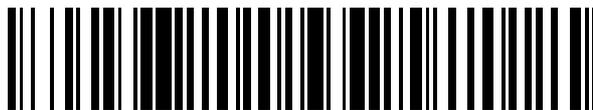


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 954**

21 Número de solicitud: 201330777

51 Int. Cl.:

**C12N 9/24** (2006.01)

**A61K 38/47** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

**28.05.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**02.01.2015**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (90.0%)  
SERRANO, 117  
28006 MADRID ES y  
CIBER ENFERMEDADES RESPIRATORIAS  
(CIBERES) (10.0%)**

72 Inventor/es:

**GARCÍA GONZÁLEZ, Pedro;  
MENÉNDEZ FERNÁNDEZ, Margarita;  
GARCÍA LÓPEZ, Ernesto;  
DÍEZ MARTÍNEZ, Roberto;  
DE PAZ FERNÁNDEZ, Héctor y  
BUSTAMANTE SPUCH, Noemi**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

54 Título: **ENZIBIÓTICOS BACTERICIDAS MEJORADOS FRENTE A NEUMOCOCO Y OTRAS  
BACTERIAS**

57 Resumen:

Enzibióticos bactericidas mejorados frente a neumococo y otras bacterias.

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología. En la presente invención se presenta una secuencia polipeptídica derivada del módulo de unión a pared del enzima lítica del fago Cp7 (Cpl-7), que permite la construcción de nuevas enzimas líticas con actividad bactericida mejorada y amplio espectro. Igualmente, en esta invención se incluyen enzimas quiméricas que contienen dicho módulo de unión a pared mejorado y se dan ejemplos de su actividad frente a especies Gram-positivas y Gram-negativas.

ES 2 525 954 A2

## DESCRIPCIÓN

### ENZIBIÓTICOS BACTERICIDAS MEJORADOS FRENTE A NEUMOCOCO Y OTRAS BACTERIAS

#### SECTOR Y OBJETO DE LA INVENCION

5 La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología. Más concretamente, la presente invención se refiere a un polipéptido que se une a la pared celular de diversos microorganismos (módulo de unión a pared) derivado de la enzima lítica del fago Cp-7 de *Streptococcus pneumoniae*. A este módulo de unión a pared se le pueden acoplar, mediante técnicas de biología molecular, diversos módulos catalíticos que degradan  
10 la pared bacteriana (mureín-hidrolasas) lo que genera enzimas líticas con un efecto bactericida tanto en neumococo como en otras bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

#### ESTADO DE LA TECNICA

*Streptococcus pneumoniae*, o neumococo, es un patógeno Gram-positivo y el principal agente causal de enfermedades infecciosas tan importantes como neumonía, sepsis y  
15 meningitis. Los grupos de población más afectados son los niños menores de cinco años, los ancianos y los pacientes inmunodeprimidos. De hecho, según estimaciones recientes de la Organización Mundial de la Salud neumococo es la causa más común de las neumonías severas en niños de esas edades, tanto en países desarrollados como en los que están en vías de desarrollo (UNICEF, WHO, 2006. Pneumonia: the forgotten killer of  
20 children.[http://www.unicef.org/spanish/publications/files/Pneumonia\\_The\\_Forgotten\\_Killer\\_of\\_Children.pdf](http://www.unicef.org/spanish/publications/files/Pneumonia_The_Forgotten_Killer_of_Children.pdf)). En general, la tasa de mortalidad de las infecciones neumocócicas en la población pediátrica es mayor que la provocada por el SIDA, la malaria y el sarampión juntos (Wardlaw et al. 2006. Lancet 368: 1048-1050; Rudan y Campbell. 2009. Lancet 374: 854-856).

25 En los últimos años se ha producido un generalizado incremento de cepas clínicas de neumococo resistentes a una variedad de antibióticos, sobre todo a los  $\beta$ -lactámicos, lo que está provocando la búsqueda urgente de otros tratamientos o terapias alternativas para combatir este patógeno. En este contexto, el uso de mureín-hidrolasas líticas (enzimas que degradan de forma específica y eficaz el peptidoglicano bacteriano) codificadas por  
30 bacterias o bacteriófagos constituye una prometedora línea de investigación para luchar

contra las infecciones bacterianas. Ya se ha demostrado que este tipo de enzimas (denominadas enzibióticos) son eficaces para matar "in vivo" determinadas bacterias en una variedad de modelos animales (Fenton et al. 2010. Bioeng. Bugs 1: 9-16; Fischetti, VA. 2011. Bacteriophage 1:1-7).

5 En el sistema de neumococo se han descrito varias mureín-hidrolasas, tanto bacterianas como fágicas (Hermoso et al. 2007. Curr. Opin. Microbiol. 10: 461-472). Todas ellas son enzimas modulares con un dominio responsable de la catálisis y otro de la unión al sustrato insoluble que es la pared celular. Todas estas enzimas con actividad mureín-hidrolasa son, con excepción de Cpl-7, dependientes de la presencia del aminoalcohol colina para su actividad enzimática. La lisozima Cpl-7, codificada por el fago Cp-7, es capaz de degradar 10 paredes de neumococo conteniendo tanto colina como su análogo estructural etanolamina. Cpl-7 contiene un dominio de unión a la pared celular (C-Cpl-7), formado por tres repeticiones idénticas (motivos CW\_7), completamente diferente al que comparten las otras enzimas colina-dependientes, lo que explica este comportamiento (García et al. 1990. Gene 15 86: 81-88). Hasta el momento se ha demostrado la efectividad como agentes antibacterianos de Pal (Loeffler et al. 2001. Science 294: 2170-2172), Cpl-1 (Jado et al. 2003. J. Antimicrob. Chemother. 52: 967-973) y LytA (Rodríguez-Cerrato et al. 2007. Antimicrob. Agents Chemother. 51: 3371-3373) usando diferentes modelos animales de infección neumocócica.

## 20 **EXPLICACION DE LA INVENCION**

El objeto principal de la presente invención es la construcción de nuevas mureín-hidrolasas capaces de degradar muy eficazmente la pared celular de neumococo y de otras especies bacterianas. Los inventores han modificado sustancialmente el módulo de unión a la pared bacteriana de la lisozima del fago Cp7 de *S. pneumoniae*, reduciendo su elevada carga neta 25 negativa, para disminuir las interacciones electrostáticas desfavorables que se establecen entre la envuelta celular (negativamente cargada) y la enzima cuando ésta actúa desde el exterior de la bacteria (Low et al. 2011. J. Biol. Chem. 286: 34391-34403). Las modificaciones introducidas en las tres repeticiones que constituyen el módulo de unión al sustrato (C-Cpl-7) provocan que tenga mayor facilidad de acceso e interacción con la pared 30 bacteriana (peptidoglicano) y, en consecuencia, su capacidad lítica y bactericida sea mayor que la de la Cpl-7 silvestre, no solo frente a *S. pneumoniae* sino también frente a otras bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. En el caso de neumococo, la gran capacidad bactericida de las nuevas construcciones que emplean este módulo de unión a pared

mejorado se extiende también a cepas multirresistentes a diversos antibióticos de amplia importancia clínica.

Asimismo, esta invención también aporta otras construcciones quiméricas que emplean el mismo módulo de unión a la pared celular, combinado con módulos catalíticos mejorados de Cpl-7 o Cpl-1, lo que demuestra la amplia versatilidad de enzibióticos que se pueden construir empleando las enzimas líticas ya conocidas.

### **EXPLICACIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente invención describe una secuencia polipeptídica derivada del módulo de unión a pared del enzima lítica del fago Cp7 (Cpl-7), que permite la construcción de nuevas enzimas líticas con actividad bactericida mejorada y amplio espectro mediante la modificación de, al menos, 15 aminoácidos clave en la secuencia original o parental de partida C-Cpl-7. Igualmente, se describe la secuencia de nucleótidos codificante de dicho módulo así como construcciones genéticas derivadas que incluyen módulos catalíticos procedentes de otros fagos, o de Cpl-7 mejorados, que permiten la construcción de nuevas enzimas líticas con actividad bactericida mejorada y amplio espectro.

El punto de partida fue el módulo de unión a pared del enzima lítica del fago Cp7 (Cpl-7) descrito en (García et al. 1990. Gene 86: 81-88). El procedimiento de mejora modificó la carga neta de las tres repeticiones que forman el dominio de unión a pared (C-Cpl-7) sin que los cambios de secuencia introducidos alteren el plegamiento de la proteína. La selección de las posiciones a modificar y el tipo de mutación introducida en cada posición se llevó a cabo teniendo en cuenta la conservación de secuencias dentro de la familia CW\_7 (PF08230) y los modelos a alta resolución previamente generados para N-Cpl-7 (dominio catalítico N-terminal) y C-Cpl-7 (Bustamante et al. 2010. J. Biol. Chem. 285:33184-33196).

Esta adaptación permite una sustancial mejora de la capacidad de unión del módulo peptídico de unión a pared, lo que combinado con su amplio espectro de bacterias a las que se une, lo convierte en una herramienta útil para el diseño de nuevos antibióticos con un espectro interespecies más amplio que los enzibióticos hasta ahora descritos (como ejemplos: US20120258088, WO2013052643, WO2010002959, WO2008018854, US2007025978, US2005208038) dado que cubre tanto bacterias Gram-positivas como Gram-Negativas lo que permite que sean usadas como antibióticos en combinación con

elementos que alteren la pared celular (enzibióticos), o incluso en aplicaciones biotecnológicas como la purificación y/o concentración de poblaciones bacterianas.

