 a 9; el péptido dos estaba constituido por los aminoácidos 2 a 10, etc. Esto continuó hasta que se cubrió la longitud total del gen BcrA.

Síntesis de péptidos

Los péptidos se sintetizaron sobre varillas de polietileno dispuestas en un formato de microtítulos convencional. La síntesis de los péptidos se realizó de acuerdo con la metodología del manual de síntesis de péptidos no escindibles de Chiron Technologies.

Aminoácidos

Los aminoácidos usados eran ésteres activos, que tenían sus grupos amino protegidos con el grupo 9-fluorenylmecarboxilato (Fmoc) (Sigma, Calbiochem). Los péptidos se sintetizaron a una velocidad de un aminoácido por varilla, por día.

Desprotección y lavado de Fmoc

La eliminación del grupo de protección Fmoc se consiguió de la siguiente forma: se sumergieron bloques de varillas de polipropileno en un baño que contenía piperidina al 20% en dimetilformamida (DMF) (BDH Chemicals Ltd.) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los bloques se eliminaron y después se lavaron en un baño de DMF durante 2 minutos. Se sacudió el exceso de DMF y las varillas se sumergieron en un baño de metanol (BDH Chemicals Ltd.) durante 2 minutos. La etapa de lavado se repitió tres veces, cada vez usando un baño de metanol recién preparado. Los bloques se dejaron secar al aire en una campana libre de ácido durante 30 minutos.

Preparación de aminoácidos para acoplamiento:

Los aminoácidos se pesaron para proporcionar una concentración final de 100 mM y se disolvieron en un volumen de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (Sigma Chemical Co.) en DMF como se especifica en el programa.

Reacción de acoplamiento:

Se dispensaron 100 μ l de los ésteres aminoácidos de Fmoc en los pocillos de las placas de microtítulos de polipropileno, como se especifica en el programa. Los bloques de varillas desprotegidas se colocaron en los pocillos, se sellaron en una bolsa de plástico limpia y se dejaron durante toda la noche a temperatura ambiente.

Procesamiento de los bloques después del acoplamiento:

Los bloques de varillas se eliminaron de las soluciones de aminoácidos y se colocaron en un baño de metanol durante 5 minutos a temperatura ambiente, con agitación. Después de dejarse secar al aire durante 2 minutos, los bloques se colocaron en un baño de DMF durante 5 minutos. Las etapas de desprotección, lavado, acoplamiento y lavado continuaron hasta que los aminoácidos se acoplaron y todos los péptidos se sintetizaron en las varillas.

Desprotección de la cadena lateral:

Todos los grupos de protección para proteger las funciones de la cadena lateral se eliminaron colocando los bloques de varillas en una mezcla de ácido trifluoroacético, anisol y etanoditiol (Sigma Chemical Co.) (19:1: 1 v/v) durante 3

ES 2 321 274 T3

horas a temperatura ambiente. Después los bloques se sumergieron completamente en metanol durante 10 minutos y después se remojaron en ácido acético glacial al 0,5% (BDH Chemicals Ltd.) en metanol / agua (1:1 v/v) durante 1 hora. Los bloques se sumergieron dos veces más en baños de metanol durante 2 minutos y después se dejaron secar al aire durante toda la noche en una campana libre de ácido.

5

Recogida de suero de pacientes con CF:

Se recogió un total de 17 sueros, uno de cada uno de los 17 pacientes con CF, en la Unidad de Fibrosis Quística del Hospital Wythenshawe, Manchester, Reino Unido. Los sueros del grupo 1 (n = 5) se recogieron de pacientes con CF infectados con *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia*, los sueros del grupo 2 (n = 4) se recogieron de pacientes con CF infectados con *P. aeruginosa*, los sueros del grupo 3 (n = 2) se recogieron de pacientes con CF sin indicación alguna de infección con *P. aeruginosa* ni *B. cepacia*, los sueros del grupo 4A (n = 4) se recogieron de pacientes con CF infectados con *B. cepacia* pero que se encontraban bien, y los sueros del grupo 4B (n = 2) se recogieron de pacientes con CF infectados con *B. cepacia* que no se encontraban bien y estaban hospitalizados.

15

Ensayo ELISA:

Etapa de bloqueo: 150 μ l de albúmina de suero bovino (BSA) al 3%, (Sigma Chemical Co.) en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se dispuso en cada pocillo de una Placa de Microtítulos Falcon 3912. Los bloques de varillas se colocaron en los pocillos y se dejaron durante 1 hora a temperatura ambiente sobre una plataforma de agitación a 100 rpm.

20

Adición de suero del ensayo: 150 μ l de una dilución 1 en 500 del suero del ensayo en BSA al 3% en PBS se dispuso en placas de microtítulos. Las varillas se colocaron en los pocillos y se incubaron durante toda la noche a 4°C.

25

Etapa de lavado: Después de la incubación, las varillas se lavaron 4 x 10 minutos en un baño de PBS 0,01 M (pH 7,2). Entre los lavados, las varillas se agitaron y se transfirieron para eliminar el exceso de solución de lavado.

30

Adición de inmunoglobulina G (IgG): Después del lavado, las varillas se colocaron en placas de microtítulos que contenían 100 μ l de anti-inmunoglobulina G (IgG) humana conjugada con peroxidasa de rábano picante (Sigma Chemical Co.) diluida 1 en 2000 en BSA al 3% en PBS. Las varillas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente sobre una plataforma de agitación a 100 rpm.

35

Etapa de lavado: Antes de la reacción del sustrato, las varillas se lavaron con 4 x 10 min. en un baño de PBS 0,01 M (pH 7,2). Entre los lavados, las varillas se agitaron y se transfirieron para eliminar el exceso de solución de lavado.

40

Reacción del sustrato: se disolvió 0,5 mg/ml de ácido 2,2'-Azino-bis(3-Etilbenziazolina-6-Sulfónico) (ABTS) (Sigma Chemical Co.) en 100 ml de tampón citrato (pH 4,0). A este tampón se añadió peróxido de hidrógeno al 0,01% (v/v) (Sigma Chemical Co.). Se dispuso 150 μ l en placas de microtítulos. Las varillas se colocaron en los pocillos y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos sobre una plataforma de agitación a 100 rpm. La eliminación de las varillas de los pocillos detuvo la reacción. Las placas de microtítulos se leyeron usando un Titertek Multiskan® Plus Microplate Reader a una longitud de onda de 405 nm.

