

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 579**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 9/36 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

C12N 9/50 (2006.01)

C07K 14/195 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2010** **PCT/EP2010/007941**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2011** **WO11076432**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2010** **E 10798274 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **27.05.2020** **EP 2516471**

54 Título: **Polipéptidos quiméricos y su uso en descolonización bacteriana**

30 Prioridad:

23.12.2009 EP 09015998

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
18.03.2021

73 Titular/es:

HYPHARM GMBH (100.0%)
Am Neuland 3
82347 Bernried, DE

72 Inventor/es:

GRALLERT, HOLGER y
LEOPOLDSEDER, SONJA

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos quiméricos y su uso en descolonización bacteriana

Campo técnico

La presente invención se refiere a polipéptidos quiméricos que comprenden un dominio de unión a células (Cell Binding Domain, CBD) de bacteriocina y al menos un dominio activo enzimático (Enzymatic Active Domain, EAD) que tiene actividad lítica de pared celular bacteriana, que son útiles en la terapia y la profilaxis de la colonización bacteriana patogénica, incluyendo infecciones bacterianas y enfermedades bacterianas, tal como se define en la reivindicación 1.

Antecedentes de la invención

El número rápidamente creciente de bacterias resistentes a antibióticos constituye un reto cada vez mayor para la medicina y los sistemas de atención sanitarios en todo el mundo. Especialmente, el número de infecciones con *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) aumenta de manera drástica en los países desarrollados. En los Países Bajos, las infecciones adquiridas en hospitales se gestionan con éxito mediante el examen de pacientes que entran en el hospital para detectar si son portadores de MRSA y la consiguiente descolonización de tales pacientes. La estrategia establecida de la descolonización de *S. aureus* de pacientes es la erradicación de *S. aureus* en la nariz usando un antibiótico (por ejemplo, mupirocina) y la descolonización de la piel usando desinfectantes. Los problemas de este régimen de descolonización son (i) uso extenso de antibióticos, (ii) resistencia inminente de *S. aureus* frente a antibióticos (por ejemplo, frente a mupirocina), (iii) altos costes debido a un tiempo de tratamiento muy largo (normalmente 5-7 días), y (iv) infecciones oportunistas debido a la completa erradicación de flora natural de la piel.

Considerando estos graves inconvenientes, la comunidad está buscando enfoques alternativos para la descolonización eficaz en un tiempo corto y evitando el uso de antibióticos. Las lisinas, que son enzimas hidrolíticas o líticas inducidas por bacteriófagos responsables de la lisis del huésped bacteriano, ofrecen tales ventajas en general pero tienen que optimizarse para diversos aspectos. Se han designado lisinas de bacteriófagos (fagos) usando diversos nombres incluyendo lisinas, lisinas de fagos, virolisinas, y endolisinas. Estructuralmente, las lisinas se encuentran comúnmente como proteínas modulares con al menos un dominio que confiere la actividad enzimática para hidrolizar uniones específicas en la capa de mureína o peptidoglicano de la pared celular bacteriana (dominio activo enzimático - EAD), y un dominio que confiere especificidad de unión a un epítipo de hidrato de carbono de la pared celular (dominio de unión a células - CBD). Por tanto, los miembros de la familia de lisina (hidrolasas de peptidoglicano o pared celular) presentan un diseño modular en el que un dominio catalítico se fusiona a un dominio de unión o especificidad.

Durante el ciclo de reproducción de bacteriófagos (fagos), tras el ensamblaje de las nuevas partículas de fago, se producen lisinas (endolisinas) para destruir la pared celular bacteriana. Las endolisinas pueden dividirse en cinco clases según sus actividades líticas de pared celular: (1) N-Acetylmuraminidasas (lisozimas), (2) Endo- β -N-acetilglucosaminidasas, (3) Transglucosidasas líticas, (4) N-acetylmuramoyl-L-alanina amidasas, y (5) Endopeptidasas. Cuando las (1) a (3) mencionadas anteriormente se escinden dentro del resto de azúcar del peptidoglicano, (4) se escinde en el enlace amida entre el esqueleto de azúcar y el ligador peptídico y (5) se escinde dentro del puente cruzado peptídico.

Se describe que las endolisinas tienen un espectro estrecho con respecto a su diana. En el caso de bacterias Gram-positivas, las endolisinas actúan en las paredes celulares desde el interior así como desde el exterior, convirtiendo, por tanto, estas moléculas en candidatos a fármacos antimicrobianos (Borysowski *et al.* 2006). Mientras que los intervalos de huésped de bacteriófago son muy restrictivos, es decir sólo reconocen un antígeno específico en su huésped bacteriano, las lisinas de fago son menos restrictivas, reconociendo una molécula de hidrato de carbono específico común a las especies particulares de bacterias huésped. Aunque el intervalo de bacterias que son la diana de lisinas es menos restrictivo que el correspondiente bacteriófago, las lisinas todavía mantienen un grado de especificidad, y tienen efectos mínimos sobre otras bacterias, incluyendo organismos comensales.

El uso de endolisinas para destruir bacterias se dio a conocer por primera vez por Gasson en 1991 (documento GB 2 255 561). Nelson *et al.* 2001 han descrito aplicaciones terapéuticas y profilácticas adicionales, incluyendo sistemas de modelos animales. Este trabajo describe una aplicación tópica de endolisinas contra estreptococos y neumococos del grupo A en tratamiento oral y nasofaríngeo. En el campo del tratamiento de estafilococos con lisinas derivadas de bacteriófagos, Rashel *et al.* 2007 han mostrado que la endolisina del fago phiMR11 puede erradicar MRSA en orificios nasales de ratones y protege a los ratones de muerte séptica mediante inyección intraperitoneal. En el documento US 5.997.862 se describen regímenes de tratamiento y composiciones farmacéuticas adicionales para tratar y prevenir infecciones bacterianas usando lisinas derivadas de fagos. Sin embargo, en todos los ejemplos publicados hasta ahora usando endolisinas derivadas de bacteriófagos para el tratamiento de infecciones bacterianas, la cantidad de proteína para un tratamiento eficaz es muy alta. Esto se debe a la escasa estabilidad de las enzimas y se debe a la inhibición de la actividad en matrices relevantes de aplicación.

En el caso de lisinas contra bacterias *Staphylococcus*, se han clonado y caracterizado varias endolisinas silvestres.

Por ejemplo, la proteína 17 del fago P68 es una endolisina de estafilococo, que se notifica que presenta actividad antimicrobiana contra aislados de *S. aureus* incluyendo aislados clínicos (Takác y Blási 2005). Diversos grupos investigaron la endolisina del bacteriófago phi11 de *S. aureus* en aplicaciones antimicrobianas. Navarre *et al.* 1999 identificaron dos dominios de actividad enzimática (amidasa y endopeptidasa) en lisina de phi11 y mostraron que un mutante con delección del dominio amidasa todavía es activo. Se han caracterizado mutantes de endolisina de phi11 (y phi12) mediante diferentes ensayos de actividad en paredes celulares de *S. aureus*, bacterias inactivadas por calor y en biopelículas bacterianas (Sass y Bierbaum 2007). Todas estas investigaciones tienen en común que están usando condiciones experimentales artificiales para la caracterización funcional de las endolisinas. Por tanto, no pueden extraerse evidencias en cuanto a la eficacia en células vivas en condiciones relevantes de aplicación a partir de estas publicaciones.

Otra enzima estafilocócica se deriva del bacteriófago phiK. Esta endolisina, denominada lysK, se ha caracterizado en más detalle por los grupos de David M. Donavan y R. Paul Ross (O'Flaherty *et al.* 2005; documento WO 2008/001342; Becker *et al.* 2008; Horgan *et al.* 2009). Han podido demostrar que lysK tiene una amplia actividad bactericida contra bacterias de *staphylococcus* vivas sin discriminar entre los diferentes géneros. LysK consiste en un CBD y dos EAD, una cisteína-histidina aminopeptidasa (Cysteine-Histidine Amino Peptidase, CHAP) y un dominio amidasa. Al expresar los EAD individuales, pudieron demostrar que el dominio de CHAP solo es suficiente para destruir, pero no el dominio amidasa. Un mutante de delección, sin el dominio amidasa (lysK Δ 221-390), posee la misma actividad de destrucción que la proteína silvestre. Al determinarse los valores de MIC para los constructos de truncamiento/delección, sólo pudieron medirse los valores de MIC para lysK Δ 221-390 y LysK silvestre en medio TSB. El dominio CHAP no mostró sólo actividad medible dentro de una matriz compleja de este tipo. Los valores de MIC determinados son considerablemente altos, 78 μ g/ml y 63 μ g/ml para lysK silvestre y lysK Δ 221-390, respectivamente. Hasta ahora no se ha descrito ninguna lisina química basada en los dominios de lysK.

Todos los datos publicados usando endolisinas silvestres muestran claramente que estas moléculas son bastante eficaces en destruir bacterias en disoluciones tampón. La ventaja de estas moléculas es el tiempo de comienzo muy rápido (de minutos a horas), y el modo de acción desde el exterior sin implicación de procesos metabólicos dentro de la célula. De hecho, para las endolisinas no se ha descrito en la bibliografía la inducción/adquisición de resistencia. Por otra parte, las endolisinas silvestres tienden a ser bastante inestables a temperaturas elevadas y la funcionalidad se reduce en composiciones complejas como medios de cultivo o fluidos biológicos. Todos los valores de MIC (concentración inhibitoria mínima) o valores de MBC (concentración bactericida mínima) publicados están en el intervalo > 50 μ g/ml. Puede especularse que en muchos casos los valores de MIC no se notifican por motivos experimentales.

También pueden encontrarse en bacterias enzimas con propiedades de degradación de pared celular similares a las lisinas de bacteriófagos (endolisinas). Las autolisinas son enzimas bacteriolíticas que digieren el peptidoglicano de la pared celular de las bacterias que las producen. Las autolisinas están implicadas en la reconstrucción de la pared celular durante la división de células bacterianas. Aunque potencialmente letales, las autolisinas parecen ser universales entre las bacterias que poseen peptidoglicano. "Autolisina" es el término usado para las lisinas, que se producen por bacterias y están implicadas en la división celular, mientras que el término "lisina" o "endolisina" se refiere a enzimas líticas, que están implicadas en la liberación de fagos, tal como se describió anteriormente en el presente documento. Las bacteriocinas son moléculas también producidas y secretadas por microorganismos. Son sustancias antibacterianas de naturaleza proteica que se producen por diferentes especies bacterianas. Una subclase de bacteriocinas consiste en enzimas (toxinas proteicas) que se producen por bacterias para inhibir el crecimiento de cepa(s) bacteriana(s) de concurrencia similar o estrechamente relacionada(s) en su hábitat. Muchas bacterias producen péptidos de bacteriocina antimicrobianos. También contienen CBD y EAD. Las bacteriocinas seleccionan como diana procariontes pero no eucariotas, lo que las hace seguras para el consumo humano.

La bacteriocina lisostafina se produce de manera natural por *Staphylococcus simulans* para combatir *Staphylococcus aureus*. Es altamente eficaz *in vitro* y puede destruir bacterias en medios complejos (Kumar J. 2008). La lisostafina consiste en un CBD y un dominio glicil-glicina endopeptidasa, que escinde el puente cruzado de pentaglicinas característico en paredes celulares de *S. aureus*. Esta molécula se ha sometido a prueba en diversos modelos animales y presenta buena eficacia incluso en matrices complejas (Kokai-Kun *et al.* 2007; Kusuma *et al.* 2007). Los valores de MIC notificados de lisostafina son más de 1000 veces inferiores en comparación con lysK (<0,02 μ g/ml). La principal desventaja de lisostafina es la aparición de resistencia en *S. aureus*. Hasta ahora se han descrito dos mecanismos de escape genético diferentes: En primer lugar, la incorporación de serina en el puente de pentaglicinas (DeHart *et al.* 1995). En segundo lugar, el acortamiento del puente de glicinas; gly3 o gly2 (Ehlert *et al.* 1997; Strandén *et al.* 1997). Puede suponerse que tal marcador de resistencia monogénica se seleccionará rápidamente bajo presión de selección.

Los dominios activos enzimáticos (EAD) pueden encontrarse además en proteínas estructurales de bacteriófagos. Forman parte de la maquinaria de infección temprana del bacteriófago, hidrolizando localmente la pared celular antes de la inyección de ADN.

Con el fin de abordar el hecho de desarrollo de resistencia, los grupos comenzaron a investigar la combinación de diferentes lisinas. Por ejemplo, se han descrito efectos sinérgicos entre lysK y lisostafina (Becker *et al.* 2008), dando como resultado concentraciones eficaces reducidas para destruir *S. aureus*. El inconveniente de este concepto es

que, en el caso de aparición de resistencia contra un componente (por ejemplo, lisostafina), la concentración del segundo componente ya no será eficaz. Además, una composición con dos componentes activos es difícil de desarrollar y es caro de producir.

Se sabe que es posible una combinación de dominios (CBD y EAD) de organismos de diferentes fuentes. Sin embargo, el fin de tales experimentos de intercambio de dominios siempre fue alterar o ampliar la especificidad de huésped de las lisinas (Díaz *et al.* 1990; Croux *et al.* 1993; Donovan *et al.* 2006). Hasta ahora, no se han realizado experimentos de intercambio de dominio sistemáticos con EAD derivados de endolisina para obtener moléculas líticas con propiedades mejoradas con respecto a la eficacia, el potencial de resistencia y la estabilidad.

Hay un ejemplo en la literatura de construir una lisina quimérica altamente estable basada en un CBD de lisostafina fusionado a un dominio de enzima de degradación de mureína asociada a la cola (Tail Associated Murein-Degrading Enzyme, TAME) (documento WO 2007/130655). Este dominio puede considerarse como estable ya que es una parte de una proteína estructural de bacteriófago. El inconveniente de tales constructos es la actividad específica muy baja en comparación con endolisinas. Por tanto, se requiere más proteína para alcanzar concentraciones eficaces. Además, la inhibición de las moléculas en matrices complejas no puede excluirse porque no se ha proporcionado ninguna caracterización en este sentido.

Hay una necesidad en la actualidad de terapias y agentes eficaces en el control de contaminación, colonización e infección bacteriana. Un gran problema en la medicina ha sido el desarrollo de bacterias resistentes a fármacos ya que se usan más antibióticos para una gran variedad de enfermedades y otros estados. El sobreuso de antibióticos ha aumentado el número de bacterias que muestran resistencia. Además, antibióticos ampliamente reactivos pueden afectar a la flora normal y pueden causar resistencia a antibióticos en estos organismos debido a la frecuencia de uso de fármacos. El número de personas que están haciéndose hiperalógenicas a antibióticos parece aumentar debido al sobreuso de antibióticos. Por consiguiente, hay una necesidad comercial de nuevos antibióticos (o sustancias bactericidas), especialmente aquellos que funcionan en nuevas modalidades o proporcionan nuevos medios de matar bacterias patógenas.