Un resumen de los polinucleótidos y péptidos descritos en la presente invención se resumen en la siguiente tabla:

	<b>Descripción</b>	<b>Secuencia polipeptídica</b>	<b>Secuencia nucleotídica</b>	
5	Cpl-7	Secuencia nativa	1	2
	N-Cpl-7	Secuencia nativa de dominio catalítico	3	4
	L-Cpl-7	Secuencia nativa de linker	5	6
10	C-Cpl-7	Secuencia nativa de dominio de unión a pared	7	8
	N-Cpl-7N	Secuencia mutada de dominio catalítico	9	10
	C-Cpl-7S	Secuencia mutada de dominio de unión a pared	11	12
15	N-Cpl-1	Secuencia nativa de dominio catalítico	13	14
	L-Cpl-1	Secuencia nativa de linker	15	16
	Cpl7-00S	Enzima quimérica	17	18
	Cpl7-N0S	Enzima quimérica	19	20
	Cpl7-00E	Enzima quimérica	21	22
20	Cpl1-07S	Enzima quimérica	23	24
	Cpl1-00S	Enzima quimérica	25	26

Un primer objeto de la invención se refiere al polipéptido, de ahora en adelante polipéptido de la invención, que codifica el módulo de unión a pared de la lisina Cpl-7 derivada del fago de *Streptococcus. pneumoniae* Cp-7, denominado C-Cpl-7, modificado para que aumente su carga neta lo que le confiere una mayor capacidad de unión a la pared celular bacteriana, y caracterizado porque su secuencia de aminoácidos presenta una identidad de al menos un 50% con respecto a la secuencia parental SEQ ID NO 7, y porque comprende alteraciones

en su secuencia de aminoácidos (como pueden ser, por ejemplo, sustituciones, deleciones y/o inserciones) en las siguientes posiciones:

- la posición homóloga a la posición 216 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (L) original por el aminoácido (K) (mutación L216K),
- 5 - la posición homóloga a la posición 225 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (D) original por el aminoácido (K) (mutación D225K),
- la posición homóloga a la posición 230 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (A) original por el aminoácido (R) (mutación A230R),
- la posición homóloga a la posición 233 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (D) original por el aminoácido (N) (mutación D233N),
- 10 - la posición homóloga a la posición 239 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (D) original por el aminoácido (N) (mutación D239N),
- la posición homóloga a la posición 264 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (L) original por el aminoácido (K) (mutación L264K),
- 15 - la posición homóloga a la posición 273 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (D) original por el aminoácido (K) (mutación D273K),
- la posición homóloga a la posición 278 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (A) original por el aminoácido (R) (mutación A278R),
- la posición homóloga a la posición 281 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (D) original por el aminoácido (N) (mutación D281N),
- 20 - la posición homóloga a la posición 287 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (D) original por el aminoácido (N) (mutación D287N),
- la posición homóloga a la posición 312 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (L) original por el aminoácido (K) (mutación L312K),
- 25 - la posición homóloga a la posición 321 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (D) original por el aminoácido (K) (mutación D321K),
- la posición homóloga a la posición 326 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (A) original por el aminoácido (R) (mutación A326R),
- la posición homóloga a la posición 329 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (D) original por el aminoácido (N) (mutación D329N),
- 30 - la posición homóloga a la posición 335 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (D) original por el aminoácido (N) (mutación D335N).

En una realización particular, el polipéptido de la invención comprende la SEQ ID NO 11.

Tal y como se utiliza en la presente invención el término “lisina” hace referencia a un enzima lítica aislada de origen fágico que mediante su unión a la pared bacteriana rompe dicha barrera mediante al hidrolizar la mureína, o peptidoglicano, que la conforma, para permitir la salida de la progenie fágica de la bacteria hospedadora y la infección de nuevas bacterias.

5 En la literatura, las enzimas de tipo lisina con actividad mureín-hidrolasa de bacterias Gram-positivas y sus bacteriófagos presentan una estructura modular, con características funcionales que las distinguen (Lopez, R. et al. 1997 Microb Drug Resist. 3, 199-211). Así, en la presente invención el término “módulo de unión a pared” de una lisina se refiere al extremo C-terminal del polipéptido con actividad lisina que permite que ésta éste se una a la  
 10 pared de la bacteria. El término “módulo catalítico” de una lisina se refiere al extremo N-terminal del polipéptido con actividad lisina y que le confiere su actividad catalítica mureín-hidrolasa. Y el término “linker” o “módulo linker” se refiere al fragmento polipeptídico comprendido entre los dominios C-terminal y N-terminal y que sirve de nexo entre ambos.

En la presente invención, los diferentes dominios se representan aquí con la letra  
 15 correspondiente a su posición, seguida de la lisina de la que derivan, y una letra correspondiente al mutante al que se refiere. Así, por ejemplo, C-Cpl-7S se refiere al extremo C-terminal de la lisina Cpl7 (módulo de unión a pared), mutante S; Así, por ejemplo, N-Cpl-7 se refiere al extremo N-terminal de la lisina Cpl7 (módulo catalítico), no-mutado. Como un experto en el estado de la técnica podrá apreciar, es posible combinar los  
 20 diferentes módulos fágicos para obtener nuevas enzimas con actividad bactericida.

Los diferentes dominios combinados se representan aquí con las letras “Cpl”, que se corresponden a la denominación común de las lisinas empleadas en los ejemplos, seguidas de un número que indica el fago de origen de la secuencia nativa, y otros tres dígitos que se corresponden a la posición de cada uno de los módulos empezando por el extremo N-  
 25 terminal; cada dígito es representado por un cero, cuando se refiere a la secuencia nativa del número que sigue a las letras Cpl, un número que se corresponde con el fago del cual se extrae la secuencia nativa y una letra cuando se trata de una variante mutada, así, por ejemplo:

- a) Cpl-7: secuencia nativa de Cpl-7
- 30 b) Cpl7-00S: donde
  - a. 0: módulo catalítico N-terminal, secuencia nativa de Cpl-7.
  - b. 0: módulo linker, secuencia nativa de Cpl-7.l,
  - c. S: módulo C-terminal de unión a pared, secuencia mutada variante S.

c) Cpl1-00S donde:

- a. 0: módulo catalítico N-terminal, secuencia nativa de Cpl-1.
- b. 0: módulo linker, secuencia nativa de Cpl-1.
- c. S: módulo C-terminal de unión a pared, secuencia mutada variante S.

5 d) Cpl1-07S donde:

- a. 0: módulo catalítico N-terminal, secuencia nativa de Cpl-1.
- b. 0: módulo linker, secuencia nativa de Cpl-7.
- c. S: módulo C-terminal de unión a pared, secuencia mutada variante S.

10 Como se ha comentado en la presente invención, el polipéptido de la invención que codifica el módulo de unión a pared de la lisina Cpl-7 modificado para que aumente su carga neta, presenta una mayor capacidad de unión a la pared celular bacteriana, y combinado con uno o varios módulos catalíticos, y opcionalmente linkers, procedentes de otros fagos bacterianos permite la construcción de enzimas lisinas quiméricas con actividad bactericida.

15 Así, otro objeto de la invención son las enzimas quiméricas, denominadas de ahora en adelante enzimas quiméricas de la invención, que comprenden, al menos, el polipéptido de la invención y un módulo N-terminal con actividad catalítica mureín-hidrolasa. Opcionalmente, dichas quimeras pueden presentar también un módulo linker.

20 Así, un objeto particular de la presente invención es la enzima quimérica de la invención cuya secuencia comprende el polipéptido de la invención y cuya secuencia además comprende:

- a. un módulo catalítico N-terminal que se corresponde con el dominio catalítico N-terminal de Cpl7,
  - b. un módulo linker que se corresponde con la secuencia del linker de Cpl-7,
  - c. el módulo catalítico C-terminal que se corresponde con el polipéptido de la invención.
- 25

Una realización particular de la invención es la enzima quimérica de la invención que se corresponde con la SEQ ID NO 17 (mutante Cpl7-00S) donde:

- a. un módulo catalítico N-terminal que se corresponde con el dominio catalítico N-terminal de Cpl7 con SEQ ID NO 3,
  - b. un módulo linker que se corresponde con la secuencia del linker de Cpl-7 con SEQ ID NO 5,
- 30

- c. el módulo catalítico C-terminal que se corresponde con el polipéptido de la invención con SEQ ID NO 11 (C-Cpl-7S).

Así, otro objeto particular de la presente invención es la enzima quimérica de la invención cuya secuencia comprende el polipéptido de la invención y cuya secuencia además comprende:

5

- a. un módulo catalítico N-terminal que presenta, al menos, las siguientes mutaciones en posiciones homólogas al módulo catalítico de la Cpl-7 nativa (de SEQ ID NO 3):

10

- a. la posición homóloga a la posición 25 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (E) original por el aminoácido (Q) (mutación E25Q).
- b. la posición homóloga a la posición 68 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (E) original por el aminoácido (Q) (mutación E68Q).
- c. la posición homóloga a la posición 69 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (E) original por el aminoácido (A) (mutación E69A).

15

- b. un módulo linker que se corresponde con la secuencia del linker de Cpl-7,
- c. el módulo catalítico C-terminal que se corresponde con el polipéptido de la invención con C-Cpl-7S.

Una realización particular de la invención es la enzima quimérica de la invención que se corresponde con la SEQ ID NO 19 (mutante Cpl7-N0S) donde:

20

- a. un módulo catalítico N-terminal que presenta, al menos, las siguientes mutaciones en posiciones homólogas al módulo catalítico de Cpl-7 nativa (de SEQ ID NO 3) y comprende la SEQ ID NO 9,

25

- a. la posición homóloga a la posición 25 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (E) original por el aminoácido (Q) (mutación E25Q).
- b. la posición homóloga a la posición 68 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (E) original por el aminoácido (Q) (mutación E68Q).
- c. la posición homóloga a la posición 69 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (E) original por el aminoácido (A) (mutación E69A).

30

- b. un módulo linker que se corresponde con la secuencia del linker de Cpl-7 de SEQ ID NO 5,
- c. el módulo catalítico C-terminal que se corresponde con el polipéptido de la invención con SEQ ID NO 11 (C-Cpl-7S).

Así, un objeto particular de la presente invención es la enzima quimérica de la invención cuya secuencia comprende el polipéptido de la invención y cuya secuencia además comprende:

- 5
- a. un módulo catalítico N-terminal que se corresponde con el dominio catalítico N-terminal de Cpl-1,
  - b. un módulo linker que se corresponde con la secuencia del linker de Cpl-7,
  - c. el módulo catalítico C-terminal que se corresponde con el polipéptido de la invención.