45

Eliminación de anticuerpos de las varillas

El anticuerpo unido se eliminó de las varillas por sonicación en un baño ultrasónico Decon (Decon Laboratorios) que contenía una solución de PBS 0,01 M/SDS al 1% (p/v) y urea al 0,1% (p/v) (Sigma Chemical Co.) durante 20 minutos a 60°C. Después de la sonicación las varillas se lavaron 2 x 30 segundos en agua calentada a 60°C seguido de un lavado adicional en agua (60°C) durante 1 hora. Las varillas se colocaron en un baño que contenía metanol en ebullición durante 30 segundos y después se dejaron secar al aire durante un mínimo de 30 minutos. Después las varillas estaban listas para analizar el siguiente suero.

50

Recogida de datos de absorbancia

Después de analizar todos los sueros, se recogieron los valores de absorbancia a 405 nm para cada péptido y se estableció la secuencia de aminoácidos de los epitopes. Los epitopes se determinaron por medio del análisis de los valores para el Grupo 3 y Grupo 4, y en comparación con los otros Grupos. Los péptidos se definieron como un procesamiento de péptidos (de tres o más residuos de aminoácidos) con diferencias de valores de absorbancia entre el Grupo 4A y Grupo 3 de más de 0,8.

60

Los resultados de la identificación de epitopes (Tabla 3) identificaron siete epitopes expuestos por la proteína, que tienen SEQ ID N°: 11 - 17. Otros cuatro epitopes putativos expuestos por la proteína tienen SEQ ID N°: 7 - 10.

65

ES 2 321 274 T3

Preparación de la genoteca de exposición de anticuerpos de proteínas y péptidos en la cápsida de fagos y scFv

La genoteca de exposición de anticuerpos de proteínas y péptidos en la cápsida de fagos y scFv se produjo esencialmente como se describe anteriormente (Burnie y col., 2000, *Infection & Immunity* 68: 3200 - 3209, que se incorpora en la presente memoria descriptiva mediante referencia). Brevemente, el ARBm se preparó a partir de 20 ml de sangre periférica del paciente por medio de la separación de linfocitos sobre Ficoll seguido de la extracción con tiocianato de guanidinio y purificación de una columna de oligo (dT)-celulosa (Quick Prep mRNA; Pharmacia, St Albans, Reino Unido). La síntesis de la primera hebra de ADNc se realizó con un cebador de región constante para todas las subclases de cadenas pesadas de IgG humana (HulgG1 a -4) usando transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (HT Biotechnology, Cambridge, Reino Unido). Los genes de dominio variable de la cadena pesada se amplificaron por PCR primarias con cebadores directos (HuJH1 a -6) e inversos (HuVH1 1a a 6a) basados en la familia (todas las secuencias del cebador de IgG anteriormente mencionadas se proporcionan en Marks, J.D. y col., 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581 - 597, que se incorpora en la presente memoria descriptiva mediante referencia). Un sitio de restricción Sfi1 se introdujo cadena arriba al producto generado de nuevo VH3a antes de ensamblar con una reserva diversa de genes de dominio variable de cadena ligera. Este último también introdujo un fragmento de unión (Gly₄ Ser₃) y un sitio Not1 cadena abajo. Por medio del uso de los sitios de restricción de enzimas Sfi1 y Not1, el producto se clonó unidireccionalmente en un vector fagémido. El vector ligado se introdujo en TG1 de *E. coli* por electroforación, y los fagos se rescataron con el fago auxiliar M13K07 (Pharmacia).

Tamizado de péptidos:

Para enriquecer el scFV específico de antígenos, la genoteca de exposición de proteínas y péptidos en la cápsida de fagos se tamizó contra péptidos de 15 mer que representan cuatro de los epitopes delineados por la identificación de epitopes. Péptido 1: AIIISFGFMAFFGSVV (SEQ ID NO: 18), que incorpora el Epitope 2 (SEQ ID N°: 12) y Epitope 3 (SEQ ID N°: 13); Péptido 2: SVVIFPLWQTVMGYT (SEQ ID N°: 19), que incorpora el Epitope 4 (SEQ ID N°: 14); y Péptido 3: HRLDRMVASFAFHR (SEQ ID N°: 20), que incorpora el Epitope 5 (SEQ ID N°: 15). El tamizado se realizó en inmunotubos recubiertos con péptidos (10 ng/ml) o el transportador purificado (1 mg/ml). Los fagos unidos se eluyeron con TG1 de *E. coli* en fase de logaritmo. Después del rescate con M13K07, los fagos se volvieron a tamizar contra el péptido unas tres veces más. La toma de huellas de ADN de BstN1 (New England Biolabs, Hitchin, Reino Unido) se usó para confirmar el enriquecimiento de scFv específico después de rondas sucesivas de tamizado.

Clonación del bcrA en pBAD-TOPO

Antes de que se realizaran las pruebas de sensibilidad antibiótica, el gen bcrA se clonó usando pBAD-TOPO (Invitrogen) en *E. coli* TOP10.

Amplificación inicial

La amplificación del gen bcrA se realizó en un ciclador térmico GeneAmp 9600 (Roche Diagnostic Systems) con mezclas de PCR que contenían 1 μ l de ADN de plásmido BcrA purificado (aproximadamente 1 μ g de ADN) en un volumen de reacción final de 25 μ l en Tris-HCl 10 mM (pH 8,8), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM y que contenía 200 μ M de cada desoxinucleósido trifosfato, 25 pmol/ μ l cada cebador directo de BcrA (5' CGA CGT CGC GGT GCC GAC GAT - SEQ ID N°: 21) y cebador inverso de BcrA (5' ATG CCC CAT CGC CGG CCC CGC - SEQ ID N°: 22), y 5 U de Taq ADN polimerasa (Boehringer Mannheim). Las condiciones de ciclación térmica eran una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C seguido 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C, y 1 minuto a 72°C. Después de la amplificación las muestras se incubaron a 72°C y después se mantuvieron a 4°C. Los productos amplificados se resolvieron por medio de electrofóresis en gel en agarosa al 1% en tampón Tris acetato, que contenía 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio. Se retiraron las bandas del gel y se fundieron por calentamiento a 65°C durante 10 minutos.