Sumario de la invención

El uso de dominios líticos de una endolisina de bacteriófagos, una bacteriocina o una autolisina bacteriana, específicamente dominios líticos de bacteriófago derivados de endolisinas, para el tratamiento de infecciones bacterianas es una alternativa prometedora para superar el número creciente de resistencia a antibióticos en bacterias. Tal como mostraron en principio varios investigadores, es posible destruir bacterias *in vitro* y en modelos animales. La ventaja de tales proteínas líticas es el rápido comienzo de acción y el menor riesgo de desarrollo de resistencia contra estas enzimas. Como un inconveniente general, hasta ahora todos los estudios han mostrado que se requiere una concentración relativamente alta de lisina para la completa erradicación de las bacterias diana. El motivo de la necesidad de tales concentraciones altas puede explicarse con la reducida actividad de las moléculas en matrices complejas y su baja estabilidad a temperatura elevada. Datos de actividad relevante de aplicación como (i) valores de MIC en medios de crecimiento bacteriano, (ii) valores de MBC en matrices relevantes de aplicación (suero, medios de crecimiento, mucina etc.), (iii) Valores log de reducción de cfu en matrices relevantes (suero, medios de crecimiento, mucina etc.), (iv) actividad de lisina en dependencia de fase de crecimiento bacteriano, y (v) intervalo de pH de actividad, apenas han sido publicados por tanto. Una desventaja adicional de las lisinas de estafilococos actuales es que tienden a ser bastante inestables y a menudo muestran escasa solubilidad.

La presente invención proporciona con éxito nuevos polipéptidos quiméricos tal como se reivindican contra bacterias Gram positivas, *Staphylococcus aureus*, específicamente incluyendo MRSA, con eficacia sustancialmente mejorada en matrices relevantes tales como medios de cultivo, mucina o suero. Además, los polipéptidos quiméricos según la presente invención presentan excelente estabilidad térmica y buena solubilidad. La actividad de los polipéptidos quiméricos según la presente invención puede no ser dependiente de la fase de crecimiento bacteriano. Los polipéptidos quiméricos proporcionados por la presente invención son útiles en el tratamiento y la profilaxis de la colonización bacteriana patológica, incluyendo infecciones bacterianas y enfermedades bacterianas, específicamente bacterias Gram positivas patológicas incluyendo bacterias de *Staphylococcus* patológicas.

La presente invención proporciona los elementos tal como se reivindican.

Los polipéptidos quiméricos de la presente invención seleccionan como diana bacterias patológicas específicas y éstas no interfieren con la flora bacteriana normal. También, los polipéptidos quiméricos de la presente invención atacan principalmente estructuras de pared celular, que no se ven afectadas por variación de plásmido. Las acciones de los dominios activos enzimáticos de los polipéptidos quiméricos de la presente invención son rápidas y pueden no depender del crecimiento bacteriano. Los polipéptidos quiméricos de la presente invención pueden dirigirse al revestimiento mucoso en el que, en residencia, pueden destruir bacterias de colonización, específicamente bacterias Gram positivas, más específicamente cepas de *Staphylococcus*, todavía más específicamente especies y sub-especies de *Staphylococcus aureus*, y lo más específicamente MRSA.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra los resultados de tratamiento de una piel humana con un polipéptido quimérico de la presente

invención (Ejemplo 9). “Desinfectante” representa el control positivo. “Antes del tratamiento” representa el control negativo.

La figura 2 muestra los resultados de tratamiento de *Staphylococcus aureus* en placas de Agar-LB con un polipéptido quimérico (Ejemplo 10). La figura 2A representa el experimento de control.

- 5 La figura 3 muestra la actividad dependiente de pH de PRF119 en un cultivo de *Staphylococcus aureus*.

Descripción detallada de la invención

- 10 Los polipéptidos quiméricos proporcionados por la presente invención tienen actividad de destrucción contra dos o más cepas bacterianas Gram positivas. En un aspecto, los polipéptidos quiméricos presentan un efecto lítico en múltiples cepas gram positivas, preferiblemente cepas de *Staphylococcus*, más preferiblemente cepas de *Staphylococcus aureus*. Específicamente, la presente invención proporciona polipéptidos quiméricos para el tratamiento y la prevención de infecciones de *Staphylococcus aureus*.

Lo anterior ha explicado resumidamente las características de diversas realizaciones con el fin de que la descripción detallada que sigue se entienda mejor. A continuación en el presente documento se describirán características y ventajas adicionales de diversas realizaciones que constituyen el objeto de las reivindicaciones de la invención.

- 15 En un aspecto, los polipéptidos quiméricos de la presente invención son útiles para aplicación, en particular aplicación tópica, para la descolonización de bacterias Gram positivas, específicamente *Staphylococcus aureus* y *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), basándose en la actividad enzimática del(de los) dominio(s) lítico(s) en combinación con actividad, estabilidad y especificidad mejoradas de los polipéptidos quiméricos. Sorprendentemente se ha encontrado que un polipéptido quimérico según la presente invención muestra actividad lítica mejorada, selectividad y estabilidad de huésped mejoradas en comparación con endolisinas silvestres. Específicamente, se encontraron una actividad mejorada (expresada por valor de MIC) y estabilidad mejorada para un polipéptido quimérico, que comprende una primera parte y una segunda parte, en el que dicha primera parte comprende una secuencia de aminoácidos del CBD de lisostafina, preferiblemente el CBD de SEQ ID NO: 4, y en el que dicha segunda parte comprende una secuencia de aminoácidos del dominio CHAP de lysK, preferiblemente el dominio CHAP de SEQ ID NO: 1. Un polipéptido quimérico tal también ha demostrado que presenta una selectividad de huésped mejorada, preferiblemente para cepas de *Staphylococcus*.

- 20 Asimismo, se encontraron una actividad mejorada (expresada por el valor de MIC) y estabilidad mejorada para un polipéptido quimérico, que comprende una primera parte y una segunda parte, en el que dicha primera parte comprende una secuencia de aminoácidos del CBD de lisostafina, preferiblemente el CBD de SEQ ID NO: 4, y en el que dicha segunda parte comprende una secuencia de aminoácidos del dominio CHAP de lysK, preferiblemente el dominio CHAP de SEQ ID NO: 1, y una secuencia de aminoácidos del dominio lítico de lisostafina, preferiblemente el dominio lítico de SEQ ID NO: 2. Un polipéptido quimérico tal también ha demostrado que presenta una selectividad de huésped mejorada, preferiblemente para cepas de *Staphylococcus*.

- 25 En otro aspecto, los polipéptidos quiméricos de la presente invención poseen valores de MIC valores inferiores a 10 µg/ml, preferiblemente inferiores a 1 µg/ml, todavía más preferiblemente inferiores a 0,3 µg/ml, y lo más preferiblemente inferiores a 0,1 µg/ml.

- 30 En un aspecto adicional, los polipéptidos quiméricos de la presente invención poseen valores de MBC (99,99%) para reducción de log 4 de células bacterianas vivas inferiores a 10 µg/ml, preferiblemente inferiores a 1 µg/ml, más preferiblemente inferiores a 0,5 µg/ml, todavía más preferiblemente inferiores a 0,05 µg/ml, y lo más preferiblemente inferiores a 0,01 µg/ml. Es un objeto de la presente invención que los valores de MBC para reducción de log 4 de células bacterianas de los polipéptidos quiméricos proporcionados en el presente documento no estén significativamente inhibidos en matrices complejas tales como mucina y/o sangre y/o suero.

En una realización de la presente invención, se usa al menos un dominio activo enzimático (EAD), que se escinde entre restos altamente conservados dentro del puente cruzado peptídico de paredes celulares de *S. aureus*.

- 35 En un aspecto, la presente invención proporciona polipéptidos quiméricos, que se optimizan ya que permiten discriminar entre *S. aureus* y otras especies de estafilococos.

En un aspecto adicional, los polipéptidos quiméricos de la presente invención son altamente activos y poseen estabilidad mejorada.

- 40 En la presente invención, el término “CBD” representa la abreviatura para dominio de unión a células, más específicamente dominio de unión a la pared celular. Por tanto, el término “CBD” también puede representar la abreviatura para dominio de unión a la pared celular. Los términos “dominio de unión a células” y “dominio de unión a la pared celular” pueden usarse de manera intercambiable. La definición estructural y funcional de un CBD según la presente invención se facilita en otro lugar de la descripción.

En la presente invención, “EAD” representa la abreviatura para dominio activo enzimático. La definición estructural y

funcional de un EAD según la presente invención se facilita en otro lugar de la descripción.

Un “polipéptido quimérico” según la presente invención es una proteína tal como se reivindica. En este contexto, los términos “proteína” y “péptido” pueden usarse de manera intercambiable con el término “enzima”. En otras palabras, un “polipéptido quimérico” de la presente invención es un polipéptido, que comprende dominios heterólogos. La presente invención se describe en las reivindicaciones.

En la presente invención, la fuente o el origen de los dominios comprendidos por la primera y segunda parte del polipéptido quimérico de la presente invención es diferente. Esto no significa que mientras que la primera parte comprende a modo de definición un CBD de bacteriocina, la segunda parte no pueda comprender al menos un dominio activo enzimático (EAD), que es un dominio lítico de una bacteriocina, aunque la lisostafina se excluye como un polipéptido quimérico de la presente invención. Es decir, el CBD y el EAD del polipéptido quimérico de la presente invención pueden no tener su origen en la misma bacteriocina, pero pueden tener su origen en bacteriocinas diferentes. Las bacteriocinas son diferentes entre sí cuando provienen de una diferente fuente u origen de organismo. Las bacteriocinas también son diferentes entre sí cuando no reconocen miembros de la misma especie, sino de especies estrechamente relacionadas o diferentes mediante sitios de receptor de unión en organismos sensibles, o susceptibles.

Una especie o sub-especie bacteriana patógena se define por similitudes halladas entre sus miembros. Propiedades tales como reacciones bioquímicas, composición química, estructuras celulares, características genéticas, y características inmunológicas se usan para definir una especie o sub-especie bacteriana patógena y por tanto diferenciar especies y sub-especies bacterianas patógenas diferentes.

Las secuencias génicas que codifican para el CBD de bacteriocinas según la presente invención pueden derivarse de la correspondiente información genética de las células, que codifican para los dominios/proteínas de unión a la pared celular.

Las lisinas de bacteriófagos están en tres categorías, glicosidasas, amidasas, y endopeptidasas, en función del tipo de enlace químico que escinden dentro del peptidoglicano. Las glicosidasas pueden subdividirse además en las muramididasas, glucosaminidasas, y transglicosilasas.

No sólo se sabe que los bacteriófagos codifican para y producen lisinas, sino también las denominadas enzimas muralíticas asociadas con la cola (TAME), que también pueden hidrolizar paredes celulares bacterianas. Mientras que las lisinas se producen en la fase final del ciclo vital del fago para facilitar la liberación de los fagos progenie a partir de la bacteria huésped, en cambio las TAME se producen durante la primera fase del proceso de infección de una célula huésped. La primera fase del proceso de infección de fago comprende las etapas de adsorción a y penetración en la célula huésped, lo cual se media usando, entre otras cosas, la TAME. Muchos pero no todos los fagos tienen colas unidas a la cabeza del fago.

Las lisinas de bacteriófagos se componen estructuralmente de dos dominios, un dominio activo enzimático lítico y un dominio de unión a células. En la presente invención, la segunda parte del polipéptido quimérico puede comprender una secuencia de aminoácidos del dominio lítico de una lisina de bacteriófagos. Están excluidas de la presente invención enzimas muralíticas asociadas a la cola (TAME) de bacteriófagos. Por tanto, mientras que la segunda parte del polipéptido quimérico de la presente invención puede comprender una secuencia de aminoácidos del dominio lítico de una lisina de bacteriófagos (endolisina), se excluye que el dominio lítico de una lisina de bacteriófagos según la presente invención pueda ser una denominada enzima muralítica asociada a la cola (TAME) de bacteriófagos tal como se describió anteriormente en el presente documento. En otras palabras, están excluidas de la presente invención partes de cola de bacteriófagos o las denominadas enzimas muralíticas asociadas a la cola (TAME) de bacteriófagos que presentan la actividad de hidrolizar paredes celulares bacterianas.

En un aspecto de la presente invención, una bacteria Gram positiva es preferiblemente una bacteria Gram positiva patógena. Más preferiblemente, en la presente invención una bacteria Gram positiva es una bacteria de *Staphylococcus* patógena. Todavía más preferiblemente, en la presente invención una bacteria de *Staphylococcus* patógena es una especie o sub-especie patógena de *Staphylococcus*. En un aspecto de la presente invención, una bacteria de *Staphylococcus* patógena es preferiblemente *S. aureus* o MRSA. En otro aspecto de la presente invención, una bacteria patógena que pertenece al género *Staphylococcus* es preferiblemente *S. epidermidis* o *S. haemolyticus*. En todavía otro aspecto de la presente invención, una bacteria patógena que pertenece al género *Staphylococcus* es preferiblemente *S. simulans* o *S. saprophyticus*. En un aspecto adicional de la presente invención, una bacteria patógena que pertenece al género *Staphylococcus* es preferiblemente *S. hyicus* o *S. warneri*. En un aspecto, una bacteria patógena que pertenece al género *Staphylococcus* es *S. xylosus*.

El dominio lítico de lisostafina tiene una acción lítica específica contra *Staphylococcus*. En particular, el dominio lítico de lisostafina tiene actividad glicil-glicina endopeptidasa. Por consiguiente, en un aspecto de la presente invención el dominio lítico del polipéptido quimérico de la invención es el dominio lítico de lisostafina, que tiene actividad glicil-glicina endopeptidasa. En una realización preferida, el dominio lítico del polipéptido quimérico de la presente invención es el dominio lítico de lisostafina y por tanto el polipéptido quimérico se usa en profilaxis o terapia de infecciones de estafilococos y/o colonizaciones de estafilococos.

La actividad enzimática de un dominio activo enzimático (EAD) se refiere a un polipéptido que tiene la actividad de lisar una bacteria cuya pared celular contiene peptidoglicano. Preferiblemente, la bacteria que tiene una pared celular que contiene peptidoglicano es una bacteria Gram positiva. La naturaleza de peptidoglicano es conocida para el experto en la técnica como un polímero de aminoazúcares entrecruzados por péptidos cortos que forma una matriz covalente que rodea a la membrana citoplásmica y constituye el mayor componente de esqueleto de la pared celular.