10 Una realización particular de la invención es la enzima quimérica de la invención que se corresponde con la SEQ ID NO 25 (mutante Cpl1-00S) donde:

- a. un módulo catalítico N-terminal que se corresponde con el dominio catalítico N-terminal de Cpl1 con SEQ ID NO 13,
- b. un módulo linker que se corresponde con la secuencia del linker de Cpl-7 con SEQ ID NO 5,
- 15 c. el módulo catalítico C-terminal que se corresponde con el polipéptido de la invención con SEQ ID NO 11 (C-Cpl-7S).

Así, un objeto particular de la presente invención es la enzima quimérica de la invención cuya secuencia comprende el polipéptido de la invención y cuya secuencia además comprende:

- 20
- a. un módulo catalítico N-terminal que se corresponde con el dominio catalítico N-terminal de Cpl-1,
  - b. un módulo linker que se corresponde con la secuencia del linker de Cpl-1,
  - c. un módulo catalítico C-terminal se corresponde con el polipéptido de la invención.

25 Una realización particular de la invención es el enzima quimérico de la invención que se corresponde con la SEQ ID NO 23 (mutante Cpl1-07S) donde:

- a. un módulo catalítico N-terminal que se corresponde con el dominio catalítico N-terminal de Cpl1 con SEQ ID NO 13,
- b. un módulo linker que se corresponde con la secuencia del linker de Cpl-1 con SEQ ID NO 15,
- 30 c. el módulo catalítico C-terminal que se corresponde con el polipéptido de la invención con SEQ ID NO 11 (C-Cpl-7S).

Los aminoácidos individuales en una secuencia se representan aquí como XN, en la que X es el aminoácido en la secuencia (designado mediante el código de una letra universalmente aceptado en la nomenclatura de aminoácidos), y N es la posición en la secuencia. Las mutaciones puntuales tipo sustitución en una secuencia de aminoácidos se representan aquí como X1NX2, en la que X1 es el aminoácido en la secuencia de proteína no mutada, X2 es el/los aminoácido/s nuevos de la secuencia de proteína mutada, y N es la posición en la secuencia de aminoácidos.

El término "carga neta" de una proteína se define como la suma de todas las cargas positivas y negativas que lleva la proteína a un determinado pH. Modos de medir calcular la carga neta de una proteína son conocidos en el estado de la técnica, y entre ellos, por ejemplo, se halla el método descrito en Low et al. 2011. J. Biol. Chem. 286: 34391-34403, en el que la carga neta (Z) se estima como la diferencia entre el número de (Lisinas + Argininas) menos el número de residuos de (Ácido aspártico + Ácido glutámico); o el método utilizado en Sedenterp en el que, además del número de grupos que pueden estar cargados positiva (Lisinas + Argininas + histidinas) o negativamente (Ácido aspártico + Ácido glutámico + cisteínas), la estimación tiene en cuenta el estado de ionización de los mismos calculado a partir las constantes de ionización de los distintos grupos y del valor del pH del medio en que se encuentra la proteína (Laue et al. 1992. Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science pp. 90-125).

El término "capacidad de unión a la pared celular bacteriana" hace referencia a la afinidad que tienen las lisinas fágicas por la pared celular de las bacterias. Una mayor afinidad, obtenida por ejemplo por mejora de la carga neta polipeptídica, incrementa la cantidad de lisina fágica que se une la bacteria, y por tanto, la cantidad de pared hidrolizada y, como consecuencia, una mayor lisis bacteriana.

Las mutaciones aquí descritas introducidas en la secuencia polipeptídica SEQ ID No 7 que se corresponde con el dominio de unión a pared de la lisina Cpl-7 pueden obtenerse mediante técnicas de ingeniería genética o ADN recombinante, como por ejemplo mutando la secuencia codificante de Cpl-7 (SEQ ID NO 1) mediante mutagénesis dirigida o al azar, o bien pueden obtenerse a partir de la síntesis química de la secuencia de nucleótidos portadora de las mutaciones.

Además, con la información suministrada, un experto en la materia es capaz de combinar las mutaciones anteriormente descritas en la presente invención para generar nuevas

variantes del módulo de unión a pared C-Cpl-7 con actividad similar o mejorada. Una posibilidad es la sustitución conservativa de los aminoácidos en las posiciones anteriormente comentadas. Así, por ejemplo, se entiende por sustitución conservativa aquella que mantiene las características de polaridad y carga del aminoácido sustituido. Por ejemplo, lisina y arginina son aminoácidos cuyas cadenas laterales están cargadas positivamente a pH neutro, por lo que se acepta que los cambios de lisina por arginina o viceversa representan cambios conservativos. Se han clasificado los 20 aminoácidos que constituyen la base de todas las proteínas naturales de acuerdo a su conservatividad en grupos: (i) aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano); (ii) aminoácidos alifáticos (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina y metionina); (iii) aminoácidos ionizables básicos (histidina, lisina y arginina); (iv) aminoácidos ionizables ácidos (ácidos aspártico y glutámico); (v) amidas de aminoácidos ácidos (asparagina y glutamina); y (vi) aminoácidos hidroxilados (serina y treonina). Algunos autores incluirían la cisteína en este último grupo.

También se incluyen en esta invención los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de la invención descritos y que se corresponden a variantes de los mismos obtenidos mediante mutagénesis dirigida del módulo de unión a pared C-terminal de la lisina Cpl-7 (dominio C-Cpl-7 con SEQ ID NO 7). Dichos polinucleótidos se corresponden con la secuencia de nucleótidos que constituye la secuencia codificante del polipéptido de la invención, denominados de ahora en adelante polinucleótidos de la invención.

Los términos "polinucleótido", "secuencia nucleotídica", "secuencia de nucleótidos", "ácido nucleico" y "oligonucleótido" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, que pueden estar, o no, química o bioquímicamente modificados.

Así, un segundo objeto de la invención hace referencia a la secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido de la invención, de ahora en adelante polinucleótido primero de la invención, caracterizado porque codifica el módulo de unión a pared de la lisina Cpl-7 derivada del fago de *S. pneumoniae* Cp-7 modificado para que aumente su carga neta (lo que le confiere una mayor capacidad de unión a la pared celular bacteriana), porque presenta los cambios en su secuencia de aminoácidos descritos anteriormente; y, además, porque su secuencia presenta una identidad de al menos un 50% con respecto a la secuencia parental SEQ ID NO 2.

Así, un objeto preferido de la invención es el polinucleótido primero de la invención que codifica el polipéptido de la invención que presenta los cambios de aminoácidos L216K, D225K, A230R, D233N, D239N, L264K, D273K, A278R, D281N, D287N, L312K, D321K, A326R, D329N y D335N. En una realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 12 (módulo C-Cpl-7S).

Otro objeto de la invención se corresponde con el polinucleótido que codifica la enzima de la invención, de ahora en adelante, polinucleótido segundo de la invención, caracterizado porque comprende un dominio catalítico N-terminal y el dominio de unión a pared C-terminal se corresponde con el polipéptido de la invención.

Otro objeto preferido de la invención es el polinucleótido segundo de la invención que codifica la enzima quimérica de la invención con un módulo catalítico N-terminal que se corresponde con el dominio catalítico N-terminal de Cpl-7, un módulo linker que se corresponde con la secuencia del linker de Cpl-7, y el módulo catalítico C-terminal que se corresponde con el polipéptido de la invención. En una realización particular, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 18.

Otro objeto preferido de la invención es el polinucleótido segundo de la invención que codifica la enzima quimérica de la invención con un módulo catalítico N-terminal que se corresponde con el dominio catalítico N-terminal de Cpl7 mutado N-Cpl7-N, un módulo linker que se corresponde con la secuencia del linker de Cpl-7, y el módulo catalítico C-terminal que se corresponde con el polipéptido de la invención. En una realización particular, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 20.

Otro objeto preferido de la invención es el polinucleótido segundo de la invención que codifica la enzima quimérica de la invención con un módulo catalítico N-terminal que se corresponde con el dominio catalítico N-terminal de Cpl1, un módulo linker que se corresponde con la secuencia del linker de Cpl-1, y el módulo catalítico C-terminal que se corresponde con el polipéptido de la invención. En una realización particular, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 26.

Otro objeto preferido de la invención es el polinucleótido segundo de la invención que codifica la enzima quimérica de la invención con un módulo catalítico N-terminal que se corresponde con el dominio catalítico N-terminal de Cpl1, un módulo linker que se corresponde con la secuencia del linker de Cpl-7, y el módulo catalítico C-terminal que se

corresponde con el polipéptido de la invención. En una realización particular, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 24.

5 Considerando que las lisinas de distintas cepas y aislados de los fagos de *S. pneumoniae*, particularmente del fago Cp7, puedan ser evolutivamente similares, es de esperar que la identidad global de los genes que las codifican sea igual o mayor de un 50%, y más concretamente al nivel de la secuencia polinucleotídica correspondiente a la SEQ ID NO 8 (C-Cpl-7 nativo), sea del 60% o mayor. Además, el grado de identidad o la homología existente entre las secuencias de aminoácidos de la(s) lisina(s) objeto de la invención y las secuencias de otras lisinas similares pueden determinarse por métodos conocidos en estado  
10 de la técnica. Por ejemplo, a través del alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la lisina putativa y la correspondiente al módulo C-Cpl-7S de esta memoria (SEQ ID NO 11).

El término “homología”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más concretamente a la semejanza o identidad entre los nucleótidos de posiciones equivalentes  
15 en dos o más polinucleótidos.

El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos idénticos entre dos polinucleótidos que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLASTP o BLASTN, ClustalW y FASTA. Puesto que dos  
20 proteínas se consideran homólogas si tienen el mismo origen evolutivo, en general, se asume que valores superiores de similitud o identidad del 60% indican estructuras homólogas. Podemos considerar, por tanto, que porcentajes de identidad de, al menos, un 80% mantendrán las mismas propiedades de dicho polipéptido.