*Clonación de bcrA en pBAD-TOPO y transformación en *E. coli* TOP10:*

Se añadió 3 μ l de producto PCR recién preparado a 1 μ l del vector BAD-TOPO en un volumen de reacción final de 5 μ l y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. 2 μ l de la reacción de clonación de pBAD-TOPO se añadió a un vial de un disparo químicamente competente de *E. coli* TOP10 y se incubó durante 30 minutos. Después las células se chocaron por calor a 42°C antes de la incubación en hielo durante 2 minutos. Después de la adición de 250 μ l de medio SOC las células se incubaron horizontalmente a 37°C durante 1 hora, la transformación se expandió sobre una placa de ampicilina LB precalentada (100 μ g/ml) y se incubó durante toda la noche a 37°C.

Análisis de clones positivos

Se analizaron clones positivos por PCR. La amplificación se realizó en un ciclador térmico GeneAmp 9600 (Roche Diagnostic Systems) con mezclas de PCR que contenían 1 μ l de ADN de plásmido purificado extraído de clones positivos usando el Qiagen Mini Prep Protocol (Qiagen) en un volumen de reacción final de 25 μ l en Tris-HCl 10 mM (pH 8,8), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM que contenía 200 μ M de cada desoxinucleósido trifosfato, 25 pmol/ μ l de cebador directo interno e inverso del vector y 5 U de Taq ADN polimerasa (Boehringer Mannheim). Las condiciones de ciclación térmica eran una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C seguido 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C, y 1 minuto a 72°C. Después de la amplificación las muestras se incubaron a 72°C y después se mantuvieron a 4°C. Los productos amplificados se resolvieron por medio de electrofóresis en gel en agarosa al 1% en

ES 2 321 274 T3

tampón Tris acetato, que contenía 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Las soluciones madre de glicerol se realizaron de los clones positivos

Expresión del producto de PCR:

5 Para cada transformante, 2 ml de LB que contenían 100 µg/ml de ampicilina se inoculó con una sola colonia de *E. coli* y se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación. 0,1 ml de este cultivo durante toda la noche se añadió a 10 ml de LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina. La expresión de la proteína se indujo por medio de la adición de L-arabinosa al 20%, 2%, 0,2% y 0,002% y se incubó a 37°C con agitación durante 4 horas. El cultivo se sedimentó por centrifugación a 5000 x g durante 10 minutos y se volvió a suspender en 450 µl de SDS al 10% y 50 µl de DTT 10 mM (oxidado). El sedimento resuspendido se almacenó a -20°C hasta lo necesario para el procesamiento.

Análisis SDS-PAGE

15 Se llevaron a ebullición muestras bacterianas a 100°C durante 15 minutos. Se añadió una muestra bullida de 12 µl a 3 µl de muestra de tampón SDS-PAGE (SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida) y se llevaron a ebullición a 100°C durante 5 minutos. Se procesó 10 µl sobre un gel NOVEX y se procesó durante 35 minutos a 200 V y después se transfirieron sobre PVDF a 25 V durante 1 hora.

Transferencia de Western:

20 La transferencia se bloqueó inicialmente leche en polvo al 2% en PS que contenía Tween-20 (MPBST) durante 1 hora a 37°C. La transferencia se lavó 2 x 10 minutos en tampón de lavado (NaCl al 0,9% (p/v), Tween-20 al 0,01%). La transferencia se incubó en dilución 1:5000 de anti epitope V5 (Invitrogen) en MPBST durante 1 hora a temperatura ambiente y después se lavó 3 x 10 minutos en tampón de lavado. La transferencia se incubó con dilución 1:5000 de conjugado con fosfatasa alcalina anti-ratón (Sigma) en MPBST durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó 3 x 10 minutos en tampón de lavado. La reacción de color se indujo por adición de 1 comprimido de BCIP/NBT (Sigma) a 10 ml de agua durante <10 minutos.

Determinación de la MIC por medio del procedimiento de dilución en caldo de microtítulos

30 Se cultivaron *E. coli* TOP10 con o sin (±) *bcrA* hasta una concentración de 2×10^4 cfu/ml (*bcrA*+ se cultivó en presencia de 100 µg/ml de ampicilina para seleccionar el vector pBAD-TOPO) en medio RPMI (Sigma) en presencia de L-arabinosa al 0,002%, en forma del inductor del gen *bcrA*. 100 µl de *E. coli* TOP10 ± *bcrA* se dispensó en placas de microtítulo de 96 pocillos (Sigma) para proporcionar una concentración final de 1×10^4 cfu/ml. A cada pocillo se añadió diluciones de duplicación en serie de antibiótico, con la concentración variando de 500 µg/ml a 0,24 µg/ml. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C y se puntuaron por crecimiento o no crecimiento.

Demostración de actividad de los fagos contra ácido nalidíxico

40 Se cultivaron *E. coli* TOP10 + *bcrA* hasta una concentración de 2×10^4 cfu/ml en medio RPMI (Sigma) que contenía 100 µg/ml de ampicilina (para seleccionar el vector pBAD-TOPO) en presencia de L-arabinosa al 0,002%, en forma del inductor del gen *bcrA*. 100 µl de *E. coli* TOP10 + *bcrA*, a una concentración final de 1×10^4 cfu/ml, se dispensó en placas de microtítulo de 96 pocillos (Sigma) en presencia de fago puro y fago diluido 1:10 (véase tabla a continuación). A cada pocillo se añadió diluciones de duplicación en serie de ácido nalidíxico, con la concentración variando de 128 µg/ml a 0,25 µg/ml. Se estableció un control con solamente el medio. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C. Se analizaron seis clones de fagos.

Resultados

Secuenciación del gen bcrA

50 Una secuencia de 3500 bp de ADN se ha identificado y secuenciado. Dentro de la secuencia clonada había una sola fase de lectura abierta, que contenía la secuencia que codifica *bcrA* (SEQ ID N°: 1)

Estructura y situación de la proteína BcrA

55 La secuencia *bcrA* contenía una sola fase de lectura abierta que codifica una proteína, denominada BcrA (SEQ ID N°: 2), de 518 residuos de aminoácidos con un peso molecular previsto de 49 kD.