Los dominios líticos de la presente invención pueden aislarse de la naturaleza o puede producirse por medios recombinantes o sintéticos. La expresión "dominio lítico" específicamente abarca formas naturales (por ejemplo, formas alternativamente cortadas y empalmadas o modificadas) y variantes naturales de la enzima. En un ejemplo, la enzima de la secuencia nativa es un polipéptido maduro o de longitud completa que se codifica por un gen de un bacteriófago específico para estafilococos patógenicos, preferiblemente *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA).

Un "fago" o "bacteriófago", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la categoría bien conocida de virus que infectan bacterias. Los fagos incluyen secuencias de ADN o ARN encapsuladas en una envuelta o cubierta de proteínas ("cápside").

El término "CHAP" usado en el contexto de la presente invención es conocido para el experto en la técnica como amidohidrolasas/peptidasas dependientes de cisteína-histidina.

En la presente invención, el término "bacteria" preferiblemente describe una "bacteria diana", y se refiere a una bacteria que se une mediante un polipéptido quimérico de la presente invención y/o cuyo crecimiento, supervivencia o replicación se inhibe mediante la actividad enzimática del dominio activo enzimático (EAD) de la segunda parte del polipéptido quimérico según la presente invención. La inhibición del crecimiento bacteriano se refiere a la ralentización o detención de la velocidad de división de una célula bacteriana o al cese de la división celular bacteriana o a la muerte de las bacterias. El término "bacteria diana" incluye específicamente bacterias diana Gram positivas.

"MIC" se refiere a concentración inhibitoria mínima. El valor de MIC se define como la concentración más baja de un polipéptido quimérico de la presente invención que evita el crecimiento visible de bacterias de prueba. Los ensayos de MIC se determinaron mediante el método de dilución de caldo en una modificación de normas del NCCLS (2003; Métodos para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana de dilución para bacterias que crecen de manera aeróbica; norma aprobada M7-A6). La concentración de polipéptidos quiméricos usada osciló de desde 200 µg/ml hasta 0,00019 µg/ml. Se realizaron diluciones de dos veces en caldo de infusión de cerebro y corazón (Brain Heart Infusion, BHI) suplementado con albúmina de suero bovino (Bovine Serum Albumin, BSA) al 0,1% en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Cada pocillo se inoculó con 1×10^5 UFC/ml de estafilococos diluidos de un cultivo de toda la noche crecido en BHI. Se incluyó crecimiento sin proteína como un control. La placa de microtitulación se incubó a 30°C durante 24 horas. Los valores se determinaron midiendo la absorbancia a 620 nm en un lector de microplacas.

"MBC" se refiere a concentración bactericida mínima. Las MBC para polipéptidos quiméricos se determinaron mediante una modificación de las normas de NCCLS (1999; Métodos para determinar actividad bactericida en agentes antimicrobianos; directrices aprobadas Vol.19). La concentración de polipéptidos quiméricos usada osciló de desde 50 µg/ml hasta 0,00005 µg/ml. Se realizaron diluciones de diez veces en Tris/HCl 20 mM pH 8, NaCl 60 mM, CaCl₂ 2 mM complementado con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en tubos de reacción. Estafilococos de un cultivo de toda la noche en BHI se diluyeron hasta un inóculo final de 1×10^5 UFC/ml en cada tubo. Se incluyó un tubo que contenía tampón y BSA pero ninguna proteína como un control. Los tubos de dilución se incubaron a 30°C durante 1 hora. Un volumen de cada muestra (100 µl) se sembró en placas de Agar-LB. El valor de MBC se definió como la dosis de polipéptido quimérico que llevó a una caída de log 3 o superior desde la concentración bacteriana inicial (destrucción del 99,9% del inóculo inicial).

"Polipéptido" se refiere a una molécula compuesta por aminoácidos que corresponde a polipéptidos codificados por una secuencia de polinucleótidos que es natural. El polipéptido puede incluir sustituciones conservativas en las que el aminoácido natural se sustituye con uno que tiene propiedades similares, en las que tales sustituciones conservativas no alteran la función del polipéptido (véase, por ejemplo, Lewin "Genes V" Oxford University Press Capítulo 1, pág. 9-13 1994). Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" normalmente se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Puede hacerse referencia a aminoácidos en el presente documento o bien por sus símbolos de tres letras bien conocidos o bien por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB.

En un aspecto de la divulgación, se proporciona en el presente documento una variante del dominio lítico de una lisina o endolisina de bacteriófagos descrita en el presente documento, que tiene al menos el 80%, preferiblemente el 90%, más preferiblemente el 95%, de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de SEQ ID NO: 1. En diversos aspectos de la divulgación, se proporciona en el presente documento una variante del dominio lítico de una lisina o endolisina de bacteriófagos descrita en el presente documento, que tiene al menos el 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, o 89%, preferiblemente al menos el 91%, 92%, 93%, o 94%, y más preferiblemente el

- 96%, 97%, 98%, o 99%, de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de SEQ ID NO: 1. En otro aspecto de la divulgación, se proporciona en el presente documento una variante del dominio lítico de una bacteriocina descrita en el presente documento, que tiene al menos el 80%, preferiblemente al menos el 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%, de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de SEQ ID NO: 2. En todavía otro aspecto de la divulgación, se proporciona en el presente documento una variante del dominio lítico de una autolisina bacteriana descrita en el presente documento, que tiene al menos el 80%, preferiblemente al menos el 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%, de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de SEQ ID NO: 3. En otro aspecto adicional de la divulgación, se proporciona en el presente documento una variante del CBD de bacteriocina descrito en el presente documento, que tiene al menos el 80%, preferiblemente al menos el 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%, de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de SEQ ID NO: 4. Preferiblemente, estas variantes tienen esencialmente la misma actividad biológica que los correspondientes polipéptidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, y SEQ ID NO: 4, respectivamente.
- También se proporcionan en el presente documento variantes de los polipéptidos quiméricos de SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 15, respectivamente, en el que cada una de las variantes tiene al menos el 80%, preferiblemente al menos el 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%, de identidad de secuencia de aminoácidos con el correspondiente polipéptido de SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 15, respectivamente. En una realización preferida, tales variantes tienen un valor de MIC ≤ 10 $\mu\text{g/ml}$, preferiblemente ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$, y más preferiblemente $\leq 0,1$ $\mu\text{g/ml}$. Además, tales variantes tienen preferiblemente un valor de MBC (99,99%) de $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$, preferiblemente $\leq 0,05$ $\mu\text{g/ml}$.

“Porcentaje (%) de identidad de secuencia de polipéptidos” con respecto a las secuencias de polipéptidos identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de referencia específica, tras alinear las secuencias en el mismo marco de lectura e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y no considerando ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras conocidas por los expertos en la técnica, tal como usando software informático disponible al público tal como software blast.

- La invención proporciona variantes de los polipéptidos quiméricos mencionados anteriormente, que aumentan la estabilidad y/o actividad de los mismos.

Las partes biológicamente activas de un fragmento de proteína o péptido, tal como se describe en el presente documento, incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticos a o derivados de la secuencia de aminoácidos de los EAD y los CBD según la presente invención, que incluyen menos aminoácidos que la proteína de longitud completa y presentan la misma actividad de la correspondiente proteína de longitud completa.

La presente divulgación proporciona ácidos nucleicos que codifican para los polipéptidos quiméricos de la presente invención. Además, se proporcionan en el presente documento ácidos nucleicos que codifican para los CBD y los EAD según la presente invención. También se proporcionan vectores que portan tales ácidos nucleicos y células huésped transformadas o transfectadas con tales vectores.

Tal como se usa en el presente documento, un “ácido nucleico” normalmente se refiere a polímeros de desoxirribonucleótido o ribonucleótidos (puros o mixtos) en forma mono o bicatenaria. La expresión puede abarcar ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos o residuos o enlaces de esqueleto modificados, que son sintéticos, naturales, y no naturales, que tienen propiedades de unión, estructurales o funcionales similares al ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de referencia. Ejemplos no limitantes de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, y ácidos peptidonucleicos (Peptide-Nucleic Acids, PNA). La expresión ácido nucleico puede, en algunos contextos, usarse de manera intercambiable con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.

Las realizaciones de la divulgación incluyen vectores que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos que codifican para una de las secuencias de polipéptidos descritas en el presente documento, o variantes o fragmentos de las mismas. Otros ejemplos se refieren a células huésped que se modifican con ingeniería genética con vectores de la divulgación y la producción de polipéptidos de la divulgación por técnicas recombinantes. También pueden emplearse sistemas de traducción libres de células para producir tales proteínas usando ARN derivados de los constructos de ADN de la divulgación.

Para la producción recombinante, pueden modificarse con ingeniería genética células huésped para incorporar sistemas de expresión o partes de los mismos o polinucleótidos de la divulgación. Puede realizarse la introducción de un polinucleótido en la célula huésped mediante métodos descritos en muchos manuales de laboratorio estándar. Ejemplos representativos de huéspedes apropiados incluyen células bacterianas, tales como estreptococos,

estafilococos, enterococos, células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Bacillus subtilis*; células fúngicas, tales como células de levaduras y células de *Aspergillus*; células de insecto tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células animales tales como CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293 y células de melanoma de Bowes; y células de plantas.

5 Puede usarse una gran variedad de sistemas de expresión para producir los polipéptidos de la divulgación. Tales vectores incluyen, entre otros, vectores cromosómicos, episomales y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófago, de transposones, de episomas de levaduras, de elementos de inserción, de elementos de cromosomas de levaduras, de virus tales como baculovirus, papovavirus, tales como SV40, virus vacuna, adenovirus, virus de viruela aviar, virus y retrovirus de pseudorrabia, y vectores derivados de combinaciones los mismos, así como aquellos derivados de elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos, tales como cósmidos y fagómidos. Los constructos de sistema de expresión pueden contener regiones de control que regulan y también engendran la expresión. Generalmente, cualquier sistema o vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos y/o para expresar un polipéptido en un huésped puede usarse para la expresión en este sentido. La secuencia de ADN apropiada puede insertarse en el sistema de expresión mediante cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas y de rutina. Para la secreción de la proteína traducida en el lumen del retículo endoplásmico, en el espacio periplásmico o en el entorno extracelular, pueden incorporarse señales de secreción apropiadas en el polipéptido expresado. Estas señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

Los polipéptidos de la divulgación pueden recuperarse y purificarse de cultivos de células recombinantes mediante métodos bien conocidos incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxiapatita y cromatografía con lecitina. La cromatografía líquida de alta eficacia también se emplea para la purificación. Pueden emplearse técnicas bien conocidas para el repliegamiento de proteína para regenerar la conformación activa cuando el polipéptido se desnaturaliza durante el aislamiento y/o la purificación.

El ácido nucleico está "operativamente unido" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una secuencia líder de secreción o presecuencia está operativamente unido al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está operativamente unido a una secuencia de codificación si está posicionado de modo que facilita la traducción. Generalmente, "operativamente unido" significa que las secuencias de ADN que están uniéndose son contiguas, y, en el caso de una secuencia líder de secreción, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se logra mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, se usan adaptadores o ligadores de oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional.

Debe entenderse que no todos los vectores, secuencias de control de expresión y huéspedes funcionarán igualmente bien para expresar las secuencias de ADN de esta invención. Tampoco todos los huéspedes funcionarán igualmente bien con el mismo sistema de expresión. Sin embargo, el experto en la técnica será capaz de seleccionar los vectores, secuencias de control de expresión, y huéspedes correctos sin experimentación excesiva para lograr la expresión deseada sin apartarse del alcance de la invención.

Los fragmentos y variantes de los polipéptidos descritos anteriormente en el presente documento incluyen proteínas o péptidos y fragmentos de péptidos que se sintetizan químicamente o se preparan mediante técnicas de ADN recombinantes, o ambos. Cuando la proteína o péptido se produce mediante síntesis química, está preferiblemente sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos, es decir, se separa de precursores químicos u otros químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. Tales variantes de polipéptido incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que uno o más residuos de aminoácidos se añaden, o delecionan en el extremo N- o C-terminal de la secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 15.

Pueden emplearse variantes que son fragmentos de los polipéptidos de la divulgación para producir el correspondiente polipéptido de longitud completa mediante síntesis de péptidos; por tanto, pueden emplearse estas variantes como intermedios para producir los polipéptidos de longitud completa de realizaciones de la divulgación.

Los fragmentos de péptidos pueden prepararse mediante cualquiera de las numerosas técnicas convencionales. Fragmentos de péptidos deseados pueden sintetizarse químicamente. Un enfoque alternativo implica generar fragmentos de enzimas líticas mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima que se sabe que escinde proteínas en sitios definidos por residuos de aminoácidos particulares, o digiriendo el ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislando el fragmento deseado. Todavía otra técnica adecuada implica aislar y amplificar un fragmento de ADN que codifica para un fragmento de polipéptido deseado, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos terminales deseados del fragmento de ADN se emplean en los cebadores 5' y 3' en la PCR.

El polipéptido quimérico según la presente invención comprende una secuencia de ligador. En una realización,

“secuencia de ligador” se refiere a una secuencia de aminoácidos que une las dos partes del polipéptido quimérico, o fragmentos o variantes de la misma. En general, tal como se usa en el presente documento, un ligador es una secuencia de aminoácidos que une de manera covalente los polipéptidos para formar un polipéptido de fusión. El ligador comprende al menos un enlace peptídico. Como apreciará un experto en la técnica, el ligador puede comprender aminoácidos adicionales, tales como glicina y otros aminoácidos neutros pequeños.

La presente invención también se refiere al uso de polipéptidos quiméricos proporcionados por la presente invención para la reducción de determinadas poblaciones bacterianas, incluyendo métodos y composiciones para el tratamiento de varias infecciones bacterianas. Por tanto, la presente invención también se refiere a composiciones y formulaciones que comprenden polipéptidos quiméricos según la presente invención y el uso de tales composiciones en profilaxis o terapia de enfermedades bacterianas, infecciones bacterianas o colonizaciones bacterianas. En un aspecto, una composición o formulación de la presente invención es una composición de descontaminación o formulación de descontaminación. En otro aspecto, una composición o formulación de la presente invención es una composición de descolonización o formulación de descolonización. En todavía otro aspecto, una composición o formulación de la presente invención es un desinfectante.

En un aspecto de la presente invención, los polipéptidos quiméricos se aplican en un método para el tratamiento o profilaxis de infecciones de *Staphylococcus* en un sujeto, en particular para el tratamiento o profilaxis de infecciones por *S. aureus*, *S. aureus* (MRSA), *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. warneri* y/o *S. xylosus*. El sujeto puede ser un sujeto humano o un animal, en particular animales usados en explotación de ganado y/o explotación de ganado lechero tales como ganado bovino y cerdos. El método de tratamiento abarca la aplicación del polipéptido quimérico de la presente invención al sitio de infección o sitio que va a tratarse de manera profiláctica contra la infección en una cantidad suficiente.