Con la información suministrada en la presente invención un experto en la materia es capaz  
25 de identificar secuencias de nucleótidos homólogas a las descritas en la presente invención y que codifican para módulos de unión a pared bacteriana con características idénticas a las descritas para el polipéptido de la invención. Por tanto, el polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de una variante de la módulo de unión a pared de la lisina Cpl-7 derivada del fago de *S. pneumoniae* Cp-7 modificado con las características  
30 anteriormente descritas, cuya secuencia de nucleótidos se corresponde a:

a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada o en su cadena complementaria,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar con una secuencia polinucleotídica de (a), o

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de (a) y/o (b) debido a la degeneración del código genético.

- 5 Los polinucleótidos primero y segundo de la invención puede encontrarse aislado como tal o formando parte de los vectores que permiten la propagación de dichos polinucleótidos en células hospedadoras adecuadas. Por lo tanto, en otro objeto, la invención se refiere a un vector, en adelante vector primero de la invención, que comprende el polinucleótido primero de la invención como se describe anteriormente. Otro objeto de la invención se refiere a un
- 10 vector, en adelante vector segundo de la invención, que comprende el polinucleótido segundo de la invención como se describe anteriormente.

El vector puede ser, por ejemplo un vector de clonación o un vector de expresión. Preferiblemente, dicho vector es un plásmido apropiado para la expresión y purificación del polipéptido de la invención y/o la enzima quimérica de la invención.

- 15 El término "vector de clonación", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ADN en la que se puede integrar otro fragmento de ADN, sin que pierda la capacidad de autorreplicación. Ejemplos de vectores de expresión son, pero sin limitarse, plásmidos, cósmidos, fagos de ADN o cromosomas artificiales de levadura.

- El término "vector de expresión", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a
- 20 un vector de clonación adecuado para expresar un ácido nucleico que ha sido clonado en el mismo tras ser introducido en una célula, denominada célula huésped. Dicho ácido nucleico se encuentra, por lo general, unido operativamente a secuencias de control.

- El término "expresión" se refiere al proceso por el cual se sintetiza un polipéptido a partir de un polinucleótido. Incluye la transcripción del polinucleótido en un ARN mensajero (ARNm) y
- 25 la traducción de dicho ARNm en una proteína o un polipéptido.

El término "célula hospedadora" o "célula huésped", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier organismo procariota o eucariota que es recipiente de un vector de expresión, de clonación o de cualquier otra molécula de ADN.

Los vectores adecuados para la inserción de los polinucleótidos primero y segundo de la invención son plásmidos utilizados para la expresión de proteínas en procariotas tales, a título ilustrativo, como pT7-7, pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, Co1E1, pCR1, RP4, fagos y vectores "lanzadera", tales como pSA3 y pAT28; vectores de expresión en levaduras tales como el plásmido de 2 micras de *Saccharomyces cerevisiae*, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centromeros y similares; vectores de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y de la pVL vectores de expresión; vectores de expresión en células de plantas tales como piBi, pEarleyGate, PAVA, pCAMBIA, PGSA, PGWB, PMDC, PMY, serie de poros y similares, y otros plásmidos de expresión de proteínas utilizados en células eucariotas, incluyendo baculovirus adecuados para la transfección de células de insecto usando cualquier sistema disponible en el estado de la técnica.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, una "célula hospedadora" o "célula huésped" incluye cualquier célula cultivable que puede ser modificada mediante la introducción de ADN no contenido de manera natural en la célula, de aquí en adelante célula hospedadora de la invención.

Preferiblemente, una célula hospedadora es aquella en la que el polinucleótido primero de la invención y el polinucleótido segundo de la invención pueden ser expresados, dando lugar a un polipéptido estable, modificado post-traduccionalmente y localizado en el compartimento subcelular apropiado. La elección de una célula hospedadora adecuada puede también estar influida por la elección de la señal de detección. Por ejemplo, el uso de construcciones con genes reporteros (por ejemplo, *lacZ*, luciferasa, timidina quinasa o la proteína verde fluorescente "GFP") puede proporcionar una señal seleccionable mediante la activación o inhibición de la transcripción del gen de interés en respuesta a una proteína reguladora de la transcripción. De cara a conseguir una selección o "screening" óptimo, el fenotipo de la célula hospedadora deberá ser considerado.

Una célula hospedadora de la presente invención incluye células procariotas y eucariotas. Entre las procariotas se incluyen organismos Gram negativos (por ejemplo, *Escherichia coli*) o Gram positivos (por ejemplo, bacterias del género *Bacillus*). Las células procariotas se usarán, preferiblemente, para la propagación de la secuencia del control de la transcripción del vector que contiene el(los) polinucleótido(s) objeto(s) de la invención, lo que permitirá conseguir un mayor número de copias del vector conteniendo el(los) polinucleótido(s) objeto(s) de la invención. Entre las células hospedadoras procariotas adecuadas para la

transformación de este vector se encuentran, por ejemplo, pero sin limitarse a, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y otras especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*. Las células eucariotas incluyen, entre otras, células de levadura, células de plantas, células de hongos, células de insectos, células de mamífero, y células de organismos parásitos (por ejemplo, *Trypanosomas*). Tal y como se emplea en esta memoria, el término levadura no incluye sólo levadura en el sentido taxonómico estricto, es decir, organismos unicelulares, sino también hongos multicelulares similares a las levaduras u hongos filamentosos. Ejemplos de especies son *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Ustilago maydis*, con *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* como organismos preferidos. Otras levaduras que pueden utilizarse en la producción de la(s) secuencia(s) polipeptídica(s) de la presente invención son *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Candida tropicalis*, y *Hansenula polymorpha*. Los sistemas de cultivo con células hospedadora de mamífero incluyen líneas celulares establecidas como las células COS, células L, células 3T3, células de ovario de hámster chino (CHO), células madre embrionarias, con las células BHK, HeK o HeLa como células preferidas. Las células eucariotas son, preferiblemente, utilizadas para la expresión del gen recombinante mediante la aplicación de la secuencia de regulación de la transcripción o el vector de expresión de la presente invención.

Así otro objeto de la invención se refiere a un método de obtención del polipéptido de la invención, de ahora en adelante método primero de la invención, que comprende:

- 1) Introducir el vector primero de la invención en una célula hospedadora adecuada (célula hospedadora primera de la invención),
- 2) Cultivar la célula hospedadora primera de la invención en un medio adecuado, y,
- 3) Purificar el polipéptido de la invención con mayor carga neta y mayor capacidad de unión a la pared celular bacteriana.

Así otro objeto de la invención se refiere a un método de obtención de la enzima quimérica de la invención, de ahora en adelante método segundo de la invención, que comprende:

- 1) Introducir el vector segundo de la invención en una célula hospedadora adecuada (célula hospedadora segunda de la invención),
- 2) Cultivar la célula hospedadora segunda de la invención en un medio adecuado, y,
- 3) Purificar la enzima quimérica de la invención con mayor carga neta y mayor capacidad de unión a la pared celular bacteriana.

Un cultivo de células hospedadoras se refiere al proceso de mantener y crecer las células hospedadoras. Los cultivos celulares necesitan condiciones controladas de temperatura, pH, porcentajes de gases (oxígeno y dióxido de carbono), así como la presencia de los nutrientes adecuados para permitir la viabilidad y la división celular. Los cultivos celulares pueden desarrollarse en sustratos sólidos como el agar, o en medio líquido, lo que permite cultivar grandes cantidades de células en suspensión.

El término "purificar" tal y como se emplea en la descripción, se refiere al aislamiento del polipéptido de la invención o de la enzima quimérica de la invención y a su concentración, del resto de polipéptidos presentes en el medio de cultivo y de la célula hospedadora de la invención. El aislamiento del polipéptido de la invención puede llevarse a cabo mediante técnicas de solubilidad diferencial, cromatografía, electroforesis o isoelectroenfoque. Las técnicas de cromatografía pueden estar basadas en el peso molecular, la carga iónica (basada en el estado de ionización de los aminoácidos en las condiciones de trabajo), la afinidad de la proteína por determinadas matrices o columnas cromatográficas, o mediante etiquetas de purificación, y puede realizarse en columna, en papel o en placa. El aislamiento de la proteína puede realizarse, por ejemplo, mediante precipitación con sulfato amónico, cromatografía líquida rápida (FPLC, del inglés "Fast Protein Liquid Chromatography") o cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, del inglés "High Performance Liquid Chromatography"), empleando sistemas automatizados que reducen notablemente el tiempo de purificación e incrementan el rendimiento de la purificación.

La expresión "etiqueta de purificación" o "etiqueta de afinidad", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una secuencia de aminoácidos que ha sido incorporada (generalmente, por ingeniería genética) a una proteína para facilitar su purificación. La etiqueta, que puede ser otra proteína o una secuencia corta de aminoácidos, permite la purificación de la proteína, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad. Etiquetas de purificación conocidas en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse a, el péptido de unión a calmodulina (CBP), la enzima glutatión-S-transferasa (GST) o una cola de residuos de histidina.

Un experto en el estado de la técnica conoce las técnicas por las que se puede obtener el polinucleótido de la invención, que podría hacerse, por ejemplo, pero sin limitarse a, por mutagénesis dirigida o al azar a partir de un polinucleótido no mutado, mediante síntesis química del polinucleótido completo, o a través del ensamblado de fragmentos de ADN que codifiquen para distintas porciones de la secuencia que se desea obtener.

Así, otro objeto de la invención se refiere al uso del polinucleótido primero de la invención para la obtención del polipéptido de la invención con mayor carga neta y mejor capacidad de unión a la pared bacteriana.

5 Otro objeto de la invención se refiere al uso de la célula primera hospedadora de la invención para la obtención del polipéptido de la invención. Preferentemente, la célula hospedadora primera de la invención es una bacteria, más preferentemente *Escherichia coli*.

Otro objeto de la invención se refiere al uso del polinucleótido segundo de la invención para la obtención de la enzima quimérica de la invención con mayor carga neta y mejor capacidad de unión a la pared bacteriana.

10 Otro objeto de la invención se refiere al uso de la célula hospedadora segunda de la invención para la obtención de la enzima quimérica de la invención. Preferentemente, la célula hospedadora segunda de la invención es una bacteria, más preferentemente *Escherichia coli*.