Comparación de la proteína BcrA con la secuencia de bombas de eflujo relacionadas

60 La secuencia de aminoácidos de BcrA se alineó con los productos codificados del gen *emrB* de *E. coli* y el gen *qacA* de *S. aureus*. Los resultados de una correspondencia de identidad usando la búsqueda de "alineal" (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/searchlauncher>) mostró que BcrA tenía homología del 48,8% con la proteína EmrB y el 20,1% con la proteína QacA. También se descubrió que BcrA tiene homología del 84,8% con la proteína AF 110185 de *Burkholderia pseudomallei*. Los datos de laboratorio muestran que BcrA es una bomba de antibiótico. No se encontraron sitios de unión de ATP conocidos en la secuencia de aminoácidos de BcrA, confirmando así que el gen

ES 2 321 274 T3

bcrA no pertenece a la familia del transportador de la casete de unión a ATP (ABC), si no a la familia MFS de bombas de eflujo.

Identificación del epítipo de la proteína BcrA

5 En la Tabla 3 se muestran los péptidos nonaméricos que muestran reactividad marcada con los sueros de los pacientes del Grupo 4A (pacientes con CF infectados con *Burkholderia cepacia* pero que se encuentran bien) en comparación con los sueros de pacientes del Grupo 3 (pacientes con CF sin indicación alguna de infección por *B. cepacia* ni *Pseudomonas aeruginosa*). Se identificaron siete epítopos a partir de la experimentación de identificación de epítopos, a saber: Epítipo 1: VISSYS (SEQ ID N°: 11), Epítipo 2: ISFGFMA (SEQ ID N°: 12), Epítipo 3: MAFFGS (SEQ ID N°: 13), Epítipo 4: QTVMGYT (SEQ ID N°: 14), Epítipo 5: LRMVASF (SEQ ID N°: 15), Epítipo 6: FFVPMTT (SEQ ID N°: 16) y Epítipo 7: LLHLSAI (SEQ ID N°: 17).

Genoteca de exposición de anticuerpos la de fagos y scFv

15 Cada uno de los péptidos 1 - 3 (SEQ ID N°: 18 - 20) produjo dos fagos con huellas dominantes diferentes. Estos se marcaron con fago 1 - 6 (con fagos 1 y 2 reactivos frente a Péptido 1, fagos 3 y 4 reactivos frente a Péptido 2 y fagos 5 y 6 reactivos frente a Péptido 3). El fago variaba en número en el tamizado final de 2 - 4 copias. La actividad de los fagos se evaluó frente al gen *bcrA* por medio de la clonación de éste en *E. coli* TOP10.

Expresión del gen *bcrA* en *E. coli* de TOP10

20 El análisis de Western confirmó que el gen *bcrA* se había clonado en *E. coli* TOP10 y se expresaba con un peso aparente de aproximadamente 46 kDa (no se muestran los resultados).

Resistencia antibiótica proporcionada por *bcrA* en *E. coli* TOP10

30 Los valores de la concentración inhibitoria mínima (MIC) de tetraciclina, clorohehexadina, ácido nalidíxico y ciprofloxacina de antibiótico frente a *E. coli* TOP10 ± *bcrA* se muestran en la Tabla 4. El gen *bcrA* no proporcionó resistencia frente a clorohehexadina y ciprofloxacina en *E. coli* TOP10. Por el contrario, se observó una diferencia de dos pocillos en MIC para tetraciclina y se observó una diferencia de tres pocillos en MIC para el ácido nalidíxico en *E. coli* TOP10 ± *bcrA* (Tabla 4).

Actividad de los fagos frente a la resistencia al ácido nalidíxico

35 Seis clones del fago *E. coli* TOP10 ± *bcrA* (fagos 1 y 2 reactivos frente a Péptido 1 [SEQ ID N°: 18]; fagos 3 y 4 reactivos frente a Péptido 2 [SEQ ID N°: 19]; y fagos 5 y 6 reactivos frente a Péptido 3 [SEQ ID N°: 20]) obtenidos a partir del experimento de tamizado (arriba) se analizaron para detectar la actividad frente al ácido nalidíxico (Tabla 5). En comparación con la MIC de los fagos de control (16 µg/ml), cuatro de los seis fagos mostraron actividad. La actividad se pronunció en su mayor parte con el Fago I (que mostró reactividad frente al péptido 1 (SEQ ID N°: 18).

Discusión

45 En las bacterias, en primer lugar se reseñaron bombas resistentes a multifármacos (mdr) en *Staphylococcus aureus* (Lomovskaya, O. y Lewis, K., 1992, arriba). También se reseñan bombas mdr simples en *Escherichia coli* (*emrB*) y en *Bacillus subtilis* (*bmr*) (Neyfakh, A.A, 1992, Antimicrobial Agents. Chemother., 36: 484 - 485). El gen *bcrA* de *Burkholderia cepacia* pertenece a esta familia de translocasas de membrana y puede proteger la célula de antibióticos y otras moléculas pequeñas.

50 La secuencia de aminoácidos traducida del gen *bcrA* muestra una elevada homología con la proteína EmrB de *E. coli* y la proteína QacA de *S. aureus*. Los datos de laboratorio muestran que el gen *bcrA* codifica una translocasa de membrana y pertenece a la familia MFS de bombas multi-eflujo.

55 La proteína BcrA tiene una estructura típica de una translocasa de membrana integral, con 10 α-hélices que rodean la membrana. La proteína BcrA muestra homología con otras membranas de la misma familia. La proteína es una diana terapéuticamente y diagnósticamente útil, y se puede usar en inmunización activa en forma de una vacuna, como una fuente de medicamentos de inmunización pasiva que comprende anticuerpos específicos contra ésta, y en el aislamiento de compuestos terapéuticamente y diagnósticamente útiles que actúan contra ésta.

60

65

ES 2 321 274 T3

TABLA 1

Descripción de los cebadores PCR seleccionados

| <u>Nombre del nucleótido</u> | <u>Secuencia</u> | <u>Descripción</u> |
|------------------------------|------------------|---------------------------------------|
| EMRN | SEQ ID N°: 3 | Situado en el extremo 5' del gen bcrA |
| EMRC | SEQ ID N°: 4 | Situado en el extremo 3' del gen bcrA |
| M13 Directo (-20) | SEQ ID N°: 5 | Cebador del vector |
| M13 Inverso | SEQ ID N°: 6 | Cebador del vector |
| BcrA Directo | SEQ ID N°: 21 | Situado en el extremo 5' del gen bcrA |
| BcrA Inverso | SEQ ID N°: 22 | Situado en el extremo 3' del gen bcrA |

Todos los cebadores de los oligonucleótidos se sintetizaron por HPLC de fase inversa (Genosys Biotechnologies Ltd) usando química de fosoramidita convencional.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 321 274 T3