En particular, el método de tratamiento puede ser para el tratamiento o la profilaxis de infecciones, en particular por *Staphylococcus aureus* o *S. aureus* (MRSA), de la piel, de tejidos blandos, de bacteriemia y/o endocarditis.

Además, un polipéptido quimérico de la presente invención puede usarse de manera profiláctica como agente higienizante, en particular antes o después de cirugía, o por ejemplo durante hemodiálisis. De manera similar, prematuros y personas con inmunidad comprometida, o aquellos sujetos que necesitan dispositivos protésicos pueden tratarse con un polipéptido quimérico de la presente invención, o bien de manera profiláctica o durante infección aguda. En el mismo contexto, infecciones nosocomiales por *Staphylococcus*, en particular por *S. aureus* o *S. aureus* (MRSA), pueden tratarse de manera profiláctica o durante la fase aguda con un polipéptido quimérico de la presente invención. En esta realización, un polipéptido quimérico de la presente invención puede usarse como un desinfectante también en combinación con otros ingredientes útiles en una disolución desinfectante tal como detergentes, tensioactivos, disolventes, antibióticos, lantibióticos, o bacteriocinas.

En una realización particular, un polipéptido quimérico de la presente invención se usa para tratamiento médico, si la infección que va a tratarse (o prevenirse) está causada por cepas de *Staphylococcus* multirresistentes, en particular por cepas resistentes a vancomicina, linezolid o daptomicina.

Una composición tal como se da a conocer en el presente documento puede comprender más de un polipéptido quimérico según la presente invención y/o puede comprender uno o más agentes adicionales. Ejemplos no limitantes de un agente adicional incluyen una enzima, un antibiótico, un agente antifúngico, un bactericida, un analgésico y un agente antiinflamatorio.

Una composición o formulación según la presente invención preferiblemente comprende un vehículo adecuado para administrar el polipéptido quimérico al sitio de la enfermedad bacteriana, infección bacteriana o colonización bacteriana. Las composiciones y formulaciones según la presente invención son útiles para tratar y eliminar infestaciones bacterianas en cualquier lugar, incluyendo infecciones respiratorias superiores, infecciones tóxicas y sistémicas, infecciones vaginales, infecciones oculares, infecciones del oído, infecciones que requieren tratamiento parenteral, así como para la eliminación de bacterias en cualquier superficie, incluyendo la piel humana y membrana mucosa, preferiblemente la membrana mucosa del tracto respiratorio superior, más preferiblemente la membrana mucosa de la cavidad nasal. Las composiciones y formulaciones según la presente invención son particularmente útiles para la profilaxis y el tratamiento de infecciones respiratorias superiores, infecciones de piel, heridas, quemaduras, infecciones vaginales, infecciones oculares, trastornos intestinales y trastornos dentales. Específicamente, la invención proporciona la aplicación de los polipéptidos quiméricos para la descolonización nasal y/o de piel de humanos y animales.

Las composiciones y formulaciones que comprenden un polipéptido quimérico de la presente invención como principio activo se aplican en una cantidad eficaz cuando se usan en profilaxis y terapia. La expresión “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad de un principio activo suficiente para lograr un efecto deseado sin causar un efecto secundario no deseado. En algunos casos, puede ser necesario lograr un equilibrio entre obtener un efecto deseado y limitar la gravedad de un efecto no deseado. La cantidad de principio activo usado variará en función del tipo de principio activo y el uso pretendido de la composición y/o formulación de la presente invención.

En realizaciones preferidas, la presente invención se refiere a polipéptidos quiméricos de la invención como un

tratamiento profiláctico para prevenir aquellos sujetos, preferiblemente sujetos humanos, que posiblemente hayan sido expuestos a bacterias de *Staphylococcus*, o como un tratamiento terapéutico para aquellos sujetos, preferiblemente sujetos humanos, que ya hayan enfermado de una infección con bacterias de *Staphylococcus*. Los polipéptidos quiméricos descritos en el presente documento son específicos para la descolonización de bacterias de *Staphylococcus*, y preferiblemente degradan de manera eficaz y efectiva la pared celular de bacterias de *Staphylococcus*, preferiblemente de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA).

Los polipéptidos quiméricos de la presente invención pueden formularse según métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, por lo que el polipéptido quimérico se combina en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones, que pueden usarse para el tratamiento profiláctico y terapéutico de una infección bacteriana, preferiblemente una infección por bacterias de *Staphylococcus*, también incluyen un medio de aplicación (tal como un sistema de vehículo o un modo de administración oral) al revestimiento mucoso de la cavidad oral y nasal, de modo que la enzima se pone en el sistema de vehículo o modo de administración oral para alcanzar el revestimiento mucoso.

Los “vehículos”, tal como se usa en el presente documento, incluyen vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, que no son tóxicos para la célula o el sujeto que está exponiéndose a los mismos a las dosis y concentraciones empleadas. A menudo el vehículo fisiológicamente aceptable es una disolución tamponada de pH acuosa. Ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween®, polietilenglicol (PEG), y Pluronic®.

Antes de, o en el momento en que un polipéptido quimérico de la invención se pone en el sistema de vehículo o modo de administración oral, la enzima puede estar en un ambiente de tampón estabilizante para mantener un intervalo de pH adecuado, tal como entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0, incluyendo un pH de aproximadamente 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 o cualquier intervalo de pH de 0,05 entre los mismos, o cualquier intervalo que es múltiplo de 0,05 entre los mismos, es decir, incluyendo por ejemplo valores de pH de 5,2, 6,5, 7,4, 7,5 y 8,5.

Las formulaciones terapéuticas se preparan para el almacenamiento mezclando el principio activo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas.

Cualquiera de los vehículos para los polipéptidos quiméricos de la presente invención puede fabricarse por medios convencionales. Sin embargo, si se usa alcohol en el vehículo, la enzima debe estar en una micela, liposoma, o un liposoma “inverso”, para evitar la desnaturalización de la enzima. De manera similar, cuando el polipéptido quimérico está colocándose en el vehículo, y el vehículo se calienta o se ha calentado, tal colocación debe hacerse después de que el vehículo se haya enfriado ligeramente, para evitar la desnaturalización por calor de la enzima. El vehículo preferiblemente es estéril. Uno o más polipéptidos quiméricos pueden añadirse a estas sustancias en una forma líquida o en un estado liofilizado, con lo que se solubilizará cuando se encuentre con un cuerpo líquido.

Un tampón estabilizante debe permitir la actividad óptima del polipéptido quimérico. El tampón puede contener un reactivo reductor, tal como ditioneitol. El tampón estabilizante también puede ser o incluir un reactivo de quelación de metal, tal como la sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético, o también puede contener un tampón de fosfato o citrato fosfato, o cualquier otro tampón.

Fármacos según la presente invención pueden incluir agentes antiinflamatorios, agentes antivirales, agentes anestésicos locales, corticosteroides, agentes de terapia destructiva, antifúngicos, y/o antiandrógenos. Anestésicos locales incluyen tetracaína, clorhidrato de tetracaína, lidocaína, clorhidrato de lidocaína, diclonina, clorhidrato de diclonina, clorhidrato de dimetisoquina, dibucaina, clorhidrato de dibucaina, picrato de butambeno y clorhidrato de pramoxina. Un ejemplo de concentración para anestésicos locales es de aproximadamente del 0,025% a aproximadamente el 5% en peso de la composición total. Anestésicos tales como benzocaína también pueden usarse a una concentración preferida de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 25% en peso.

Los corticosteroides que pueden usarse incluyen dipropionato de betametasona, acetónido de fluocinolona, valerato de betametasona, acetónido de triamcinolona, propionato de clobetasol, desoximetasona, diacetato de diflasona, amcinonida, flurandrenolida, valerato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, y desonida y se recomiendan a concentraciones de aproximadamente el 0,01% al 1,0% en peso. Las concentraciones para corticosteroides tales como hidrocortisona o acetato de metilprednisolona pueden ser de desde aproximadamente el 0,2% hasta aproximadamente el 5,0% en peso.

También pueden usarse agentes de terapia destructiva tales como ácido salicílico o ácido láctico. Puede usarse una concentración de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 40% en peso. Puede utilizarse cantaridina, por

ejemplo, en una concentración de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 30% en peso. Antifúngicos típicos que pueden usarse en composiciones tópicas y ejemplos de concentraciones en peso adecuadas incluyen: nitrato de oxiconazol (del 0,1% al 5,0%), ciclopirox olamina (del 0,1% al 5,0%), ketoconazol (del 0,1% al 5,0%), nitrato de miconazol (del 0,1% al 5,0%), y nitrato de butoconazol (del 0,1% al 5,0%). Pueden incluirse otros agentes tópicos para abordar una variedad de co-infecciones tópicas que pueden producirse tal como apreciarán los expertos en la técnica.

Para acelerar el tratamiento de la infección, el agente terapéutico puede incluir además al menos un agente complementario que también puede potenciar la actividad bactericida del dominio lítico del polipéptido quimérico de la invención. El agente complementario puede ser eritromicina, claritromicina, azitromicina, roxitromicina, y otros miembros de la familia de los macrólidos, penicilinas, cefalosporinas, y cualquier combinación de los mismos en cantidades que son eficaces para realzar sinérgicamente el efecto terapéutico del polipéptido quimérico de la invención. De manera similar, otras enzimas líticas puede incluirse en el vehículo para tratar otras infecciones bacterianas. Pueden incluirse proteínas de holina en el tratamiento terapéutico.

En algunas realizaciones, puede usarse un tensioactivo suave en una cantidad eficaz para potenciar el efecto terapéutico del polipéptido en o en combinación con una composición terapéutica o profiláctica. Tensioactivos suaves adecuados incluyen, entre otros, ésteres de sorbitán polioxietileno y ácidos grasos (serie Tween), octilfenoxipoliethoxietanol (serie Tritón X), n-octil- β -D-glucopiranosido, n-octil- β -D-tioglucopeiranosido, n-decil- β -D-glucopiranosido, n-dodecil- β -D-glucopiranosido, y tensioactivos biológicos, por ejemplo, ácidos grasos, glicéridos, monoglicéridos, desoxicolato y ésteres de desoxicolato.

Composiciones terapéuticas que comprenden uno o más polipéptidos quiméricos o variantes o fragmentos de los mismos pueden administrarse o aplicarse a un sujeto por cualquier medio adecuado. Medios de aplicación del(de los) polipéptido(s) quimérico(s) (modificados o no modificados) de la invención incluyen, pero no se limitan a, medios directos, indirectos, de vehículo y especiales o cualquier combinación de medios. La aplicación directa del polipéptido quimérico puede ser por pulverizadores nasales, gotas nasales, ungüentos nasales, lavados nasales, inyecciones nasales, taponamientos nasales, pulverizadores bronquiales e inhaladores, o indirectamente a través del uso de grageas para la garganta, colutorios o gárgaras, o través del uso de ungüentos aplicados a los orificios nasales, o cualquier combinación de éstos y similares métodos de aplicación. Las formas en las que el polipéptido quimérico puede administrarse incluyen pero no se limitan a polvos, pulverizadores, líquidos, geles, ungüentos y aerosoles. Lo más probable es que la exposición a las bacterias sea a través de la nariz. Se prefieren pulverizadores, líquidos, geles, ungüentos y aerosoles. Se prefieren particularmente líquidos, geles y ungüentos. Lo más preferido son líquidos y geles.

Cuando el polipéptido quimérico se introduce directamente mediante el uso de pulverizadores nasales, gotas nasales, ungüentos nasales, lavados nasales, inyecciones nasales, taponamiento nasal, pulverizadores bronquiales, pulverizadores orales o inhaladores, el polipéptido quimérico puede estar en un ambiente líquido o de gel, con el líquido actuando como el vehículo. Puede administrarse una versión anhidra seca de la enzima modificada mediante el inhalador y el pulverizador bronquial, aunque también puede usarse una forma líquida de administración.

Específicamente, se proporcionan en el presente documento recetas de formulación de los polipéptidos quiméricos de la invención en matrices acuosas líquidas.

Específicamente, se proporcionan en el presente documento recetas de formulación de los polipéptidos quiméricos de la invención en matrices semisólidas para aplicaciones tópicas.

Tal como se observó anteriormente, el polipéptido quimérico también puede colocarse en un pulverizador nasal, en el que el pulverizador es el vehículo. El pulverizador nasal puede ser un pulverizador de acción larga o de liberación sostenida, y puede fabricarse por medios bien conocidos en la técnica. También puede usarse un inhalable, de modo que la enzima puede alcanzar más abajo el tracto bronquial, incluyendo el interior de los pulmones.

Cualquiera de los vehículos para el polipéptido quimérico puede fabricarse por medios convencionales. Sin embargo, se prefiere que cualquier colutorio o productos de tipo similar no contengan alcohol para evitar la desnaturalización de la enzima, aunque pueden usarse enzimas en liposomas y en otros modos y formas de protección en alcohol.

La dosis y vía de administración usadas en un método de tratamiento (o profilaxis) según la presente invención depende de la enfermedad/sitio de infección específico que va a tratarse. La vía de administración puede ser, por ejemplo, en realizaciones particulares vía oral, tópica, nasofaríngea, parenteral, intravenosa, rectal o cualquier otra vía de administración.

Las velocidades o cantidades de dosis eficaces de la(s) enzima(s) para tratar la infección dependerán en parte de si el polipéptido quimérico se usará de manera terapéutica o profiláctica, la duración de la exposición del receptor a las bacterias infecciosas, el tamaño y peso del individuo, etc. La duración para el uso de la composición que contiene el polipéptido quimérico también depende de si el uso es con fines profilácticos, en los que el uso puede ser de forma horaria, diaria o semanal, durante un periodo de tiempo corto, o si el uso será con fines terapéuticos en los que puede ser necesario un régimen más intensivo del uso de la composición, de modo que el uso puede durar horas,

días o semanas, y/o todos los días, o a intervalos programados durante el día. Cualquier forma de dosis empleada debe proporcionar un número mínimo de unidades para una cantidad mínima de tiempo. La concentración de las unidades activas de polipéptido quimérico que pueden proporcionar una cantidad o dosis eficaz del polipéptido quimérico puede estar en el intervalo de 10 unidades/ml a 500.000 unidades/ml de fluido en el ambiente mojado o húmedo de las cavidades orales y nasales, y tópicamente también y posiblemente en el intervalo de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 unidades/ml a 50.000 unidades/ml. Valores representativos por tanto incluyen aproximadamente 200 unidades/ml, 300 unidades/ml, 500 unidades/ml, 1.000 unidades/ml, 2.500 unidades/ml, 5.000 unidades/ml, 10.000 unidades/ml, 20.000 unidades/ml, 30.000 unidades/ml, y 40.000 unidades/ml. Más específicamente, la exposición temporal a las unidades de enzima activa puede influir en la concentración deseada de unidades activas de enzima por ml. Debe observarse que los vehículos que se clasifican como vehículos de liberación "larga" o "lenta" (tal como, por ejemplo, determinados pulverizadores nasales o grageas) podrían poseer o proporcionar una menor concentración de unidades activas (de enzima) por ml, pero a lo largo de un periodo de tiempo más largo, mientras que un vehículo de liberación "corta" o "rápida" (tal como, por ejemplo, una gárgara) podría poseer o proporcionar una alta concentración de unidades activas (de enzima) por ml, pero a lo largo de un periodo de tiempo más corto. La cantidad de unidades activas por ml y la duración de tiempo de exposición dependen de la naturaleza de la infección, de si el tratamiento va a ser profiláctico o terapéutico y otras variables. Por tanto, el número de dosis dependerá de las circunstancias y puede oscilar desde 1 hasta 4 veces al día o más, con duraciones desde un día hasta múltiples semanas.

"Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en los que el objeto es prevenir o ralentizar (reducir) la condición o trastorno patológico diana, que es una condición o trastorno causado por bacterias patológicas, específicamente bacterias patológicas Gram positivas, más específicamente estafilococos, más específicamente *Staphylococcus aureus*, y lo más específicamente MRSA. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con el trastorno así como aquellos con tendencia a tener el trastorno o aquellos para los que el trastorno ha de prevenirse.

"Animal" con fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo animales domésticos y de granja, y animales de zoológicos, deportes, o de mascota, tales como perros, gatos, ganado bovino, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc.

Las formulaciones que van a usarse para la administración *in vivo* son preferiblemente estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes de o seguido de liofilización y reconstitución.

La vía de administración es según métodos conocidos. Al tratar una exposición o infección bacteriana, el polipéptido quimérico puede administrarse de cualquier modo adecuado, incluyendo administración tópica o a través de la cavidad oral o nasal. Para la aplicación tópica, un polipéptido de la presente invención puede administrarse mediante una loción o apósito. Para la aplicación nasofaríngea, un polipéptido quimérico según la presente invención puede formularse en suero fisiológico para aplicarse mediante un pulverizador a la nariz.

Las dosis y concentraciones de fármaco deseadas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar en función del uso particular contemplado. La determinación de la dosis o vía de administración apropiada está dentro de las capacidades de un médico.

Se prevé que formulaciones diferentes serán eficaces para compuestos de tratamiento diferentes y trastornos diferentes, que la administración que selecciona como diana un órgano o tejido, por ejemplo, puede necesitar la administración de manera diferente a la de otro órgano o tejido.

Las composiciones y formulaciones para tratar infecciones tópicas comprenden una cantidad eficaz de al menos un polipéptido quimérico de la presente invención producido según esta divulgación y un vehículo para administrar al menos un polipéptido quimérico a la piel infectada. El modo de aplicación para el polipéptido quimérico incluye numerosos tipos y combinaciones diferentes de vehículos que incluyen, pero no se limitan a, un líquido acuoso, un líquido de base de alcohol, un gel hidrosoluble, una loción, un ungüento, una base líquida no acuosa, una base de aceite mineral, una mezcla de aceite mineral y vaselina, lanolina, liposomas, vehículos de proteína tales como albúmina de suero o gelatina, carmel celulosa en polvo, y combinaciones de los mismos. En una realización, un vehículo preferido es un líquido acuoso. En otra realización preferida, un vehículo preferido es un líquido de base de alcohol. En una realización adicional, un vehículo preferido es un gel hidrosoluble. En una realización adicional, un vehículo preferido es una base líquida no acuosa. En otra realización adicional, un vehículo preferido es una loción o un ungüento.

Un modo de administración del vehículo que contiene el agente terapéutico incluye, pero no se limita a, un extendido, un pulverizador, un parche de liberación sostenida, un paño impregnado en líquido, y combinaciones de los mismos. Un modo de administración preferido del vehículo que contiene el agente terapéutico es un extendido. En un aspecto, un modo de administración preferido del vehículo que contiene el agente terapéutico es un pulverizador. En una realización, un modo de administración preferido del vehículo que contiene el agente terapéutico es un paño impregnado en líquido. En una realización adicional preferida, un modo de administración preferido del vehículo que contiene el agente terapéutico es un paño impregnado en líquido.

El polipéptido quimérico puede aplicarse a una venda o bien directamente o bien en uno de los otros vehículos. Las vendas pueden venderse húmedas o secas, en las que el polipéptido quimérico está en una forma liofilizada en la venda. Este método de aplicación es lo más eficaz para el tratamiento de la piel infectada.

- 5 También pueden usarse conservantes en esta invención y pueden comprender, por ejemplo, aproximadamente el 0,05% al 0,5% en peso de la composición total. El uso de conservantes garantiza que si el producto está contaminado con microbios, la formulación prevendrá o disminuirá el crecimiento de microorganismos. Algunos conservantes útiles en esta invención incluyen metilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, cloroxilenol, benzoato sódico, DMDM hidantoína, carbamato de 3-yodo-2-propilbutilo, sorbato potásico, digluconato de clorhexidina, o una combinación de los mismos.
- 10 Todas las aplicaciones médicas dependen del efecto de los polipéptidos quiméricos de la presente invención para lisar de manera específica e inmediata bacterias, preferiblemente bacterias Gram positivas, más preferiblemente bacterias Gram positivas patógenas, y todavía más preferiblemente bacterias de estafilocos patógenas cuando se encuentran. Esto tiene un impacto inmediato en el estado de salud del sujeto tratado proporcionando una reducción en bacterias patógenas y carga bacteriana y simultáneamente alivia el sistema inmunitario. Por tanto, la
- 15 mayor tarea a la que se enfrenta un experto en la técnica es formular los polipéptidos quiméricos de la presente invención de manera precisa para la enfermedad respectiva que va a tratarse. Con este fin, habitualmente puede usarse la misma formulación galénica que se emplea para medicamentos convencionales para estas aplicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1: Clonación de PRF115 / Secuencia = CHAP_{lysk}-Lisostafina

- 20 Se clonó PRF115 mediante "PCR de corte y empalme por extensión de solapamiento" (Splicing by Overlap Extension, SOE-PCR). En dos reacciones PCR separadas, se amplificaron CHAP_{lysk} y Lisostafina, generando fragmentos solapantes, que se combinan en el constructo de longitud completa en una tercera PCR. Se amplificó CHAP_{lysk} usando pET14b_Lysk como una plantilla con un 5'-oligonucleótido-promotor de T7 y un 3'-oligonucleótido que se hibrida al extremo terminal 3' del CHAP y que contiene 15 bases del extremo terminal 5' de Lisostafina. Se
- 25 amplificó Lisostafina usando pET14b_Lisostafina como una plantilla con un 5'-oligonucleótido que se hibrida al extremo terminal 5' de Lisostafina y que contiene 15 bases del extremo terminal 3' de CHAP_{lysk} y 3'-oligonucleótido-terminador de T7. En una tercera reacción PCR, se usaron los fragmentos solapantes de las primeras PCR como plantilla y se amplificó el gen PRF115 de longitud completa usando oligonucleótidos-promotor de T7 y terminador de T7. Se digirió el producto de PCR resultante (i) con NcoI y BamHI, se ligó en pET14b y pQE60 respectivamente y se transformó en *E. Coli* HMS174(DE3) y *E.coli* M15 respectivamente. Se confirmó la secuencia mediante la
- 30 secuenciación completa del gen PRF115.

ATGGCGAAAACCCAGGCGGAAATTAACAAACGTCTGGATGCGTATGCGAAAGGCACCGTGGATAG
 CCCGTATCGTGTGAAAAAGCGACCAGCTATGATCCGAGCTTTGGCGTGATGGAAGCGGGTGCGA
 TTGATGCGGATGGCTATTATCACGCGCAGTGCCAGGATCTGATTACCGATTATGTGCTGTGGCTG
 ACCGATAACAAAGTGCGTACCTGGGGCAACGCGAAAGATCAGATCAAACAGAGCTATGGCACCGG
 CTTTAAAATCCATGAAAACAAACCGAGCACCGTGCCGAAAAAAGGCTGGATTGCGGTGTTTACCA
 GCGGCAGCTATGAACAGTGGGGCCATATTGGCATTGTGTATGATGGCGGCAACACCAGCACCTTT
 ACCATTCTGGAACAGAACTGGAACGGCTATGCGAACAAAAACCGACCAACGCGTGGATAACTA
 TTATGGCCTGACCCATTTTATTGAAATTCGGTGAAAGCGGGCACCACCGTGAAAAAAGAAACCG
 CGAAAAAAGCGCGAGCAAAACCCCGCGCCGAAAAAAGCCACCCTGAAAGTGAGCAAAAC
 CACATCAACTATACGatgGCGGCGACGCACGAGCATAGCGCCAGTGGCTGAATAATTACAAAAA
 GGGTTACGGTTATGGCCCGTACCCGCTGGGCATCAATGGCGGCATGCACTATGGCGTAGACTTCT
 TTATGAACATTGGCACGCCGGTTAAAGCGATCAGTTCGGGTAATTTGTGGAAGCGGGCTGGAGT
 AACTACGGTGGTGGTAACCAGATCGGCTTGATTGAAAATGATGGCGTGCACCGTCAGTGGTACAT
 GCATCTGTGCGAAATATAACGTAAAGGTGGGCGACTATGTGAAAGCGGGTCAAATTATTGGTTGGT
 CCGGTAGCACCGGTTATAGTACGGCGCCGCACCTGCATTTCCAGCGTATGGTGAATAGCTTTTCT
 AATAGTACCGCACAAAGACCCGATGCCGTTTCTGAAATCCGCGGGTTATGGCAAAGCGGGCGGCAC
 CGTGACTCCGACCCCGAACACGGGCTGGAACCAACAAGTACGGTACTCTTTACAAAAGCGAGA
 GCGCATCTTTTACGCCAACACGGACATCATCACGCGCACCACCGGCCCATTTTCGCAGCATGCCA
 CAGAGCGGCGTCTTGAAAGCGGGCCAGACCATTCACTACGATGAAGTTATGAAACAGGACGGCCA
 TGTGTGGGTGGGCTATACCGGCAACAGCGGCCAGCGTATTTATTTACCGGTTTCGCACCTGGAATA
 AAAGCACCAATACCTTAGGCGTGTTATGGGGTACCATTAAAG

MAKTQAEINKRLDAYAKGTVDSPYRVKKATSYDPSFGVMEAGAIADAGYYHAQCQDLITDYVLWL
 TDNKVRTWGNADQIKQSYGTGFKIHENKPSTVPKKGWIAVFTSGSYEQWGHIGIVYDGGNTSTF
 TILEQNWNGYANKKPTKRVDNYYGLTHFIEIPVKAGTTVKKETAKKSASKTPAPKKKATLKVSKN
 HINYTMAATHEHSAQWLNNYKKGYGYPPLGNGMHYGVDFMNIPTVKAISGKIVEAGWS
 NYGGGNQIGLIENDGVHRQWYMHLSKYNVKGVDYVKAQIIIGWSGSTGYSTAPHLHFQRMVNSFS
 NSTAQDPMFPFLKSAGYGKAGGTVPPTPNTGWKTNKYGTLYKSESASFTPNTDIITRTTGPFRRSMF
 QSGVLKAGQTIHYDEVMMKQDGHVWVGTYTGN SGQRIYLPVRTWNKSTNTLGVWLGTIK

Ejemplo 2: Clonación de PRF119 / Secuencia = CHAP_{lysk}-CBD_{lisostafina}

Se clonó PRF119 mediante "PCR de corte y empalme por extensión de solapamiento" (SOE-PCR). En dos reacciones PCR separadas, se amplificaron CHAP_{lysk} y CBD_{lisostafina}, generando una zona de solapamiento en ambos fragmentos. Se amplificó CHAP_{lysk}, usando pET14b_Lysk como una plantilla con 5'-oligonucleótido-promotor de T7 y un 3'-oligonucleótido que se hibrida al extremo terminal 3' del CHAP que contenía 15 bases del extremo terminal 5' del CBD lisostafina. Se amplificó CBD_{lisostafina} usando pET14b_Lisostafina como una plantilla con un 5'-oligonucleótido que se hibrida al extremo terminal 5' del CBD_{lisostafina} y que contiene 15 bases del extremo terminal 3' de CHAP_{lysk} y 3'-oligonucleótido-terminador de T7. En una segunda reacción PCR, se usaron como plantilla los fragmentos solapantes de las primeras PCR y se amplificó el gen PRF119 de longitud completa usando oligonucleótidos-promotor de T7 y terminador de T7. Se digirió el producto de PCR resultante (i) con NcoI y BamHI, se ligó en pET14b y pQE60 respectivamente y se transformó en *E. Coli* HMS174(DE3) y *E.coli* M15 respectivamente. Se confirmó la secuencia mediante la secuenciación completa del gen PRF119.

ATGGCGAAAACCCAGGCGGAAATTAACAAACGTCTGGATGCGTATGCGAAAGGCACCGTGGATAG
 CCCGTATCGTGTGAAAAAAGCGACCAGCTATGATCCGAGCTTTGGCGTGATGGAAGCGGGTGCGA
 TTGATGCGGATGGCTATTATCACGCGCAGTGCCAGGATCTGATTACCGATTATGTGCTGTGGCTG
 ACCGATAACAAAGTGCCTACCTGGGGCAACGCGAAAGATCAGATCAAACAGAGCTATGGCACCGG
 CTTTAAAATCCATGAAAACAAACCGAGCACCGTGCCGAAAAAAGGCTGGATTGCGGTGTTTACCA
 GCGGCAGCTATGAACAGTGGGGCCATATTGGCATTGTGTATGATGGCGGCAACACCAGCACCTTT
 ACCATTCTGGAACAGAACTGGAACGGCTATGCGAACAAAAAACCAGACCAAAACGCGTGGATAACTA
 TTATGGCCTGACCCATTTTATTGAAATTCGGTGATGTCTAATAGCACCGCGCAGGACCCGATGC
 CGTTCTTGAAGTCGGCGGGCTATGGCAAAGCAGGCGGCACCGTGA CTCCGACCCCGAACACGGGC
 TGGAAAACCAACAAGTACGGTACTCTTTACAAAAGCAGAGCGCATCTTTTACGCCAAACACGGA
 CATCATCACGCGCACCAACCGGCCCATTTTCGCAGCATGCCACAGAGCGGCGTCTTGAAAGCGGGCC
 AGACCATTCACTACGATGAAGTTATGAAACAGGACGGCCATGTGTGGGTGGGCTATACCGGCAAC
 AGCGGCCAGCGTATTTATTTACCGGTTTCGCACCTGGAATAAAAGCACCAATACCTTAGGCGTGTT
 ATGGGGTACCATTAAAGTAA

MAKTQAEINKRLDAYAKGTVDSPYRVKKATSYDPSFGVMEAGAIADAGYYHAQCQDLITDYVLWL
 TDNKVRTWGNADQIKQSYGTGFKIHENKPSTVPKKGWIAVFTSGSYEQWGHIGIVYDGGNTSTF
 TILEQNWNGYANKKPTKRVDNYYGLTHFIEIPVMSNSTAQDPMFPFLKSAGYGKAGGTVPPTPNTG
 WKTNKYGTLYKSESASFTPNTDIITRTTGPFRRSMFQSGVLKAGQTIHYDEVMMKQDGHVWVGTYTGN
 SGQRIYLPVRTWNKSTNTLGVWLGTIK

Ejemplo 3: Clonación de PRF102 / Secuencia = CHAP_{lytN}-CBD_{lisostafina}

Se clonó PRF102 mediante "PCR de corte y empalme por extensión de solapamiento" (SOE-PCR). En dos reacciones PCR separadas, se amplificaron CHAP_{lytN} y CBD_{lisostafina}, generando una zona de solapamiento en ambos fragmentos.