15 En el estado de la técnica son conocidas técnicas de marcaje como los inmunoensayos que se basan en el reconocimiento por parte de un anticuerpo de una determinada secuencia polipeptídica, o epitopo. En este caso, el polipéptido de la invención puede unirse a la pared bacteriana mediante el reconocimiento del peptidoglicano que la recubre; esta característica, como el experto en el estado de la técnica puede apreciar, permite, sobre todo en el caso de las bacterias Gram-positivas, el empleo del polipéptido de la invención en aplicaciones  
20 biotecnológicas como el marcaje y la captura de las bacterias de interés.

Así, un objeto particular de la invención lo constituye el polipéptido de la invención caracterizado por que está unido a una etiqueta de marcaje. Etiquetas de marcaje comúnmente empleadas incluyen, pero no se limitan a, biotina, moléculas fluorescentes, moléculas radiactivas, sustratos cromogénicos, marcadores quimioluminiscentes, enzimas, y  
25 similares; éstos permiten la detección de una bacteria en, por ejemplo, un tejido mediante, por ejemplo, el uso de marcaje fluorescente, lo que permitiría observar su capacidad de infectividad.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el polipéptido de la invención caracterizado por que está unido a una partícula de aislamiento para la concentración de la  
30 población bacteriana de una muestra. Partículas de aislamiento pueden ser, por ejemplo,

pequeñas esferas magnéticas (beads) o de sepharosa. Este tipo de partículas permiten el aislamiento de las bacterias de una muestra, particularmente aquellas de interés clínico como por ejemplo esputos, exudados, biopsias, etc., pero también aquellas de interés forense como muestras de semen o saliva, y tras una centrifugación, su concentración. Las bacterias así aisladas pueden luego ser sometidas a una PCR para su identificación, o bien su cultivo en medios adecuados para la identificación mediante técnicas clásicas de microbiología, bien conocidas por el experto en el estado de la técnica. Este tipo de concentración previa a la identificación es de particular interés en el caso de aquellas muestras en las que la identificación es particularmente difícil debido al bajo número de células de interés en la muestra.

Tal y como se ha comentado, las lisinas tienen la capacidad de romper las paredes celulares por las que presentan afinidad, provocando la muerte bacteriana. Así, las enzimas quiméricas de la invención, que comprenden, al menos, el polipéptido de la invención, un módulo catalítico con actividad mureín-hidrolasa, y opcionalmente un linker, pueden ser empleadas como biocidas tanto en aplicaciones terapéuticas (antibióticos) como en la limpieza antiséptica de superficies y materiales contra bacterias pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo:

- a) Gram positivas, preferentemente, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Listeria*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Actinomyces*, y más preferentemente, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus adolescenties*, *Clostridium jeikeium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, and *Mycobacterium smegmatis*.
- b) Gram negativas, preferentemente, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Campilobacter*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Helicobacter*, *Bartonella*, *Neisseria* y *Bordetella*, y más preferentemente, *Escherichia coli*, y *Pseudomonas putida*,

Así, otro objeto de la invención lo constituye el uso de la enzima quimérica de la invención en la elaboración de un medicamento o una composición farmacéutica para el tratamiento de una infección bacteriana o como antiséptico. Preferentemente, dicho tratamiento está dirigido contra *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *B. acillus adolescenties*, *Clostridium jeikeium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, and *Mycobacterium Smegmatis*.

Otro objeto de la invención lo constituye una composición farmacéutica útil para el tratamiento de enfermedades infecciosas o como antiséptico, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende al menos una enzima quimérica de la invención, en cantidad farmacéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas o antisépticas.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de eliminar los microorganismos patógenos, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, para el caso de una composición terapéutica, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta, forma y frecuencia de administración; y para el caso de una composición antiséptica, las condiciones del entorno, la forma de aplicación, entre otras.

En otra realización particular, dicha composición farmacéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por vía oral, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el “Tratado de Farmacia Galénica”, C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

Otra realización particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención donde la enzima quimérica de la invención comprende una secuencia perteneciente, a título ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención, al siguiente grupo: SEQ ID NO 17, SEQ ID NO 19, SEQ ID NO 23, SEQ ID NO 25.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### **EXPLICACIÓN DE LAS FIGURAS**

**Figura 1. Esquema de las construcciones de enzibióticos.** A) Esquema de enzimas silvestres. B) Esquema de lisozimas modificadas y quimeras.

10 **Figura 2. Localización de las mutaciones introducidas en los mutantes Cpl7-00S y Cpl7-N0S.** A) Estructura de la segunda repetición de C-Cpl7-00S (SEQ ID NO 11) mostrando los aminoácidos modificados, e identificación de la zona reconocida por "fpocket" como sitio de unión a la pared celular mediante el conjunto de esferas grises. En la parte superior se muestra la secuencia de una repetición seguida del linker. Sobre fondo gris los  
15 residuos conservados dentro de la familia CW\_7. B) Localización de las mutaciones introducidas en N-Cpl7-N (SEQ ID NO 9). La cavidad catalítica está situada en el centro del barril.

**Figura 3. Cinética de lisis de la cepa R6 de *S. pneumoniae*** por diferentes variantes de Cpl-7 a distintas concentraciones de enzima. Los ensayos fueron realizados en PBS, pH 6.0, a 37°C. Panel superior, Cpl-7; Panel medio, Cpl7-00S; y panel inferior, Cpl7-N0S.  
20

**Figura 4. Actividad bactericida de las lisozimas sobre la cepa R6 de *S. pneumoniae*.** Panel superior, cinética de lisis. Panel inferior, células viables de las muestras tras su incubación durante 60 min en ausencia y en presencia de las mismas. Los ensayos fueron realizados en PBS, pH 6.0, a 37°C y con una concentración de enzima de 5 µg/ml.

25 **Figura 5. Actividad bactericida de las lisozimas sobre la cepa D39 de *S. pneumoniae*.** Panel superior, cinética de lisis. Panel inferior, células viables de las muestras tras su incubación durante 60 min en ausencia y en presencia de las mismas. Los ensayos fueron realizados en PBS, pH 6.0, a 37°C y con una concentración de enzima de 5 µg/ml.

**Figura 6. Actividad bactericida de las lisozimas sobre la cepa P007 de *S. pneumoniae*.**

Panel superior, cinética de lisis. Panel inferior, células viables de las muestras tras su incubación durante 60 min en ausencia y en presencia de las mismas. Los ensayos fueron realizados en PBS, pH 6.0, a 37°C y con una concentración de enzima de 5 µg/ml.

5 **Figura 7. Actividad bactericida de las lisozimas sobre la cepa P008 de *S. pneumoniae*.**

Panel superior, cinética de lisis. Panel inferior, células viables de las muestras tras su incubación durante 60 min en ausencia y en presencia de las mismas. Los ensayos fueron realizados en PBS, pH 6.0, a 37°C y con una concentración de enzima de 5 µg/ml.

**Figura 8. Actividad bactericida de las lisozimas ensayadas sobre la cepa D48 de *S.***

10 ***pneumoniae*.** Panel superior, cinética de lisis. Panel inferior, células viables de las muestras tras su incubación durante 60 min en ausencia y en presencia de las mismas. Los ensayos fueron realizados en PBS, pH 6.0, a 37°C y con una concentración de enzima de 5 µg/ml.

**Figura 9. Actividad bactericida de las lisozimas ensayadas sobre de *S. pyogenes*.**

15 Panel superior, cinética de lisis. Panel inferior, células viables de las muestras tras su incubación durante 60 min en ausencia y en presencia de las mismas. Los ensayos fueron realizados en PBS, pH 6.0, a 37°C y con una concentración de enzima de 5 µg/ml.

**Figura 10. Actividad bactericida de las lisozimas ensayadas sobre *S. aureus*.** Panel

20 superior, cinética de lisis. Panel inferior, células viables de las muestras tras su incubación durante 60 min en ausencia y en presencia de las mismas. Los ensayos fueron realizados con una concentración de enzima de 5 µg/ml.

**Figura 11. Actividad bactericida de las lisozimas ensayadas sobre *S. iniae*.** Panel

superior, cinética de lisis. Panel inferior, células viables de las muestras tras su incubación durante 60 min en ausencia y en presencia de las mismas. Los ensayos fueron realizados en PBS, pH 6.0, a 37°C y con una concentración de enzima de 5 µg/ml.

25 **Figura 12. Actividad bactericida de las lisozimas ensayadas sobre *S. mitis* SK598.**

Panel superior, cinética de lisis. Panel inferior, células viables de las muestras tras su incubación durante 60 min en ausencia y en presencia de las mismas. Los ensayos fueron realizados en PBS, pH 6.0, a 37°C y con una concentración de enzima de 5 µg/ml.

**Figura 13. Actividad bactericida de las lisozimas ensayadas sobre *E. coli* DH10B pretratadas con 0.01% carvacrol.** Panel superior, cinética de lisis. Panel inferior, células viables de las muestras tras su incubación durante 60 min en ausencia y en presencia de las mismas. Los ensayos fueron realizados en PBS, pH 6.0, a 37°C y con una concentración de enzima de 5 µg/ml.

**Figura 14. Modelo animal de infección en embriones de pez cebra.** Representación del porcentaje de viabilidad de embriones de peces cebra en las pruebas de infección con *S. pneumoniae* o *S. pyogenes* y tratamiento con Cpl7-00S. Las barras indican desviaciones estándar y los asteriscos resultados estadísticamente significativos con respecto a los controles. Para el análisis estadístico se ha realizado el test de Anova ( $p < 0.01$ ).