TABLA 2

Dominios de transmembrana de la proteína BcrA

5
10
15
20
25
30
35
40
45

| Hélice | Principio | Final | Puntuación | Certeza |
|--------|-----------|-------|------------|----------|
| 1 | 16 | 36 | 1,877 | Cierto |
| 2 | 41 | 61 | 1,089 | Cierto |
| 3 | 64 | 84 | 1,478 | Cierto |
| 4 | 92 | 112 | 1,918 | Cierto |
| 5 | 120 | 140 | 0,925 | Putativo |
| 6 | 144 | 164 | 2,109 | Cierto |
| 7 | 175 | 195 | 1,236 | Cierto |
| 8 | 213 | 233 | 1.581 | Cierto |
| 9 | 245 | 265 | 0.914 | Putativo |
| 10 | 284 | 304 | 2.352 | Cierto |
| 11 | 313 | 333 | 1.640 | Cierto |
| 12 | 379 | 399 | 1.973 | Cierto |
| 13 | 411 | 431 | 0.764 | Putativo |
| 14 | 488 | 508 | 1.884 | Cierto |

50 Los segmentos candidatos que rodean la membrana de la proteína BcrA que usan TopPred 2 (von Heijne, G., 1992, *J. Mol. Biol.*, 225: 287 - 494). Cada una de las 10 α -hélices está enumerada, teniendo cada una 20 aminoácidos de longitud. Se asigna una puntuación a cada α -hélice en base a su hidrofobicidad y probabilidad de residir dentro de la membrana. A partir de la puntuación, se proporciona la probabilidad de la secuencia de ser una α -hélice que rodea la membrana.

55
60
65

ES 2 321 274 T3

TABLA 3

Resultados del ELISA de la identificación de péptidos de la proteína BcrA

| 5 | <u>Epitope</u> | <u>Grupo 1</u> | <u>Grupo 2</u> | <u>Grupo 3</u> | <u>Grupo 4A</u> | <u>Grupo 4B</u> | |
|----|----------------|-------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------|
| | <u>Péptido</u> | | | | | | |
| | 62 | 1 (SEQ ID N°: 11) | 0,950±0,36 | 0,965±0,36 | 0,393±0,08 | 1,284±0,261 | 0,624±0,375 |
| | 63 | 1 (SEQ ID N°: 11) | 0,906±0,38 | 1,074±0,56 | 0,377±0,04 | 1,297±0,337 | 0,672±0,412 |
| 10 | 64 | 1 (SEQ ID N°: 11) | 0,838±0,36 | 1,071±0,43 | 0,356±0,04 | 1,232±0,251 | 0,704±0,405 |
| | 284 | 2 (SEQ ID N°: 12) | 0,981±0,39 | 1,075±0,36 | 0,423±0,05 | 1,220±0,304 | 0,675±0,419 |
| | 285 | 2 (SEQ ID N°: 12) | 0,825±0,38 | 1,017±0,35 | 0,375±0,02 | 1,141±0,358 | 0,667±0,338 |
| 15 | 286 | 2 (SEQ ID N°: 12) | 0,786±0,37 | 0,915±0,32 | 0,341±0,02 | 1,149±0,404 | 0,718±0,460 |
| | 288 | 3 (SEQ ID N°: 13) | 0,931±0,28 | 1,199±0,43 | 0,467± 0,02 | 1,595±0,697 | 0,714±0,451 |
| | 289 | 3 (SEQ ID N°: 13) | 0,915±0,32 | 1,022±0,32 | 0,432±0,02 | 1,313±0,408 | 0,669±0,434 |
| | 290 | 3 (SEQ ID N°: 13) | 0,859±0,39 | 1,103±0,45 | 0,373±0,04 | 1,034±0,274 | 0,679±0,421 |
| 20 | 291 | 3 (SEQ ID N°: 13) | 0,898±0,36 | 1,178±0,39 | 0,373±0,03 | 1,108±0,302 | 0,636±0,285 |
| | 302 | 4 (SEQ ID N°: 14) | 0,899±0,28 | 1,151±0,37 | 0,452±0,04 | 1,250±0,143 | 0,570±0,342 |
| | 303 | 4 (SEQ ID N°: 14) | 0,956±0,32 | 1,135±0,38 | 0,451±0,01 | 1,247±0,141 | 0,654±0,381 |
| | 304 | 4 (SEQ ID N°: 14) | 0,971±0,31 | 1,113±0,31 | 0,492±0,03 | 1,399±0,415 | 0,579±0,347 |
| 25 | 339 | 5 (SEQ ID N°: 15) | 1,002±0,35 | 1,168±0,37 | 0,430±0,06 | 1,222±0,203 | 0,644±0,337 |
| | 340 | 5 (SEQ ID N°: 15) | 1,111±0,43 | 1,256±0,44 | 0,545±0,04 | 1,382±0,210 | 0,727±0,451 |
| | 341 | 5 (SEQ ID N°: 15) | 0,946±0,32 | 1,112±0,35 | 0,481±0,01 | 1,352±0,328 | 0,651±0,330 |
| | 384 | 6 (SEQ ID N°: 16) | 0,961±0,28 | 1,066±0,31 | 0,475±0,05 | 1,189±0,276 | 0,644±0,278 |
| 30 | 385 | 6 (SEQ ID N°: 16) | 0,997±0,26 | 1,202±0,36 | 0,498±0,08 | 1,545±0,390 | 0,713±0,437 |
| | 386 | 6 (SEQ ID N°: 16) | 0,807±0,30 | 1,004±0,20 | 0,415±0,03 | 1,152±0,684 | 0,627±0,350 |
| | 486 | 7 (SEQ ID N°: 17) | 1,035±0,25 | 1,144±0,25 | 0,520±0,04 | 1,243±0,369 | 0,690±0,379 |
| | 487 | 7 (SEQ ID N°: 17) | 0,958±0,38 | 1,059±0,33 | 0,447±0,05 | 1,223±0,250 | 0,666±0,389 |
| 35 | 488 | 7 (SEQ ID N°: 17) | 0,897±0,40 | 0,924±0,31 | 0,338±0,03 | 1,296±0,542 | 0,648±0,362 |

GRUPO 1: Pacientes con CF con *Pseudomonas aeuroginosa* y *Burkholderia cepacia* (n=5)

GRUPO 2: Pacientes con CF con *Pseudomonas aeuroginosa* (n = 4)