Se amplificó CHAP_{lytN} usando pET14b_CHAP_{lytN} como una plantilla con 5'-oligonucleótido-promotor de T7 y un 3'-oligonucleótido que se hibrida al extremo terminal 3' del CHAP_{lytN} que contenía 15 bases del extremo terminal 5' del CBD_{lisostafina}. Se amplificó CBD_{lisostafina} usando pET14b_Lisostafina como una plantilla con un 5'-oligonucleótido que se hibrida al extremo terminal 5' del CBD_{lisostafina} y que contiene 15 bases del extremo terminal 3' de CHAP_{lytN} y 3'-oligonucleótido-terminador de T7. En una segunda reacción PCR, se usaron los fragmentos solapantes de las primeras PCR como plantilla y se amplificó el gen PRF102 de longitud completa usando oligonucleótidos-promotor de T7 y terminador de T7. Se digirió el producto de PCR resultante (i) con NcoI y BamHI, se ligó en pET14b y pQE60 respectivamente y se transformó en *E. Coli* HMS174(DE3) y *E.coli* M15 respectivamente. Se confirmó la secuencia mediante la secuenciación completa del gen PRF102.

ATGGCGAGTACATTAAATTATTTGAAAACATTAGAGAATAGAGGATGGGATTTTCGACGGTAGTTA
 TGGATGGCAATGTTTCGATTTAGTTAATGTATATTGGAATCATCTTTATGGTCATGGATTAAG
 GATATGGAGCTAAAGATATACCATATGCAAATAATTTTAATAGTGAAGCTAAAATTTATCACAAC
 ACACCAACTTTCAAAGCTGAACCTGGGGACTTAGTGTTTATTAGTGAAGATTTGGTGGAGGATA
 TGGTCATACAGCTATTGTCTTAAATGGTGATTATGATGGAAAATTAATGAAGTTCCAAAGTTAG
 ATCAAACTGGAATAATGGTGGATGGCGTAAAGCAGAGGTTGCACATAAAGTTGTTTCATAATTAT
 GAAAATGATATGATTTTTATTAGACCATTAAAAAGCAATGTCTAATAGCACCGCGCAGGACCC
 GATGCCGTTCTTGAAGTCGGCGGGCTATGGCAAAGCAGGCGGCACCGTGACTCCGACCCCGAACA
 CGGGCTGGAACCAACAAGTACGGTACTCTTTACAAAAGCGAGAGCGCATCTTTTACGCCAAAC
 ACGGACATCATCACGCGCACCACCGGCCCATTTTCGCAGCATGCCACAGAGCGGCGTCTTGAAAGC
 GGGCCAGACCATTCACCTACGATGAAGTTATGAAACAGGACGGCCATGTGTGGTGGGCTATACCG
 GCAACAGCGGCCAGCGTATTTATTTACCGGTTTCGCACCTGGAATAAAAGCACCAATACCTTAGGC
 GTGTTATGGGGTACCATTAAGTAA

MASTLNYLKTLENRGWDFDGSYGWQCFDLVNVYWNHLYGHGLKGYGAKDIPYANNFNSEAKIYHN
 TPTFKAEPGDLVVFSGRFGGGYGHTAIVLNGDYDGKLMKFQSLDQNWNNGGWRKA EVAHKVVHNY
 ENDMI FIRPFKAMSNSTAQDPMFPLKSAGYKAGGTVPTPTNTGWKTNKYGTLYKSESASFPTN
 TDIITRTTGPFPRSMPPQSGVLKAGQTIHYDEVMKQDGHVWVGTYTGNSSGQRIYLPVRTWNKSTNTLG
 VLWGTIK

Ejemplo 4: Datos de MIC

- 5 La determinación de valores de MIC se realizó en placas de 96 pocillos (Nunc, Nunclon Δ). Se mezclaron concentraciones desde 200 $\mu\text{g/ml}$ hasta 0,00019 $\mu\text{g/ml}$ de proteína con 2×10^4 ufc/pocillo de cultivo de células de *Staphylococcus* en medio BHI. Se incubó la placa a 30°C y se midió la densidad óptica a 600 nm tras 24 horas. Los valores de MIC se correlacionan con la concentración de proteína más baja a la que no se observó ningún crecimiento de bacterias. Los resultados se muestran en la tabla 1.

10 Tabla 1: Concentración inhibitoria mínima (MIC)

Proteína	Valor de MIC para <i>S. aureus</i> ($\mu\text{g/ml}$)
PRF115	0,059
PRF119	0,39
PRF102	9,95
PRF133	0,1
LysK	87,5

Ejemplo 5: Datos de MBC

- 15 Se hizo crecer un cultivo de *Staphylococcus* con una densidad óptica de 0,1 en medio BHI a 37°C hasta una densidad óptica de 0,8 (se correlaciona con 10^8 Ufc/ml). Se recogieron las células (4.500 rpm, 4°C, 10 minutos) y se resuspendieron en el mismo volumen de (i) Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 60 mM, CaCl_2 2 mM, BSA al 0,1% estéril. Entonces se diluyó el cultivo a 10^5 Ufc/ml en Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 60 mM, CaCl_2 2 mM, BSA al 0,1% estéril. Se mezclaron las células con concentraciones de proteína desde 50 $\mu\text{g/ml}$ hasta 0,00005 $\mu\text{g/ml}$ y se incubaron a 30°C durante 1 hora. Se sembraron diluciones desde 10^5 hasta 10^2 Ufc/ml en placas de Agar-LB, se incubaron durante toda la noche a 37°C y se contaron las colonias. Los valores de MBC (99,99%) se correlacionan con la
 20 concentración de proteína más baja a la que se midió una reducción de log cuatro de células bacterianas. El resultado se muestra en la tabla 2.

Tabla 2: Concentración bactericida mínima (MBC)

Proteína	Valor de MBC (99,99%) para <i>S. aureus</i> ($\mu\text{g/ml}$)
PRF102	0,05

Ejemplo 6: Reducción log en Mucina

Se hizo crecer un cultivo de *Staphylococcus* con una densidad óptica de 0,1 en medio BHI a 37°C hasta una densidad óptica de 0,8 (se correlaciona con 10^8 Ufc/ml). Se recogieron las células (4.500 rpm, 4°C, 10 minutos) y se resuspendieron en el mismo volumen de (i) Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 60 mM, CaCl_2 2 mM estéril y (ii) Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 60 mM, CaCl_2 2 mM estéril más mucina bovina al 2%. Se mezclaron muestras de ambas preparaciones con proteína 0,1 mg/ml y se sembraron las diluciones en placas de Agar Manitol Salado tras 1 - 10 minutos. Se incubaron las placas a 37°C y se contaron las colonias. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Reducción log de células de *S. aureus* en mucina

Proteína	Reducción log
PRF119	5
PRF102	5
PRF133	6,5

Ejemplo 7: Datos de estabilidad

La estabilidad térmica se sometió a ensayo mediante un ensayo cinético térmico fotométrico. Se calentaron las disoluciones de proteína de 0,1 mg/ml en tampón deseado en cubetas de cuarzo 1°C por minuto desde 20°C hasta 95°C y se siguió la agregación midiendo la dispersión de luz a 360 nm. La temperatura a la que comienza la agregación se determinó como cambio térmico. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Estabilidad térmica

Proteína	Cambio térmico
PRF115	61°C
PRF119	54°C
PRF102	34°C*
PRF133	55°C*

La estabilidad a largo plazo se determinó incubando altas concentraciones de proteína a -20°C, 4°C, 25°C y 37°C. Se tomaron las muestras o bien semanalmente, diariamente o bien después de horas y se centrifugaron. Se determinó la concentración de proteína residual y la actividad lítica siguiendo el descenso de densidad óptica en un ensayo fotométrico. Se siguió la estabilidad hasta 1 año. Se analizaron también las muestras por SDS-PAGE para observar la estabilidad proteolítica. Los resultados tras el almacenamiento durante 38 días se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Estabilidad a largo plazo

Proteína	Actividad residual tras 38 días a 37°C
PRF119	5%
PRF133	85%

Ejemplo 8: Selectividad de *S. aureus* frente a *S. epidermidis* frente a *S. haemolyticus*

La selectividad se midió determinando el valor de MIC para las diferentes cepas de *Staphylococcus* (véase el ejemplo 4). Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Selectividad (Valores de MIC en µg/ml)

Proteína	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermis</i>	<i>S. haemolyticus</i>
PRF115	0,059	0,18	67
PRF119	0,39	3,125	n.d.
PRF102	9,95	12,5	12,5

Ejemplo 9: Experimento *in vivo* (aplicación tópica)

Se tomaron muestras de flora de piel no tratada usando placas de contacto de Manitol Agar salado específico para *Staphylococcus* y de Agar-LB del antebrazo. Se trataron áreas de piel de 2 x 2 cm con 10 - 20 µg de proteína dispersando 100 - 200 µl de un hidrogel que contenía 0,1 mg/ml de proteína (PRF-102). Tras 2 minutos, se tomaron de nuevo muestras usando placas de contacto de MSA y LB. Además, se trataron áreas de piel con un desinfectante común (Sterilium, Fa. Bode) y se tomaron muestras tras 1 minuto. Se incubaron las placas a 37°C durante toda la noche. Se identificaron colonias residuales encontradas en MSA Agar tras el tratamiento con gel de proteína como *Staphylococcus epidermidis*. Los resultados se muestran en la figura 1. La aplicación tópica de un polipéptido quimérico de la presente invención da como resultado la descolonización con éxito de la flora de la piel, tal como se muestra por las placas de LB y MSA-Agar que reflejan las muestras tomadas de la piel humana tratada con hidrogel que contiene 10 - 20 µg de proteína.

Ejemplo 10: Formulación

Hidroxietilcelulosa (HEC) al 2,5%, que contiene una sustancia tampón, por ejemplo fosfato sódico 25 - 50 mM o Tris/HCl pH 5,5 o 7,5, e ingredientes estabilizantes, por ejemplo CaCl₂ 25 mM, Citrato 25 mM y L-arginina 300 mM. Se hinchó HEC en tampón estéril a baja temperatura hasta que se formó un gel homogéneo. Entonces se dispersó la proteína en el gel fácilmente hinchado. La eficacia se mostró por ejemplo tratando *Staphylococcus aureus* en placas de Agar. Se sembraron 10⁵ células en placas de LB y poco después de que se secara la placa, se dispersaron 100 µl de un hidrogel que contenía 0,1 mg/ml de proteína en la mitad de la placa. Entonces se incubó la placa a 37°C durante toda la noche. Los resultados se muestran en la figura 2. La aplicación de un polipéptido quimérico de la presente invención da como resultado la descolonización con éxito de *Staphylococcus aureus*, tal como se muestra en la mitad superior de la placa de Agar de la figura 2B tratada con gel que contenía 10 µg de PRF102.

Aunque se han dado a conocer realizaciones específicas en el presente documento en algún detalle, esto se ha hecho solamente con el fin de describir varias características y aspectos de realizaciones, y no pretende ser limitante con respecto al alcance de estas realizaciones. Se contempla que puedan realizarse varias sustituciones, alteraciones y/o modificaciones, que incluyen pero no se limitan a aquellas variaciones de implementación que pueden haberse sugerido en el presente documento, a las realizaciones dadas a conocer sin apartarse del espíritu y alcance de las realizaciones tal como se definen en las siguientes reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 11: Clonación de PRF133 / Secuencia = CHAP_{lysK}-ligador sintético-CBD_{lisostafina}

Se clonó PRF133 mediante "PCR de corte y empalme por extensión de solapamiento" (SOE-PCR). En dos reacciones PCR separadas, se amplificaron CHAP_{lysK} y CBD_{lisostafina}, generando una zona de solapamiento en ambos fragmentos. Se amplificó usando CHAP_{lysK} pET14b_LysK como una plantilla con 5'-oligonucleótido-promotor de T7 y un 3'-oligonucleótido que se hibrida al extremo terminal 3' del CHAP que contenía 33 bases de una secuencia de ligador sintético. Se amplificó CBD_{lisostafina} usando pET14b_Lisostafina como una plantilla con un 5'-oligonucleótido que se hibrida 67 bases aguas abajo del extremo terminal 5' de CBD_{lisostafina} y que contiene 33 bases de una secuencia de ligador sintético y 3'-oligonucleótido-terminador de T7. En una segunda reacción PCR, se usaron los fragmentos solapantes de las primeras PCR como plantilla y se amplificó la PRF133 de longitud completa usando oligonucleótidos-promotor de T7 y terminador de T7. Se digirió el producto de PCR resultante con NcoI y BamHI, se ligó en pET14b y pQE60 respectivamente. Se confirmó la secuencia mediante la secuenciación completa del gen PRF133.

ATGGCGAAAACCCAGGCGGAAATTAACAAACGTCTGGATGCGTATGCGAAAGGCACCGTGGATAG
 CCCGTATCGTGTGAAAAAAGCGACCAGCTATGATCCGAGCTTTGGCGTGATGGAAGCGGGTGCGA
 TTGATGCGGATGGCTATTATCACGCGCAGTGCCAGGATCTGATTACCGATTATGTGCTGTGGCTG
 ACCGATAACAAAGTGCGTACCTGGGGCAACGCGAAAGATCAGATCAAACAGAGCTATGGCACCGG
 CTTTAAAATCCATGAAAACAAACCGAGCACCGTGCCGAAAAAAGGCTGGATTGCGGTGTTTACCA
 GCGGCAGCTATGAACAGTGGGGCCATATTGGCATTGTGTATGATGGCGGCAACACCAGCACCTTT
 ACCATTCTGGAACAGAACTGGAACGGCTATGCGAACAAAAAACCAGCAAACGCGTGGATAACTA
 TTATGGCCTGACCCATTTTATTGAAATTCGGTGGGCGGTAGCAAACCTGGAGGCACGAAGCCGG
GTGGAAGCAAACCAGGATCGACCGTGACTCCGACCCCGAACACGGGCTGGAAAACCAACAAGTAC
GGTACTCTTTACAAAAGCGAGAGCGCATCTTTTACGCCAAACACGGACATCATCACGCGCACCAC
CGGCCCATTTCGCAGCATGCCACAGAGCGGCGTCTTGAAAGCGGGCCAGACCATTCACTACGATG
AAGTTATGAAACAGGACGGCCATGTGTGGGTGGGCTATACCGGCAACAGCGGCCAGCGTATTTAT
TTACCGGTTTCGCACCTGGAATAAAAGCACCAATACCTTAGGCGTGTTATGGGGTACCATTAAGTA
 A

MAKTQAEINKRLDAYAKGTVDSPYRVKKATSYDPSFGVMEAGAIADAGYYHAQCQDLITD
 YVLWLTDNKVRTWGNADQIKQSYGTGFKIHENKPSTVPPKGGWIAVFTSGSYEQWGHIGI
 VYDGGNTSTFTILEQNWNGYANKKPTKRVDNYYGLTHFIEIPVGGSKPGGTPGGSKPGS
TVTPPTNTGWKTNKYGTLYKSESASFPTNTDIITRTTGPPFRSMPQSGVLKAGQTIHYDEV
MKQDGHVWVGYTGNQSGQRIYLPVRTWKNSTNTLGVWGTIK

Ejemplo 12: Actividad dependiente de pH de PRF119

Se hizo crecer un cultivo de *Staphylococcus aureus* con una densidad óptica de 0,1 en medio BHI a 37°C hasta una densidad óptica de 1. Se recogieron las células (4.500 rpm, 4°C, 10 minutos) y se resuspendieron en acetato 10 mM, Tris 10 mM, borato 10 mM, NaCl 60 mM, CaCl₂ 2 mM, oscilando el pH de 5 - 9. Tras añadir 5 µg/ml de proteína, se siguió el descenso de densidad óptica por minuto a 30°C. La figura 3 muestra los resultados.

Referencias

1. Borysowski J. *et al.*, 2006, Exp. Biol. Med. 231: 366-377.
2. Solicitud de patente de Reino Unido GB 2 255 561 A (11 de noviembre de 1992).
3. Nelson D. *et al.*, 2001, PNAS 98(7):4107-4112.
4. Rashel M. *et al.*, 2007, J. Infect. Dis. 196(8):1237-1247.
5. Patente estadounidense n.º 5.997.862 (7 de diciembre de 1999).
6. Takác M. y U. Bläsi, 2005, Antimicrob. Agents Chemother. 49(7):2934-2940.
7. Navarre W. *et al.*, 1999, J. Biol. Chem. 274(22):15847-15856.
8. Sass P. y G. Bierbaum, 2007, Appl. Environ. Microbiol. 73(1):347-352.
9. O'Flaherty S. *et al.*, 2005, J. Bacteriol. 187(20):7161-7164.
10. Documento WO 2008/001342 (3 de enero de 2008)
11. Becker S. *et al.*, 2008, FEMS Microbiol. Lett. 287(2):185-191.
12. Horgan M. *et al.*, 2009, Appl. Environ. Microbiol. 75(3):872-874.
13. Kumar Jaspal K., 2008, Appl. Microbiol. Biotechnol. 80:555-561.
14. Kokai-Kun J.F. *et al.*, 2007, J. Antimicrob. Chemother. 60(5):1051-1059.
15. Kusuma C. *et al.*, 2007, Antimicrob. Agents Chemother. 51(2):475-482.
16. DeHart H.P. *et al.*, 1995, Appl. Environ. Microbiol. 61(4):1475-1479.
17. Ehler K. *et al.*, 1997, J. Bacteriol. 197(23):7573-7576.
18. Strandén A.M. *et al.*, 1997, J. Bacteriol. 197(1):9-16.
19. Diaz E. *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 87:8125-8129.
20. Croux C. *et al.*, 1993, Mol. Microbiol. 9(5):1019-1025.
21. Donovan D.M. *et al.*, 2006, Appl. Environ. Microbiol. 72(4):2988-2996.
22. Documento WO 2007/130655 A2 (15 de noviembre de 2007)

Lista de secuencias

SEQ ID NO: 1: secuencia de aminoácidos del dominio CHAP de lysK (163 residuos de aminoácidos; secuencia traducida de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5; origen: bacteriófago phiK)

MAKTQAEINKRLDAYAKGTVDSPYRVKKATSYDPSFGVMEAGAIADAGYYHAQCQDLITDYVLWL
 TDNKVRTWGNADQIKQSYGTGFKIHENKPSTVPPKGGWIAVFTSGSYEQWGHIGIVYDGGNTSTF
 TILEQNWNGYANKKPTKRVDNYYGLTHFIEIPV

SEQ ID NO: 2: secuencia de aminoácidos del dominio lítico de lisostafina (124 residuos de aminoácidos; secuencia traducida de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6; origen: *Staphylococcus simulans*)

MAATHEHSAQWLNNYKKGYGYPYPLGINGGMHYGVDFFMNIGTPVKAISSGKIVEAGWSNYGGG
NQIGLIENDGVHRQWYMHLSKYNVKGVDYVKAGQIIIGWSGSTGYSTAPHLHFQRMVNSF

SEQ ID NO: 3: secuencia de aminoácidos del dominio CHAP de IytN (143 residuos de aminoácidos; secuencia traducida de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7; origen: *Staphylococcus aureus*)

MASTLNYLKTLENRGWDFDGSYGWQCFDLNVVYWNHLYGHGLKGYGAKDI PYANNFNSEAKIYHN
TPTFKAEPGDLVVFSGRFGGGYGHTAIVLNGDYDGKLMKFQSLDQNWNNGGWRKA EVAHKVVHNY
ENDMIFIRPFKKA

- 5 **SEQ ID NO: 4:** secuencia de aminoácidos del CBD de lisostafina (123 residuos de aminoácidos; secuencia traducida de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8; origen: *Staphylococcus simulans*)

SNSTAQDPMFPFLKSAGYGKAGTPTPTNTGWKTNKYGTLYKSESASFPTNTDIIITRTTGPFRSM
PQSGVLKAGQTIHYDEVKQDGHVWVGTYTGNNSGQRIYLPVRTWNKSTNTLGLVLWGTTIK

SEQ ID NO: 5: secuencia de nucleótidos del dominio CHAP de IysK (489 nucleótidos; origen: bacteriófago phiK)

ATGGCGAAAACCCAGGCGGAAATTAACAAACGTCTGGATGCGTATGCGAAAGGCACCGTGGATAG
CCCGTATCGTGTGAAAAAGCGACCAGCTATGATCCGAGCTTTGGCGTGATGGAAGCGGGTGCGA
TTGATGCGGATGGCTATTATCACGCGCAGTGCCAGGATCTGATTACCGATTATGTGCTGTGGCTG
ACCGATAACAAAGTGCCTACCTGGGGCAACGCGAAAGATCAGATCAAACAGAGCTATGGCACCGG
CTTTAAAATCCATGAAAACAAACCGAGCACCGTGCCGAAAAAAGGCTGGATTGCGGTGTTTACCA
GCGGCAGCTATGAACAGTGGGGCCATATTGGCATTGTGTATGATGGCGGCAACACCAGCACCTTT
ACCATTCTGGAACAGAACTGGAACGGCTATGCGAACAAAAACCGACCAACGCGTGATAACTA
TTATGGCCTGACCCATTTTATTGAAATTCGGTG

- 10 **SEQ ID NO: 6:** secuencia de nucleótidos del dominio lítico de lisostafina (372 nucleótidos; origen: *Staphylococcus simulans*)

ATGGCGGCGACGCACGAGCATAGCGCCAGTGGCTGAATAATTACAAAAAGGGTTACGGTTATGG
CCCGTACCCGCTGGGCATCAATGGCGGCATGCACTATGGCGTAGACTTCTTTATGAACATTGGCA
CGCCGGTTAAAGCGATCAGTTCCGGTAAATTTGTGGAAGCGGGCTGGAGTAACTACGGTGGTGGT
AACCAGATCGGCTTGATTGAAAATGATGGCGTGACCGTCACTGGTACATGCATCTGTGCAATA
TAACGTAAAGGTGGGCGACTATGTGAAAGCGGGTCAAATTATTGGTTGGTCCGGTAGCACCGGTT
ATAGTACGGCGCCGCACCTGCATTTCCAGCGTATGGTGAATAGCTTT

SEQ ID NO: 7: secuencia de nucleótidos del dominio CHAP de IytN (429 nucleótidos; origen: *Staphylococcus aureus*)

ATGGCGAGTACATTAAATTTATTTGAAAACATTAGAGAATAGAGGATGGGATTTTCGACGGTAGTTA
TGGATGGCAATGTTTCGATTTAGTTAATGTATATTGGAATCATCTTTATGGTCATGGATTAAAG
GATATGGAGCTAAAGATATACCATATGCAAATAATTTAATAGTGAAGCTAAAATTTATCACAAC
ACACCAACTTTCAAAGCTGAACCTGGGGACTTAGTGGTTTTTAGTGGAAGATTTGGTGGAGGATA
TGGTCATACAGCTATTGTCTTAAATGGTGATTATGATGGAAAATTAATGAAGTTCCAAAGTTTAG
ATCAAAACTGGAATAATGGTGGATGGCGTAAAGCAGAGGTTGCACATAAAGTTGTTTATAATTAT
GAAAATGATATGATTTTTATTAGACCATTTAAAAAAGCA

15

SEQ ID NO: 8: secuencia de nucleótidos del CBD de lisostafina (369 nucleótidos; origen: *Staphylococcus simulans*)

TCTAATAGCACCGCGCAGGACCCGATGCCGTTCTTGAAGTCGGCGGGCTATGGCAAAGCAGGCGG
CACCGTGACTCCGACCCGAACACGGGCTGGAAAACCAACAAGTACGGTACTCTTTACAAAAGCG
AGAGCGCATCTTTTACGCCAAACACGGACATCATCACGCGCACCACCGGCCCATTTTCGCAGCATG
CCACAGAGCGGCGTCTTGAAAGCGGGCCAGACCATTCACACTACGATGAAGTTATGAAACAGGACGG
CCATGTGTGGGTGGGCTATACCGGCAACAGCGGCCAGCGTATTTATTTACCGGTTTCGCACCTGGA
ATAAAAGCACCAATACCTTAGGCGTGTTATGGGGTACCATTAAAG

SEQ ID NO: 9: secuencia de aminoácidos del clon PRF115 (447 residuos de aminoácidos; secuencia traducida de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 12; origen: bacteriófago phiK y *Staphylococcus simulans*)

MAKTQAEINKRLDAYAKGTVDSPYRVKKATSYDPSFGVMEAGAIADAGYYHAQCQDLITDYVLWL
TDNKVRTWGNADQIKQSYGTGFKIHENKPSTVPKKGWIAVFTSGSYEQWGHIGIVYDGGNTSTF
TILEQNWNGYANKKPTKRVDNYYGLTHFIEIPVKAGTTVKKETAKKSASKTPAPKKKATLKVSKN
HINYTMAATHEHSAQWLNYYKKGYPYPLGINGGMHYGVDFMNIPTVKAISSGKIVEAGWS
NYGGGNQIGLIENDGVHRQWYMHLSKYNVKGVDYVKAGQIIGWSGSTGYSTAPHLHFQRMVNSFS
NSTAQDPMFPLKSAGYKAGGTVTPTPNTGWKTNKYGTLYKSESASFPTNTDIITRTTGPFRRSMP
QSGVLKAGQTIHYDEVMKQDGHVWVGTYTGN SGQRIYLPVRTWNKSTNTLGVLWGTTIK

SEQ ID NO: 10: secuencia de aminoácidos del clon PRF119 (287 residuos de aminoácidos; secuencia traducida de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 13; origen: bacteriófago phiK y *Staphylococcus simulans*)

MAKTQAEINKRLDAYAKGTVDSPYRVKKATSYDPSFGVMEAGAIADAGYYHAQCQDLITDYVLWL
TDNKVRTWGNADQIKQSYGTGFKIHENKPSTVPKKGWIAVFTSGSYEQWGHIGIVYDGGNTSTF
TILEQNWNGYANKKPTKRVDNYYGLTHFIEIPVMSNSTAQDPMFPLKSAGYKAGGTVTPTPNTG
WKTNKYGTLYKSESASFPTNTDIITRTTGPFRRSMPQSGVLKAGQTIHYDEVMKQDGHVWVGTYTGN
SGQRIYLPVRTWNKSTNTLGVLWGTTIK

- 5 **SEQ ID NO: 11:** secuencia de aminoácidos del clon PRF102 (267 residuos de aminoácidos; secuencia traducida de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14; origen: *Staphylococcus simulans* y *Staphylococcus aureus*)

MASTLNYLKTLENRGWDFDGSYGWQCFDLVNVYWNHLYGHGLKGYGAKDIPYANNFNSEAKIYHN
TPTFKAEPGLVVFSGRFGGGYGHTAIVLNGDYDGKLMKFQSLDQNWNNGGWRKA EVAHKVVHNY
ENDMIFIRPFKKAMSNSTAQDPMFPLKSAGYKAGGTVTPTPNTGWKTNKYGTLYKSESASFPTN
TDIITRTTGPFRRSMPQSGVLKAGQTIHYDEVMKQDGHVWVGTYTGN SGQRIYLPVRTWNKSTNTLG
VLWGTTIK

SEQ ID NO: 12: secuencia de nucleótidos del clon PRF115 (1.341 nucleótidos; origen: bacteriófago phiK y *Staphylococcus simulans*)