GRUPO 3: Pacientes con CF sin *Pseudomonas aeuroginosa* ni *Burkholderia cepacia* (n = 2)

GRUPO 4A: Pacientes con CF con *Burkholderia cepacia* (pocillo) (n = 4)

GRUPO 4B: Pacientes con CF con *Burkholderia cepacia*, previamente mal, ahora en el hospital (n=2)

55

60

65

ES 2 321 274 T3

TABLA 4

Crecimiento de E. coli TOP10 ± bcrA expuesto a varios antibióticos (µg/ml)

| E. coli TOP10 + bcrA | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-----|----|----|----|---|---|---|---|-----|------|-------|
| Antibiótico (µg/ml) | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,125 |
| Tetraciclina | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| Clorohexadina | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| Ácido nalidixico | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| Ciprofloxacina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| E. coli TOP10 - bcrA | | | | | | | | | | | |
| Antibiotic (µg/ml) | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,125 |
| Tetraciclina | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + |
| Clorohexadina | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| Ácido nalidixico | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + |
| Ciprofloxacina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |

TABLA 5

Actividad del clon del fago contra la resistencia de E. coli TOP10 + bcrA al ácido nalidixico

| Fago | MIC del ácido nalidixico (µg/ml) |
|---------------------|----------------------------------|
| Ningún fago (bcrA+) | 16 |
| Control del fago | 16 |
| 1 | 2 |
| 2 | 16 |
| 3 | 8 |
| 4 | 16 |
| 5 | 8 |
| 6 | 4 |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una bomba de eflujo multifármaco que tiene la secuencia de SEQ ID N°: 2 o una bomba de eflujo multifármaco que tiene al menos el 90% de homología a ésta.
2. Una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene al menos el 95% ó el 99% de homología con la secuencia de SEQ ID N°: 2.
- 10 3. Una secuencia de nucleótidos que codifica una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
4. Una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 3, que tiene la secuencia de SEQ ID N°: 1.
- 15 5. Una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para usar en un procedimiento de tratamiento o diagnosis del cuerpo humano o animal.
6. El uso de una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o un fragmento inmunogénico de la misma que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por medio de un organismo que expresa la misma.
- 20 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho medicamento es una vacuna.
8. El uso de un inhibidor de una bomba de eflujo multifármaco como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por medio de un organismo que expresa la misma, estando constituido el inhibidor por un anticuerpo o fragmento de unión a un antígeno del mismo específico frente a un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20.
- 25 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el medicamento comprende adicionalmente un antibiótico seleccionado del grupo que está constituido por una tetraciclina y una quinolona.
- 30 10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, siendo la quinolona ácido nalidíxico.
11. Una preparación combinada de un inhibidor de una bomba de eflujo multifármaco como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 y al menos un antibiótico para el uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de una infección por un organismo que expresa dicha bomba de eflujo multifármaco, dicho inhibidor estando constituido por un anticuerpo o fragmento de unión a un antígeno del mismo específico frente a un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20.
- 35 12. El uso de un inhibidor de una bomba de eflujo multifármaco como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 en la fabricación de un desinfectante para un organismo que expresa la misma, dicho inhibidor estando constituido por un anticuerpo o fragmento de unión a un antígeno del mismo específico frente a un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20.
- 40 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12 en la que dicho desinfectante comprende adicionalmente un desinfectante de amonio cuaternario.
- 45 14. Una composición antimicrobiana que comprende un inhibidor de una bomba de eflujo multifármaco como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 y al menos un antibiótico, dicho inhibidor estando constituido por un anticuerpo o fragmento de unión a un antígeno del mismo específico frente a un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20.
- 50 15. Una composición antimicrobiana de acuerdo con la reivindicación 14, estando seleccionado el al menos un antibiótico de uno cualquiera de los grupos que están constituidos por una tetraciclina y una quinolona.
- 55 16. Una composición antimicrobiana de acuerdo con la reivindicación 15, siendo la quinolona ácido nalidíxico.
17. Una composición antimicrobiana que comprende un inhibidor de una bomba de eflujo multifármaco como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 y al menos un desinfectante, dicho inhibidor estando constituido por un anticuerpo o fragmento de unión a un antígeno del mismo, siendo dicho anticuerpo o fragmento de unión a un antígeno específico frente a un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20.
- 60 18. Una composición antimicrobiana de acuerdo con la reivindicación 17 comprendido el al menos un desinfectante de amonio cuaternario.
- 65 19. Un procedimiento de desinfección que comprende la aplicación a una superficie que se va a desinfectar una composición antimicrobiana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18.

ES 2 321 274 T3

20. Un procedimiento para detectar resistencia al multifármaco en una bacteria que comprende las etapas de:

(i) poner en contacto la bacteria con un reactivo específico a la bomba de eflujo multifármaco como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, estando el reactivo seleccionado del grupo constituido por:

(a) un anticuerpo o fragmento de unión a un antígeno del mismo específico frente a un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20, y

(b) una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID N°: 2;

(ii) detectar cualquier reacción de unión anticuerpo - antígeno o reacción de hibridación de la secuencia de nucleótidos; y

(iii) correlacionar los resultados de la etapa de detección (ii) con la presencia o ausencia de resistencia al multifármaco en la bacteria.

21. Un procedimiento para detectar la presencia de una bacteria que tiene resistencia a multifármaco otorgada por la presencia de una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende las etapas de:

(i) poner en contacto una muestra de un paciente; con un reactivo específico a dicha bomba de eflujo multifármaco, estando seleccionado dicho reactivo del grupo que está constituido por:

(a) un anticuerpo o fragmento de unión a un antígeno del mismo específico frente a un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20, y

(b) una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID N°: 2;

(ii) detectar cualquier reacción de unión anticuerpo - antígeno o reacción de hibridación de la secuencia de nucleótidos; y

(iii) correlacionar los resultados de la etapa de detección (ii) con la presencia o ausencia de una bacteria que tiene resistencia al multifármaco.

22. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 21, comprendiendo la muestra sangre, suero, aspirados bronquiales o esputos.