ATGGCGAAAACCCAGGCGGAAATTAACAAACGTCTGGATGCGTATGCGAAAGGCACCGTGGATAG
CCCGTATCGTGTGAAAAAAGCGACCAGCTATGATCCGAGCTTTGGCGTGATGGAAGCGGGTGCGA
TTGATGCGGATGGCTATTATCACGCGCAGTGCCAGGATCTGATTACCGATTATGTGCTGTGGCTG
ACCGATAACAAAGTGCCTACCTGGGGCAACGCGAAAGATCAGATCAAACAGAGCTATGGCACCGG
CTTTAAAATCCATGAAAACAAACCGAGCACCGTGCCGAAAAAAGGCTGGATTGCGGTGTTTACCA
GCGGCAGCTATGAACAGTGGGGCCATATTGGCATTGTGTATGATGGCGGCAACACCAGCACCTTT
ACCATTCTGGAACAGAAGTGAACCGCTATGCGAACAACAAACCGACCAACCGCGTGATAACTA
TTATGGCCTGACCCATTTTATTGAAATTCGGTGAAAGCGGGCACCGGTGAAAAAAGAAACCG
CGAAAAAAGCGCGAGCAAAACCCCGCGCCGAAAAAAGCCACCTGAAAGTGAGCAAAAAC
CACATCAACTATACGATGGCGGCGACGCACGAGCATAGCGCCAGTGCGTGAATAATTACAAAA
GGGTACGGTTATGGCCCGTACCCGCTGGGCATCAATGGCGGCATGCACTATGGCGTAGACTTCT
TTATGAACATTGGCACGCCGGTTAAAGCGATCAGTTCCGGTAAAATTGTGGAAGCGGGCTGGAGT
AACTACGGTGGTGGTAACCAGATCGGCTTGATTGAAAATGATGGCGTGACCGTCAGTGGTACAT
GCATCTGTGCGAAATATAACGTAAAGGTGGGCGACTATGTGAAAGCGGGTCAAATTATTGGTTGGT
CCGGTAGCACCGGTTATAGTACGGCGCCGCACCTGCATTTCCAGCGTATGGTGAATAGCTTTTCT
AATAGTACCGCACAAAGACCCGATGCCGTTTCTGAAATCCGCGGGTTATGGCAAAGCGGGCGGCAC
CGTGAATCCGACCCCGAACACGGGCTGGAAAACCAACAAGTACGGTACTCTTTACAAAAGCGAGA
GCGCATCTTTTACGCCAAACACGGACATCATCACGCGCACCACCGGCCCATTTTCGAGCATGCCA
CAGAGCGGCGTCTTGAAAGCGGGCCAGACCATTCATACGATGAAGTTATGAAACAGGACGGCCA
TGTGTGGGTGGGCTATACCGGCAACAGCGGCCAGCGTATTTATTTACCGGTTTCGCACCTGGAATA
AAAGCACCAATACCTTAGGCGTGTTATGGGGTACCATTAAAG

- 10 **SEQ ID NO: 13:** secuencia de nucleótidos del clon PRF119 (864 nucleótidos; origen: bacteriófago phiK y *Staphylococcus simulans*)

ATGGCGAAAACCCAGGCGGAAATTAACAAACGTCTGGATGCGTATGCGAAAGGCACCGTGGATAG
 CCCGTATCGTGTGAAAAAAGCGACCAGCTATGATCCGAGCTTTGGCGTGATGGAAGCGGGTGCGA
 TTGATGCGGATGGCTATTATCACGCGCAGTGCCAGGATCTGATTACCGATTATGTGCTGTGGCTG
 ACCGATAACAAAGTGCGTACCTGGGGCAACGCGAAAGATCAGATCAAACAGAGCTATGGCACCGG
 CTTTAAAATCCATGAAAACAAACCGAGCACCGTGCCGAAAAAAGGCTGGATTGCGGTGTTTACCA
 GCGGCAGCTATGAACAGTGGGGCCATATTGGCATTGTGTATGATGGCGGCAACACCAGCACCTTT
 ACCATTCTGGAACAGAACTGGAACGGCTATGCGAACAAAAAACCGACCAACGCGTGGATAACTA
 TTATGGCCTGACCCATTTTATTGAAATTCGGGTGATGTCTAATAGCACCGCGCAGGACCCGATGC
 CGTTCTTGAAGTCGGCGGGCTATGGCAAAGCAGGCGGCACCGTGACTCCGACCCCGAACACGGGC
 TGGAAAACCAACAAGTACGGTACTCTTTACAAAAGCGAGAGCGCATCTTTTACGCCAAACACGGA
 CATCATCACGCGCACCAACCGGCCCATTTTCGCAGCATGCCACAGAGCGGCGTCTTGAAAGCGGGCC
 AGACCATTCACTACGATGAAGTTATGAAACAGGACGGCCATGTGTGGGTGGGCTATACCGGCAAC
 AGCGGCCAGCGTATTTATTTACCGGTTTCGCACCTGGAATAAAAGCACCAATACCTTAGGCGTGTT
 ATGGGGTACCATTAAGTAA

SEQ ID NO: 14: secuencia de nucleótidos del clon PRF102 (804 nucleótidos; origen: *Staphylococcus simulans* y *Staphylococcus aureus*)

ATGGCGAGTACATTAAATTATTTGAAAACATTAGAGAATAGAGGATGGGATTTTCGACGGTAGTTA
 TGGATGGCAATGTTTCGATTTAGTTAATGTATATTGGAATCATCTTTATGGTCATGGATTAAAG
 GATATGGAGCTAAAGATATACCATATGCAAATAATTTTAATAGTGAAGCTAAAATTTATCACAAAC
 ACACCAACTTTCAAAGCTGAACCTGGGGACTTAGTGGTTTTTAGTGAAGATTTGGTGGAGGATA
 TGGTCATACAGCTATTGTCTTAAATGGTGATTATGATGGAAAATTAATGAAGTTCCAAAGTTTAG
 ATCAAACCTGGAATAATGGTGGATGGCGTAAAGCAGAGGTTGCACATAAAGTTGTTTCATAATTAT
 GAAAATGATATGATTTTTATTAGACCATTTAAAAAAGCAATGTCTAATAGCACCGCGCAGGACCC
 GATGCCGTTCTTGAAGTCGGCGGGCTATGGCAAAGCAGGCGGCACCGTGACTCCGACCCCGAAC
 CGGGCTGGAACCAACAAGTACGGTACTCTTTACAAAAGCGAGAGCGCATCTTTTACGCCAAAC
 ACGGACATCATCACGCGCACCAACCGGCCCATTTTCGCAGCATGCCACAGAGCGGCGTCTTGAAAGC
 GGGCCAGACCATTCACTACGATGAAGTTATGAAACAGGACGGCCATGTGTGGGTGGGCTATACCG
 GCAACAGCGGCCAGCGTATTTATTTACCGGTTTCGCACCTGGAATAAAAGCACCAATACCTTAGGC
 GTGTTATGGGGTACCATTAAGTAA

5

SEQ ID NO: 15: secuencia de aminoácidos del clon PRF133 (281 residuos de aminoácidos; secuencia traducida de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16; origen: bacteriófago phiK y *Staphylococcus simulans*)

MAKTQAEINKRLDAYAKGTVDSPYRVKKATSYPDFSGVMEAGAIADGYYHAQCQDLITD
 YVLWLTDNKVRTWGNKDKQIKQSYGTGFKIHENKPSTVPKKGWIAVFTSGSYEQWGHIGI
 VYDGGNTSTFTILEQNWNGYANKKPTKRVDNYYGLTHFIEIPVGGSKPGGTPGGSKPGS
 TVTPTPNTGWKTNKYGTLYKSESASFPTNTDIITRTTGPFRRSMPQSGVLKAGQTIHYDEV
 MKQDGHVWVGTYTGNNSGQRIYLPVRTWNKSTNTLGVLWGTTIK

SEQ ID NO: 16: secuencia de nucleótidos del clon PRF133 (846 nucleótidos; origen: bacteriófago phiK y *Staphylococcus simulans*)

10

ATGGCGAAAACCCAGGCGGAAATTAACAAACGTCTGGATGCGTATGCGAAAGGCACCGTGGATAG
 CCCGTATCGTGTGAAAAAAGCGACCAGCTATGATCCGAGCTTTGGCGTGATGGAAGCGGGTGCGA
 TTGATGCGGATGGCTATTATCACGCGCAGTGCCAGGATCTGATTACCGATTATGTGCTGTGGCTG
 ACCGATAACAAAGTGCGTACCTGGGGCAACGCGAAAGATCAGATCAAACAGAGCTATGGCACCGG
 CTTTAAAATCCATGAAAACAAACCGAGCACCGTGCCGAAAAAAGGCTGGATTGCGGTGTTTACCA
 GCGGCAGCTATGAACAGTGGGGCCATATTGGCATTGTGTATGATGGCGGCAACACCAGCACCTTT
 ACCATTCTGGAACAGAACTGGAACGGCTATGCGAACAAAAAACCGACCAAACGCGTGGATAACTA
 TTATGGCCTGACCCATTTTATTGAAATTCCGGTGGGCGGTAGCAAACCTGGAGGCACGAAGCCGG
 GTGGAAGCAAACCAGGATCGACCGTGACTCCGACCCCGAACACGGGCTGGAAAACCAACAAGTAC
 GGTACTCTTTTACAAAAGCGAGAGCGCATCTTTTACGCCAAACACGGACATCATCACGCGCACCAC
 CGGCCCATTTCGCAGCATGCCACAGAGCGGCGTCTTGAAAGCGGGCCAGACCATTCACTACGATG
 AAGTTATGAAACAGGACGGCCATGTGTGGGTGGGCTATACCGGCAACAGCGGCCAGCGTATTTAT
 TTACCGGTTTCGCACCTGGAATAAAAGCACCAATACCTTAGGCGTGTTATGGGGTACCATTAAGTA
 A

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido quimérico que comprende una primera parte y una segunda parte unidas por un ligador, en el que
- 5 (a) dicha primera parte comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio de unión a células (CBD) de bacteriocina; y
- (b) dicha segunda parte comprende una secuencia de aminoácidos de al menos un dominio activo enzimático (EAD) seleccionado del dominio lítico de una endolisina de bacteriófagos, en el que el dominio lítico tiene al menos el 80%, preferiblemente el 90%, de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de SEQ ID NO: 1;
- 10 en el que el polipéptido quimérico tiene al menos el 80%, preferiblemente el 90%, de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de SEQ ID NO: 10, o SEQ ID 15, y tiene actividad lítica de pared celular bacteriana.
2. El polipéptido quimérico según la reivindicación 1, en el que el CBD tiene al menos el 80%, preferiblemente el 90%, de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de SEQ ID NO: 4.
- 15 3. El polipéptido quimérico según la reivindicación 1 o 2, en el que la endolisina de bacteriófagos es lysK.
4. El polipéptido quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el CBD es un CBD de lisostafina.
5. Una composición que comprende el polipéptido quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 6. Una formulación, preferiblemente una formulación tópica, que comprende el polipéptido quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
7. El polipéptido quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, la composición según la reivindicación 5, o la formulación según la reivindicación 6, para su uso en profilaxis o terapia.
8. El polipéptido quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o la composición según la reivindicación 6, para su uso en tratar o prevenir una enfermedad bacteriana, una infección bacteriana o colonización bacteriana.
- 25 9. El polipéptido quimérico o composición para su uso según la reivindicación 8, en el que la actividad lítica
- (a) disminuye la aparición o gravedad de una enfermedad bacteriana o infección bacteriana local o sistémica, o
- 30 (b) previene o elimina colonización bacteriana.
10. El polipéptido quimérico, composición o uso según la reivindicación 9, en el que la enfermedad bacteriana, infección bacteriana o colonización bacteriana están provocadas por bacterias Gram positivas.
11. El polipéptido quimérico, composición o uso según la reivindicación 10, en el que las bacterias Gram positivas son *Staphylococcus*, preferiblemente *Staphylococcus aureus*, y más preferiblemente *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA).
- 35 12. El polipéptido quimérico o composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que la enfermedad bacteriana, infección bacteriana o colonización bacteriana es una enfermedad bacteriana, una infección bacteriana o colonización bacteriana de la piel o una membrana mucosa, preferiblemente la membrana mucosa del tracto respiratorio superior, más preferiblemente la membrana mucosa de la cavidad nasal.
- 40

Figura 1

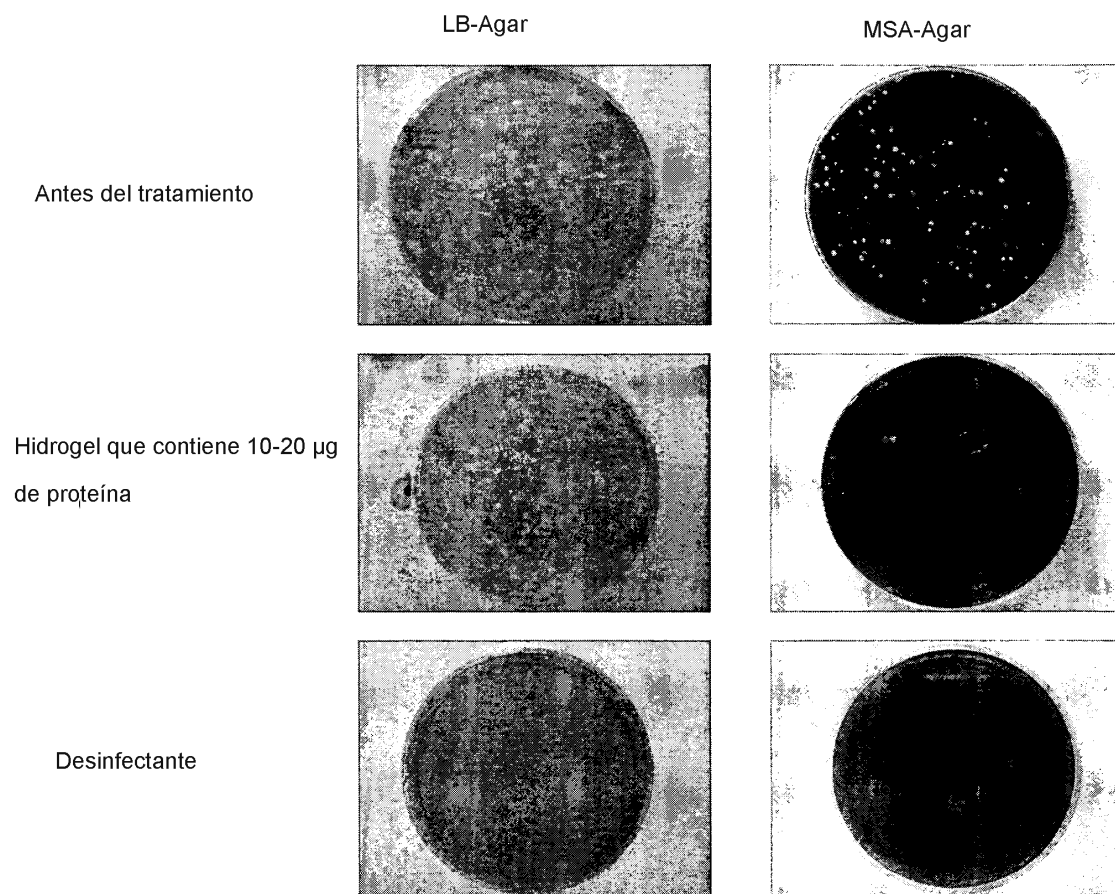


Figura 2



Figura 2A

Control: La mitad superior de la placa se trató con gel que no contenía proteína



Figura 2B

La mitad superior se trató con gel que contenía 10 µg de PRF102

Figura 3