23. Un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 11 - 20 y que presenta un epitope.

24. Un organismo no humano distinto a *Burkholderia cepacia* en el que se ha introducido una bomba de eflujo multifármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

ES 2 321 274 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> NeuTec Pharma plc
5 <120> Copomposiciones antimicrobianas
<130> M99/0582/PCT
<140>
<141>
10 <160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
15 <211> 1554
<212> ADN
<213> *Burkholderia cepacia*
20 <220>
<221> CDS
<222> (1).. (1554)

25 <400> 1

atg tcc gcc acc acg gca tcc gcc gcg tcc cct gcc gcc gaa ccg gcg 48
Met Ser Ala Thr Thr Ala Ser Ala Ala Ser Pro Ala Ala Glu Pro Ala
30 1 5 10 15

ccg ctg tcc ggc ggc gcc ctc gcg ctg ctc acc gtc ggg ctc gcg ctc 96
Pro Leu Ser Gly Gly Ala Leu Ala Leu Leu Thr Val Gly Leu Ala Leu
20 25 30

40 ggc acg ttc atg gaa gtg ctc gac acg tcg atc ggc gac gtc gcg gtg 144
Gly Thr Phe Met Glu Val Leu Asp Thr Ser Ile Gly Asp Val Ala Val
45 35 40 45

50

55

60

65

ES 2 321 274 T3

| | | | | | | | |
|----|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-----|------|
| | Ala Thr Cys | Ala Phe Phe | Leu Leu Gly | Arg Glu Thr | Lys Thr Thr | Lys | |
| | 195 | | 200 | | 205 | | |
| 5 | cag cgg atc gac gcg gtc ggg ctc acg ctg ctc gtg atc ggc gtg tcg | | | | | | 672 |
| | Gln Arg Ile Asp | Ala Val Gly | Leu Thr Leu | Leu Val Ile | Gly Val Ser | | |
| 10 | 210 | | 215 | | 220 | | |
| | tgc ctg cag atg atg ctc gac ctc ggc aag gac cgc gac tgg ttc agc | | | | | | 720 |
| 15 | Cys Leu Gln Met | Met Leu Asp | Leu Gly Lys | Asp Arg Asp | Trp Phe Ser | | |
| | 225 | 230 | | 235 | 240 | | |
| | tcg tcg ttc atc gtt cgc gct cgc ctg atc gcg gtc gtg tcg ctc gcg | | | | | | 768 |
| 20 | Ser Ser Phe Ile | Val Arg Ala | Arg Leu Ile | Ala Val Val | Ser Leu Ala | | |
| | | 245 | | 250 | 255 | | |
| 25 | ttc atg ctc gtc tgg gaa gcg acc gag aag gag ccg gtg gtc gac cta | | | | | | 816 |
| | Phe Met Leu Val | Trp Glu Ala | Thr Glu Lys | Glu Pro Val | Val Asp Leu | | |
| 30 | | 260 | | 265 | 270 | | |
| | cgc ctg ttc aag gat cgc aac ttc gct cgg cgc gct atc atc tcg ttc | | | | | | 864 |
| 35 | Arg Leu Phe Lys | Asp Arg Asn | Phe Ala Arg | Arg Ala Ile | Ile Ser Phe | | |
| | 275 | | 280 | | 285 | | |
| | ggc ttc atg gcg ttc ttc ggc tcg gtc gtg atc ttc ccg ctg tgg cag | | | | | | 912 |
| 40 | Gly Phe Met Ala | Phe Phe Gly | Ser Val Val | Ile Phe Pro | Leu Trp Gln | | |
| | 290 | | 295 | | 300 | | |
| 45 | acc gtg atg ggc tac acg gcc ggc aag gca ctt ccg gcg acc gcg ccg | | | | | | 960 |
| | Thr Val Met Gly | Tyr Thr Ala | Gly Lys Ala | Leu Pro Ala | Thr Ala Pro | | |
| 50 | 305 | 310 | | 315 | 320 | | |
| | gtt ggg ctg ctc gcg ctc gtg ctg tcg ccg ctg atc ggc cgc aac atg | | | | | | 1008 |
| 55 | Val Gly Leu Leu | Ala Leu Val | Leu Ser Pro | Leu Ile Gly | Arg Asn Met | | |
| | | 325 | | 330 | 335 | | |
| 60 | cac cgg ctc gac ctg cgg atg gtc gcg agc ttc gcc ttt cat cgt gtt | | | | | | 1056 |
| | His Arg Leu Asp | Leu Arg Met | Val Ala Ser | Phe Ala Phe | His Arg Val | | |
| 65 | | | | | | | |

ES 2 321 274 T3

| | 340 | 345 | 350 | |
|----|---|-----|-----|------|
| 5 | tcg cga tcg tat cgg tta tgg aac tcg acg ttt acg ctc gac gtg ttt | | | 1104 |
| | Ser Arg Ser Tyr Arg Leu Trp Asn Ser Thr Phe Thr Leu Asp Val Phe | | | |
| | 355 | 360 | 365 | |
| 10 | ttc aac cac gtg atc ctg ccg cgg ctc gtg cag ggg atc ggc gtc gcg | | | 1152 |
| | Phe Asn His Val Ile Leu Pro Arg Leu Val Gln Gly Ile Gly Val Ala | | | |
| 15 | 370 | 375 | 380 | |
| 20 | tgc ttc ttc gtg ccg atg acg acg atc acg ctg tcg agc atc ccc gac | | | 1200 |
| | Cys Phe Phe Val Pro Met Thr Thr Ile Thr Leu Ser Ser Ile Pro Asp | | | |
| | 385 | 390 | 395 | 400 |
| 25 | gag cgg ctg gcg agc gcc tcg ggc ctg tcg aac ttc ctg cgt acg ctg | | | 1248 |
| | Glu Arg Leu Ala Ser Ala Ser Gly Leu Ser Asn Phe Leu Arg Thr Leu | | | |
| | 405 | 410 | 415 | |
| 30 | tcg ggc gcg atc ggc acc gcg gtc agc tcg acg ttc tgg gag aac gac | | | 1296 |
| | Ser Gly Ala Ile Gly Thr Ala Val Ser Ser Thr Phe Trp Glu Asn Asp | | | |
| 35 | 420 | 425 | 430 | |
| 40 | gcg atc tac cac cac gcg cgg ctc gcc gaa tcg gtg agc gtc tat gcg | | | 1344 |
| | Ala Ile Tyr His His Ala Arg Leu Ala Glu Ser Val Ser Val Tyr Ala | | | |
| | 435 | 440 | 445 | |
| 45 | cag aac acg acc gac tat cag ggc gcg ctg gcg cag ctc ggc gtc gtg | | | 1392 |
| | Gln Asn Thr Thr Asp Tyr Gln Gly Ala Leu Ala Gln Leu Gly Val Val | | | |
| | 450 | 455 | 460 | |
| 50 | ggc cag acc gcg aac gcg caa ctg aac cag atc gtc acg caa gca ggg | | | 1440 |
| | Gly Gln Thr Ala Asn Ala Gln Leu Asn Gln Ile Val Thr Gln Ala Gly | | | |
| | 465 | 470 | 475 | 480 |
| 55 | ctt cat gat ggc gac caa cga ctt ctt cac ctg tcg gcg atc gtg ttc | | | 1488 |
| | Leu His Asp Gly Asp Gln Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Ile Val Phe | | | |
| 60 | 485 | 490 | 495 | |
| 65 | | | | |

ES 2 321 274 T3

| | 115 | 120 | 125 |
|----|--|-----|---------|
| 5 | Pro Met Val Pro Leu Ser Gln Thr Ile Leu Met Arg Ser Tyr Pro Pro 130 | 135 | 140 |
| 10 | Ala Lys Arg Gly Leu Ala Leu Gly Leu Trp Ala Met Thr Val Ile Val 145 | 150 | 155 160 |
| 15 | Ala Pro Ile Phe Gly Pro Leu Leu Gly Gly Trp Ile Ser Asp Asn Tyr 165 | 170 | 175 |
| 20 | Thr Trp Pro Trp Ile Phe Tyr Ile Asn Leu Pro Ile Gly Ile Phe Ser 180 | 185 | 190 |
| 25 | Ala Thr Cys Ala Phe Phe Leu Leu Gly Arg Glu Thr Lys Thr Thr Lys 195 | 200 | 205 |
| 30 | Gln Arg Ile Asp Ala Val Gly Leu Thr Leu Leu Val Ile Gly Val Ser 210 | 215 | 220 |
| 35 | Cys Leu Gln Met Met Leu Asp Leu Gly Lys Asp Arg Asp Trp Phe Ser 225 | 230 | 235 240 |
| 40 | Ser Scr Phe Ile Val Arg Ala Arg Leu Ile Ala Val Val Ser Leu Ala 245 | 250 | 255 |
| 45 | Phe Met Leu Val Trp Glu Ala Thr Glu Lys Glu Pro Val Val Asp Leu 260 | 265 | 270 |
| 50 | Arg Leu Phe Lys Asp Arg Asn Phe Ala Arg Arg Ala Ile Ile Ser Phe 275 | 280 | 285 |
| 55 | Gly Phe Met Ala Phe Phe Gly Ser Val Val Ile Phe Pro Leu Trp Gln 290 | 295 | 300 |
| 60 | Thr Val Met Gly Tyr Thr Ala Gly Lys Ala Leu Pro Ala Thr Ala Pro 305 | 310 | 315 320 |
| 65 | | | |

ES 2 321 274 T3

Val Gly Leu Leu Ala Leu Val Leu Ser Pro Leu Ile Gly Arg Asn Met
 325 330 335
 5
 His Arg Leu Asp Leu Arg Met Val Ala Ser Phe Ala Phe His Arg Val
 340 345 350
 10
 Ser Arg Ser Tyr Arg Leu Trp Asn Ser Thr Phe Thr Leu Asp Val Phe
 355 360 365
 15
 Phe Asn His Val Ile Leu Pro Arg Leu Val Gln Gly Ile Gly Val Ala
 370 375 380
 20
 Cys Phe Phe Val Pro Met Thr Thr Ile Thr Leu Ser Ser Ile Pro Asp
 385 390 395 400
 25
 Glu Arg Leu Ala Ser Ala Ser Gly Leu Ser Asn Phe Leu Arg Thr Leu
 405 410 415
 30
 Ser Gly Ala Ile Gly Thr Ala Val Ser Ser Thr Phe Trp Glu Asn Asp
 420 425 430
 35
 Ala Ile Tyr His His Ala Arg Leu Ala Glu Ser Val Ser Val Tyr Ala
 435 440 445
 40
 Gln Asn Thr Thr Asp Tyr Gln Gly Ala Leu Ala Gln Leu Gly Val Val
 450 455 460
 45
 Gly Gln Thr Ala Asn Ala Gln Leu Asn Gln Ile Val Thr Gln Ala Gly
 465 470 475 480
 50
 Leu His Asp Gly Asp Gln Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Ile Val Phe
 485 490 495
 55
 Val Ala Leu Ala Ala Leu Val Trp Ile Thr Lys Pro Lys Lys Gly Ala
 500 505 510
 60
 Gly Pro Ala Met Gly His

65 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN

ES 2 321 274 T3

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR
5 <400> 3
cccgatcggc agattgatg 20
10 <210> 4
<211> 20
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR
20 <400> 4
gacgtcgcgg tgccgacgat 20
25 <210> 5
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR
35 <400> 5
ttcacaggaa acag 14
40 <210> 6
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR
<400> 6
50 ttcacaggaa acag 14
<210> 7
55 <211> 5
<212> PRT
<213> *Burkholderia cepacia*
60 <400> 7
Pro Leu Leu Gly Gly
1 5
65 <210> 8
<211> 5

ES 2 321 274 T3

<212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

5 <400> 8

Pro Leu Leu Arg Gly

1 5

10

<210> 9

<211> 3

<212> PRT

15 <213> *Burkholderia cepacia*

<400> 9

20 Leu Asp Leu

1

<210> 10

25 <211> 3

<212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

30 <400> 10

Asp Leu Arg

1

35

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

40 <213> *Burkholderia cepacia*

<400> 11

45 Val Ile Ser Ser Tyr Ser

1 5

50 <210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

55

<400> 12

Ile Ser Phe Gly Phe Met Ala

60 1 5

<210> 13

<211> 6

65 <212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

ES 2 321 274 T3

<400> 18

Ala Ile Ile Ser Phe Gly Phe Met Ala Phe Phe Gly Ser Val Val

5 1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

10 <212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

<400> 19

15 Ser Val Val Ile Phe Pro Leu Trp Gln Thr Val Met Gly Tyr Thr

 1 5 10 15

20 <210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

25

<400> 20

His Arg Leu Asp Leu Arg Met Val Ala Ser Phe Ala Phe His Arg

30 1 5 10 15

<210> 21

<211> 21

35 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR

<400> 21

45 cgacgtcgcg gtgccgacga t

21

<210> 22

<211> 21

50 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR

55

<400> 22

60 atgcccctc gccggcccgc c

21

65

65