## **MODO DE REALIZACION DE LA INVENCION**

### **Ejemplos**

**Ejemplo 1. Generación de dominios de unión a pared C-Cpl-7 mejorados.** El procedimiento de mejora está basado, fundamentalmente, en la modificación de la carga neta de las tres repeticiones que forman el dominio C-Cpl-7 sin que los cambios de secuencia introducidos alteren el plegamiento de la proteína. La selección de las posiciones a modificar y el tipo de mutación introducida en cada posición se llevó a cabo teniendo en cuenta, por tanto, la conservación de secuencias dentro de la familia CW\_7 (PF08230) y los modelos a alta resolución previamente generados para N-Cpl-7 y C-Cpl-7 (Bustamante et al. 2010. J. Biol. Chem. 285:33184-33196). Se construyeron 2 mutantes en los que se modificaron una posición por repetición (Cpl7-00E, SEQ ID NO 21)) y cinco posiciones por repetición (Cpl7-00S, SEQ ID NO 17) de C-Cpl-7, todas ellas situadas en zonas alejadas de los posibles sitios de unión a la pared, según el análisis de la estructura llevado a cabo con el programa "Fpocket" (Le Guilloux et al. 2009. BMC Bioinf. 10:168) (Figura 2 A). Se construyó asimismo un tercer mutante (Cpl7-N0S, SEQ ID NO 19) en el que además de las mutaciones de Cpl7-00S se mutaron tres aminoácidos no conservados de N-Cpl-7, todos situados fuera de la cavidad catalítica (Figura 2B). Mediante dichas mutaciones la carga neta de la proteína pasó de -28.8 (Cpl-7) a -25.8 (Cpl7-00E), -10.85 (Cpl7-00S) y -7.85 (Cpl7-N0S) y se ha invertido, de negativa a positiva, la carga de las repeticiones CW\_7 en los dos últimos mutantes.

Simultáneamente, y con el objetivo de facilitar la creación de futuras mutaciones puntuales, se rompió la degeneración de secuencia que tiene la región codificante de C-Cpl-7 en la proteína silvestre, introduciendo en cada posición codones frecuentemente utilizados por *E. coli* que, sin modificar la secuencia de aminoácidos, permitieron también optimizar la expresión de las formas mutadas. En la Figura 1 se muestra la organización estructural de Cpl-7 y los mutantes mejorados junto con la carga neta total calculada para cada uno de ellos a pH neutro. Las secuencias codificantes de cada forma mutada, junto con las secuencias de aminoácidos se incluyen al final del ejemplo.

Los genes codificantes para las distintas variantes se obtuvieron por síntesis química a través de la empresa ATG:biosynthetics como derivados del plásmido pUC. Para optimizar la expresión de las proteínas, los fragmentos de ADN respectivos se subclonaron en el plásmido pT7-7 utilizando los sitios NdeI y PstI. Los plásmidos resultantes (pTRD750, pTR753 y pTR752 codificantes de Cpl7-00S, Cpl7-N0S y Cpl7-00E, respectivamente) se transformaron en *E. coli* BL21 (DE3) y las células transformadas se crecieron en LB tras inducir con IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido). Los niveles de expresión de las proteínas recombinantes fueron elevados y la purificación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento establecido para Cpl-7 silvestre. Las muestras purificadas se mantuvieron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  en 20 mM fosfato (pH 6.0). El mantenimiento de la estructura nativa de Cpl-7 en los mutantes se verificó comparando los espectros de dicroísmo circular de la forma silvestre y los mutantes (estructuras secundaria y terciaria) y los perfiles de sedimentación obtenidos por ultracentrifugación analítica (estructura cuaternaria).

### **Ejemplo 2. Construcción de proteínas híbridas con actividad bactericida portadoras de C-Cpl7-00S con espectro de acción ampliado**

Se han construido dos lisozimas híbridas portadoras del módulo catalítico de Cpl-1 (N-Cpl-1) fusionado a C-Cpl-7S mediante los linker de las formas nativas de Cpl-1 (quimera Cpl1-00S) y Cpl-7 (quimera Cpl1-07S). En la Figura 1 se muestra la organización estructural de las enzimas parentales (panel A) y de las mureín-hidrolasas híbridas construidas (panel B). Las secuencias codificantes, junto con las secuencias de aminoácidos se incluyen al final del ejemplo. Como puede verse en la Figura 1B, la carga neta de las quimeras es significativamente inferior a la Cpl-7 silvestre.

Los genes codificantes para las quimeras se obtuvieron por síntesis química a través de la empresa ATG:biosynthetics como derivados del plásmido pUC. Para optimizar la expresión

de las proteínas se procedió de la forma descrita en el ejemplo 1 para las variantes de Cpl-7. Las quimeras se purificaron siguiendo un procedimiento paralelo al descrito para Cpl-7 y sus mutantes. Las muestras purificadas se mantuvieron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  in 20 mM fosfato (pH 6.0).

### 5 **Ejemplo 3. Actividad bactericida de los mutantes de C-Cpl-7 y quimeras portadoras de C-Cpl7-00S**

Una vez puesto a punto el protocolo para la producción de las mureín-hidrolasas expresadas en *E. coli*, se purificaron las correspondientes proteínas y se llevaron a cabo ensayos de actividad bactericida sobre *S. pneumoniae* y otras bacterias, tanto Gram-positivas como  
10 Gram-negativas (Tabla 1). Como se puede observar en los datos de la Tabla 2, y a diferencia de Cpl-1, las enzimas portadoras del módulo C-Cpl-7 tienen un rango de huésped ampliado, ya que degradan no sólo las paredes de neumococo sino también las de otras bacterias, que no contienen colina en sus envueltas celulares, tanto Gram-positivas (*S. pyogenes*, *S. mitis* y *E. faecalis*, entre otras) como Gram-negativas (por ejemplo, *P. putida* y  
15 *E. coli*). Los módulos mejorados potencian de forma significativa la actividad bactericida, como se deduce del hecho de que Cpl7-00S tenga el mismo nivel de actividad que Cpl-7 a una concentración 2.5 veces menor y de que, en igualdad de condiciones, la caída en el número de células viables producida por las enzimas modificadas sea  $\approx 10$  veces mayor en un porcentaje importante de casos (Tabla 2). Es importante destacar que este aumento de la  
20 actividad bactericida se observa también frente a aislados clínicos multirresistentes de neumococo (cepas D48, 69 y 1515), frente a *S. mitis* (otro patógeno de enorme relevancia clínica) y frente a especies como *E. coli* que pueden ser o no patogénicas. De entre todas las enzimas construidas, Cpl7-00S es la más activa frente *S. pneumoniae*, *S. mitis* y *E. coli* ya que su capacidad bactericida supera, o como mínimo iguala, a las de las otras enzimas  
25 que contienen el módulo C-Cpl-7 o variantes del mismo (Tabla 3), y su CMI para la cepa de neumococo ATCC 49619 es cuatro veces inferior a la de Cpl-7 (Tabla 2). Cpl7-00S constituye por tanto el primer ejemplo de la optimización de las propiedades enzimáticas de una mureín-hidrolasa nativa de neumococo, en este caso codificada por un fago, que es capaz de hidrolizar diversas paredes bacterianas, más allá de las de su sustrato homólogo.

30

**Tabla 1. Lista de bacterias utilizadas**

	<b>Bacteria</b>	<b>Cepa</b>	<b>ATCC<sup>a</sup></b>	<b>Origen<sup>b</sup></b>
5	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6		CIB
		P007		CIB
		P008		CIB
		D39		CIB
		D48		CIB
		69		ISCIII
		1515		ISCIII
10	<i>Streptococcus pyogenes</i>		12344	CECT
	<i>Streptococcus mitis</i>	SK598		CIB
15	<i>Streptococcus agalactiae</i>		49456	CIB
			13813	CECT
			29178	CECT
			25175	CECT
			9542	CECT
			12600	CECT
			12600	CECT
20	<i>Corynebacterium jeikeium</i>		43734	DSM
	<i>Enterococcus faecalis</i>		19433	CECT
	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>		9936	CECT
	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	mc <sup>2</sup> 155	19420	CIB
25	<i>Escherichia coli</i>	DH10B		CIB
	<i>Pseudomonas putida</i>	KT2442		CIB

<sup>a</sup>ATCC, American Type Culture Collection. <sup>b</sup>CIB, Centro de Investigaciones Biológicas; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; ISCIII, Instituto de Salud Carlos III.

**Tabla 2. Análisis de células viables de las diferentes cepas estudiadas tras incubarlas durante 60 min con distintas mureín-hidrolasas**

	Bacteria	Cpl-1	Cpl-7	Cpl7-00S	Cpl7-N0S	Cpl7-00E	Cpl1-07S	Cpl1-00S
5	Gram-positivas							
	<i>S. pneumoniae</i>							
	R6	*	+++	++++	++++	+++	+++	+++
	D39	*	++	+++	++	++	+++	+++
	P007	*	++	++	++	++	++	++
10	P008	*	++	+++	++	++	++	++
	D48	++++	+	++	++	++	++	++
	69	*	++	+++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	1515	*	++	+++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>S. pyogenes</i>	–	+++	++++	+++	+++	+++	+++
15	<i>S. mitis</i>							
	SK598	–	+++	+++	++	++	++	++
	49456	++++	+++	++++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>S. agalactiae</i>	–	–	–	–	–	–	–
	<i>S. iniae</i>	–	+	+	+	+	+	+
20	<i>S. mutans</i>	–	–	–	–	–	+	+
	<i>S. dysgalactiae</i>	–	+	+	+	+	+	+
	<i>S. aureus</i>	–	–	–	–	–	–	–
	<i>B. adolescentis</i>	–	+	+	+	+	+	+
	<i>C. jeikeium</i>	–	–	–	–	–	–	–
25	<i>E. faecalis</i>	–	++	++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>L. lactis</i>	–	–	–	–	–	–	–
	<i>M. smegmatis</i>	–	–	–	–	–	–	–
	Gram-negativas							
	<i>E. coli</i> DH10B	–	+	+++	+	+	+	+
30	<i>P. putida</i> KT2442	–	++	++	+	–	–	–

(–) Sin efecto; n.d. no determinado; (+) Descenso de 1 unidad logarítmica en células viables; (++) Descenso de 2 unidades logarítmicas en células viables; (+++) Descenso de 3 unidades logarítmicas en células viables; (++++) Descenso de 4 o más unidades logarítmicas en células viables; (\*) < 10 unidades formadoras de colonias/ml.

**Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI)**

Enzibióticos	CMI
Cpl-7	256 µg/ml
Cpl7-00S	64 µg/ml
Cpl-1	16 µg/ml

5

Los ensayos de lisis sobre las bacterias Gram-positivas ensayadas se realizaron a diferentes concentraciones de enzima (Figura 2), y como concentración standard se escogió 5µg/ml (Figuras 4-14). Finalmente, en el ensayo estándar se usó una solución de la bacteria a estudiar resuspendida en tampón PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.0) con un valor de DO<sub>550</sub> ≅ 0.6 y, tras añadir una determinada cantidad de enzima purificada, se midió la evolución de la turbidez de la muestra a 550 nm (DO<sub>550</sub>) incubando durante 60 minutos a 37°C. A diferentes intervalos se tomaron alícuotas de las muestras para observar la morfología celular al microscopio óptico y se calculó el número de células viables (Figuras 3-13).

15 En general, las mureín-hidrolasas han demostrado su efectividad contra bacterias Gram-positivas pero se han mostrado ineficaces contra las Gram-negativas, debido a la presencia en estas últimas de una membrana externa que impide el acceso directo de la enzima al peptidoglicano, su sustrato natural; consistentemente, los mismos resultados se obtuvieron en nuestro caso con *E. coli* y *P. putida*. Es por ello que se recurrió a combinar el tratamiento enzimático con la adición de compuestos capaces de inducir alteraciones de la membrana externa y, por tanto, facilitar la acción de las mureín-hidrolasas añadidas desde el exterior. Para dicha estrategia se seleccionaron algunos aceites esenciales que habían demostrado tener actividad antibacteriana y cuyo modo de acción está asociado a la modificación de las membranas celulares (Burt, S. 2004. Int. J. Food Microbiol. 94:223-253). Más concretamente, se ha descrito que el carvacrol y el timol son capaces de desintegrar la membrana externa de bacterias Gram-negativas, liberando lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplásmica al ATP (Helander *et al.* 1998. J. Agr. Food Chem. 46:3590-3595). Así pues, se probaron distintas concentraciones (0.1%, 0.01% y 0.001%) de estos dos aceites esenciales utilizando *E. coli* y *P. putida* como sistemas modelo (datos no mostrados). Finalmente se eligió carvacrol al 0.01% por su capacidad para promover la acción lítica de algunas de las mureín-hidrolasas ensayadas sin tener apenas efecto bactericida por sí mismo. En estas condiciones, la tasa de muerte

30

inducida por Cpl7-00S a 5 µg/ml transcurridos 60 min superaba en dos unidades logarítmicas (*P. putida*) y tres unidades logarítmicas (*E. coli*) a la provocada únicamente por el carvacrol (Figura 13 y Tabla 2), mientras que la lisozima Cpl-1, dependiente de colina para su actividad, se mostró completamente ineficaz.

- 5 En la Tabla 2 se resumen los valores obtenidos para las tasas de muerte celular causadas por las distintas enzimas en las cepas testadas. A partir de los mismos se puede concluir que la modificación del módulo de unión a pared celular de C-Cpl-7, y en particular los cambios introducidos en el módulo C-Cpl-7S, potencian significativamente la actividad antimicrobiana de las lisinas que los portan, haciéndolas particularmente eficaces frente a
- 10 las distintas cepas de neumococo ensayadas, incluidos los aislados clínicos multirresistentes, así como frente a *S. pyogenes*, y *S. mitis*, otros dos importantes patógenos humanos.

#### **Ejemplo 4. Actividad bactericida de los mutantes de C-Cpl-7 in vivo.**

Para validar estos resultados obtenidos *in vitro* en un modelo de infección animal, se puso a

15 punto un modelo utilizado previamente para estudiar la patogénesis de estafilococos y que supone una alternativa al clásico modelo murino: los embriones de pez cebra (Miller y Neely. 2004. Acta Trop. 91:53-68). Embriones de 72 horas mantenidos en medio E3 (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl<sub>2</sub> and 0,33 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.0) se expusieron, por inmersión, a la acción de neumococo (cepa D39) o *S. pyogenes* durante 7 horas a 28.5°C, al cabo de las

20 cuales se lavaron con medio E3 y se trataron con buffer o con una solución de mureín-hidrolasa (25 µg ml<sup>-1</sup>). En estas condiciones la tasa de mortalidad de los embriones infectados era significativa con respecto a los controles no expuestos a las bacterias (22.6% para *S. pneumoniae* y 29.4% para *S. pyogenes*). Como se muestra en la Figura 14, la adición de Cpl7-00S a las muestras infectadas elevó de forma significativa la tasa de

25 supervivencia (99% en el caso de neumococo y 95.3% en el caso de *S. pyogenes*). Por el contrario el tratamiento con Cpl-1 sólo protegió a los embriones infectados por *S. pneumoniae*. Estos resultados demuestran la capacidad de Cpl7-00S y otras mureín-hidrolasas portadoras del módulo C-Cpl-7 mejorado para actuar como antimicrobianos in vivo frente a infecciones causadas por patógenos susceptibles a las mismas (Figura 14).

#### **30 Materiales y métodos**

**Bacterias y medios de cultivo.** Las cepas bacterianas utilizadas se enumeran en la Tabla 1 y las características de las cepas de neumococo se resumen a continuación: R6, cepa de laboratorio no capsulada; D39 (cápsula tipo 2); P007 (cápsula tipo 3) (Domenech et al., 2009. Environ. Microbiol. 11:2542-2555); P008 (cápsula tipo 4) (similar a P007 pero transformada con DNA de un tipo 4 capsular), y D48 (cápsula tipo 23F), 1515 (cápsula tipo 6B) y 69 (cápsula tipo 19F) son aislados clínicos multirresistentes (Ramos-Sevillano et al. 2012. Antimicrob. Agents Chemother. 56:5534-5540). Las bacterias Gram-positivas se sembraron en medios BHI (*C. jeikeium*, *S. dysgalactiae*, *S. iniae*), LB (*M. smegmatis mc<sup>2</sup>155*), M17 (*L. lactis*), BM (*B. adolescentes*), y C+Y (todas las demás), y se crecieron a 37°C sin agitación, excepto *S. iniae* que fue con agitación (Lacks y Hotchkiss. 1960. Biochim. Biophys. Acta 39: 508-517). *E. coli* y *P. putida* se crecieron, con agitación, en medio LB a 37°C y 30°C, respectivamente (Sambrook y Russell. 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual). Las cepas se conservaron congeladas a -70°C en medio de cultivo al que se añadió glicerol al 10% (v/v) (concentración final).

**Construcción de genes y purificación de proteínas.** Los genes codificantes de Cpl7-00S, Cpl7-N0S, Cpl7-00E, Cpl1-00S y Cpl1-07S se obtuvieron a partir de plásmidos recombinantes sintetizados por la empresa ATG:biosynthetics (Merzhausen, Alemania). Para dichas síntesis se partió de los genes nativos *cpl-1* y *cpl-7* (García et al. 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 914-918; García et al. 1990. Gene 86: 81-88). La secuencia de C-  
Cpl-7 se modificó para invertir su carga neta de elevadamente negativa a positiva, basándose en la observación de Low y colaboradores de que la carga neta del módulo catalítico de las mureín-hidrolasas fágicas determina el que la actividad bactericida de las mismas dependa o no de la adquisición de módulos de unión a la pared celular (Low et al. 2011. J. Biol. Chem. 286: 34391-34403), y en la hipótesis de que la carga de los módulos de unión a la pared celular podría tener en efecto comparable, aunque no haya sido previamente observado. Tras un exhaustivo análisis de la conservación de secuencias en las familias GH-25 (módulo catalítico de Cpl-1 y Cpl-7; PF081183) y de las repeticiones CW\_7 (PF08230; código de acceso a PFAM), y basándose en la información estructural disponible (Bustamante et al. 2010. J. Biol. Chem. 285:33184-33196), se introdujeron mutaciones que por su naturaleza o localización no deberían afectar a la estructura de los mutantes. De esta manera, se mutaron varios residuos localizados tanto en el módulo N-terminal como en el C-terminal por lo que la carga neta pasó, por ejemplo, de -28.8 (Cpl-7) a -10.85 (Cpl7-00S) y -7.85 (Cpl7-N0S). Los cambios introducidos se detallan en el ejemplo 1. En todos los casos, se aprovecharon estas síntesis para cambiar algunos codones de los genes originales, pero sin provocar cambios en la secuencia de aminoácidos, con el objetivo

de optimizar la expresión en *E. coli* y facilitar la introducción de nuevas mutaciones puntuales en C-Cpl-7 al romper la repetición perfecta de codones que existe en esta región en el gen silvestre. Los genes codificantes de estas enzimas, suministrados por ATG:biosintetic en un plásmido derivado de pUC, se subclonaron en el plásmido pT7-7 y su expresión se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3).

La pureza de las proteínas recombinantes se verificó por SDS-PAGE y espectrometría de masas (MALDI-TOF). Las enzimas purificadas se conservaron a -20°C y se diluyeron en PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 6.0, antes de realizar los ensayos. Las concentraciones de proteína se midieron espectrofotométricamente utilizando los coeficientes de absorción molar a 280 nm.

Las secuencias de todas estas mureín-hidrolasas y sus genes codificantes se muestran en los esquemas de los ejemplos 1 y 2. La carga neta de las proteínas y sus módulos a pH neutro se calculó a partir de la secuencia de aminoácidos con el programa Sendterp (Laue et al. 1992. En *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science* (Harding, SE, Rowe, AJ, y Horton, JC, eds) pp. 90–125, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK).

**Evaluación de la conservación de la estructura nativa de los mutantes de Cpl-7.** La conservación del estado nativo se verificó por dicroísmo circular (DC) y ultracentrifugación analítica. Los espectros de DC se registraron (UV-lejano y UV-cercano) en las condiciones previamente descritas por Bustamante et al. (2010), utilizando un espectropolarímetro J-810. Los experimentos de velocidad de sedimentación se realizaron en una ultracentrífuga Optima XL-A a 45.000 rpm utilizando células de doble sector. La distribución de coeficientes de sedimentación se calculó modelando por mínimos cuadrados no lineales los datos experimentales, con el programa SEDFIT (Laue et al. 1992. En *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science* (Harding, SE, Rowe, AJ, y Horton, JC, eds) pp. 90–125, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK). Todas las medidas se realizaron en 20 mM fosfato, pH 6.0, a 20°C.

**Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).** Las CMIs para Cpl-7, Cpl7-00S y Cpl-1 (Tabla 3) se midieron usando la cepa control para ensayos de susceptibilidad en neumococo ATCC 49619 (serotipo 19 F) (<http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/49619.aspx>). Se siguió el método de microdilución aprobado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), usando caldo Mueller-Hinton II ajustado en cationes (Becton, Dickinson and Co., Le Pont-de-Claix, Francia) suplementado con

sangre lisada de caballo al 5% (CA-MHB-LHB). Los ensayos se realizaron por triplicado y se procedió a su lectura tras 20-24 horas a 37°C.

**Ensayo de actividad bactericida y cálculo de células viables.** Las bacterias en fase exponencial de crecimiento se centrifugaron y se resuspendieron en 1.5 ml de PBS ajustando la turbidez final de las suspensiones a una  $DO_{550} \cong 0,6$ . A estas muestras se añadieron concentraciones adecuadas de las diferentes enzimas purificadas, o un volumen equivalente de PBS (controles). Los tubos se incubaron a 37°C durante una hora midiéndose la  $DO_{550}$  a distintos tiempos de incubación. En los ensayos con bacterias Gram-negativas, las células se resuspendieron en PBS suplementado con la concentración deseada de carvacrol o timol (0.1%, 0.01% y 0.001%) antes de proceder de la forma anteriormente descrita, y se realizaron controles en ausencia y en presencia de los mismos. Para calcular el número de células viables, se realizaron diluciones seriadas de las muestras en PBS y se sembraron en placas de agar en medio C+Y o de agar-sangre (agar de soja tripticaseína suplementado con 5% de sangre defibrinada de carnero) en el caso de las bacterias Gram-positivas y en placas de agar-LB en las Gram-negativas. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C y se contaron las colonias. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

**Ensayo de actividad bactericida en el modelo de embriones de pez cebra.** Los embriones silvestres distribuidos por ZF-biolabs (Tres Cantos, Madrid), se mantuvieron de acuerdo a los protocolos estándar (Westerfield M. 1993. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). Eugene: The University of Oregon Press) y se trataron con pronasa (2 mg/ml) durante 2 minutos para eliminar el corion 24 h después de la fecundación. Durante los experimentos los embriones se mantuvieron en medio E3 (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM  $CaCl_2$  and 0,33 mM  $MgSO_4$ ), pH 7, a 28.5°C. A las 72 h de la fecundación, los embriones se expusieron a la acción de los patógenos, agregando las bacterias ( $\approx 10^8$  CFU  $ml^{-1}$ ) previamente resuspendidas en medio E3. Al cabo de 7 h las muestras se lavaron de forma exhaustiva (7 veces) con medio E3 para eliminar las bacterias y se agregó Cpl7-00S o Cpl-1 (dosis única de 25  $\mu g$ ), o la cantidad equivalente de tampón (controles). La evolución de los embriones se siguió durante cinco días, añadiendo medio E3 fresco cada día. Los embriones se consideraron muertos cuando no se observó movimiento y desaparecía poco tiempo después la transparencia de los mismos. Controles con muestras libres de bacterias se realizaron en paralelo. Se emplearon un total de 255 embriones distribuidos individualmente en placas de 96 pocillos. Se probaron las siguientes

condiciones (24-36 embriones para cada condición) y cada experimento se repitió un mínimo de tres veces:

- Control (embriones + medio E3)
- Control + enzima ensayada
- 5 - Infección con *S. pneumoniae* D39
- Infección con *S. pneumoniae* D39 + tratamiento con las enzimas ensayadas (Cpl7-00S o Cpl-1)
- Infección con *S. pyogenes*
- Infección con *S. pyogenes* + tratamiento con las enzimas ensayadas (Cpl7-00S o
- 10 Cpl-1)

En la Figura 14 se muestran las tasas de supervivencia de los embriones en las distintas condiciones ensayadas. La viabilidad de los embriones incubados con la cepa R6 de neumococo (no patogénica) o con la cepa D39 inactivada por calentamiento (10 min a 65°C) era equivalente a la de los controles.

15

**REIVINDICACIONES**

1. Polipéptido que consiste en el módulo de unión a pared de la lisina Cpl-7, C-Cpl-7, modificado para que aumente su carga neta lo que le confiere una mayor capacidad de unión a la pared celular bacteriana, y caracterizado porque su secuencia de aminoácidos presenta una identidad de al menos un 50% con respecto a la secuencia parental SEQ ID NO 7, y porque comprende, al menos, las siguientes alteraciones en su secuencia de aminoácidos:
- la posición homóloga a la posición 216 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (L) original por el aminoácido (K),
  - 10 - la posición homóloga a la posición 225 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (D) original por el aminoácido (K),
  - la posición homóloga a la posición 230 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (A) original por el aminoácido (R),
  - la posición homóloga a la posición 233 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (D) original por el aminoácido (N),
  - 15 - la posición homóloga a la posición 239 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (D) original por el aminoácido (N),
  - la posición homóloga a la posición 264 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (L) original por el aminoácido (K),
  - 20 - la posición homóloga a la posición 273 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (D) original por el aminoácido (K),
  - la posición homóloga a la posición 278 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (A) original por el aminoácido (R),
  - la posición homóloga a la posición 281 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (D) original por el aminoácido (N),
  - 25 - la posición homóloga a la posición 287 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (D) original por el aminoácido (N),
  - la posición homóloga a la posición 312 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (L) original por el aminoácido (K),
  - 30 - la posición homóloga a la posición 321 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (D) original por el aminoácido (K),
  - la posición homóloga a la posición 326 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (A) original por el aminoácido (R),
  - la posición homóloga a la posición 329 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (D) original por el aminoácido (N),
  - 35

- la posición homóloga a la posición 335 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido (D) original por el aminoácido (N).

2. Polipéptido según la reivindicación 1 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 11.
- 5 3. Polinucleótido caracterizado por que codifica para el polipéptido según las reivindicaciones 1 y 2.
4. Polinucleótido según la reivindicación 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 12.
5. Vector caracterizado por que comprende, al menos, el polinucleótido según las  
10 reivindicaciones 3 y 4.
6. Célula hospedadora caracterizada por que comprende, al menos, el vector según la reivindicación 5.
7. Célula hospedadora según la reivindicación 6 caracterizada por ser *Escherichia coli*.
8. Método de obtención del polipéptido según las reivindicaciones 1 y 2 caracterizado por  
15 que comprende:
  - a) introducir el vector según la reivindicación 5 en una célula hospedadora adecuada
  - b) cultivar la célula hospedadora según las reivindicaciones 5 y 6 en un medio adecuado, y,
  - 20 c) purificar el polipéptido según las reivindicaciones 1 y 2.
9. Uso del polinucleótido según las reivindicaciones 3 y 4 para la obtención del polipéptido según las reivindicaciones 1 y 2.
10. Uso de la célula hospedadora según las reivindicaciones 5 y 6 para la obtención del polipéptido según las reivindicaciones 1 y 2.

11. Polipéptido según la reivindicación 1 y 2 caracterizado por que está unido a una etiqueta de marcaje.

12. Uso del polipéptido según la reivindicación 11 en técnicas de marcaje bacteriano.

5 13. Uso del polipéptido según la reivindicación 12 caracterizado por que está unido a una partícula de aislamiento útil para la concentración de la población bacteriana de una muestra.

14. Enzima quimérica caracterizada por que, al menos, comprende los siguientes polipéptidos:

- 10 a) un módulo catalítico N-terminal procedente de un fago bacteriano,  
b) un módulo de unión pared C-terminal según las reivindicaciones 1 y 2.

15. Enzima quimérica según la reivindicación 14 caracterizado por que su secuencia se corresponde con alguna de las siguientes SEQ ID NO 17, SEQ ID NO 19, SEQ ID NO 23, SEQ ID NO 25.

16. Polinucleótido caracterizado por que codifica una enzima quimérica según las 15 reivindicaciones 14 y 15.

17. Polinucleótido según la reivindicación 16 caracterizado por que su secuencia se corresponde con alguna de las siguientes SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 20, SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 26.

20 18. Vector caracterizado por que comprende, al menos, el polinucleótido según las reivindicaciones 16 y 17.

19. Célula hospedadora caracterizada por que comprende, al menos, el vector según la reivindicación 18.

20. Célula hospedadora según la reivindicación 19 caracterizada por ser *Escherichia coli*.

- 21.** Método de obtención de la enzima quimérica según las reivindicaciones 14 y 15 que comprende:
- a) introducir el vector según la reivindicación 18 en una célula hospedadora adecuada
  - 5 b) cultivar la célula hospedadora según las reivindicaciones 19 y 20 en un medio adecuado, y,
  - c) purificar la enzima quimérica según las reivindicaciones 14 y 15.
- 22.** Uso del polinucleótido según las reivindicaciones 16 y 17 para la obtención de la enzima quimérica según las reivindicaciones 14 y 15.
- 10 **23.** Uso de la célula hospedadora según las reivindicaciones 19 y 20 para la obtención de la enzima quimérica según las reivindicaciones 14 y 15.
- 24.** Uso de la enzima quimérica según las reivindicaciones 14 y 15 en la elaboración de una composición farmacéutica útil para el tratamiento de una infección bacteriana o como antiséptico.
- 15 **25.** Composición farmacéutica útil para el tratamiento de enfermedades infecciosas o como antiséptico caracterizada por que comprende al menos una enzima quimérica según las reivindicaciones 14 y 15.
- 26.** Composición farmacéutica según la reivindicación 25 caracterizada por que la secuencia de la enzima quimérica se corresponde con alguna de las siguientes: SEQ ID NO  
20 17, SEQ ID NO 19, SEQ ID NO 23, SEQ ID NO 25.
- 27.** Composición farmacéutica según la reivindicación 25 caracterizada por que contiene además un adyuvante y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 28.** Composición farmacéutica según las reivindicaciones 25 a 27 caracterizada por que contiene además otro principio activo.

FIGURAS

FIG. 1A

Esquemas de las enzimas silvestres

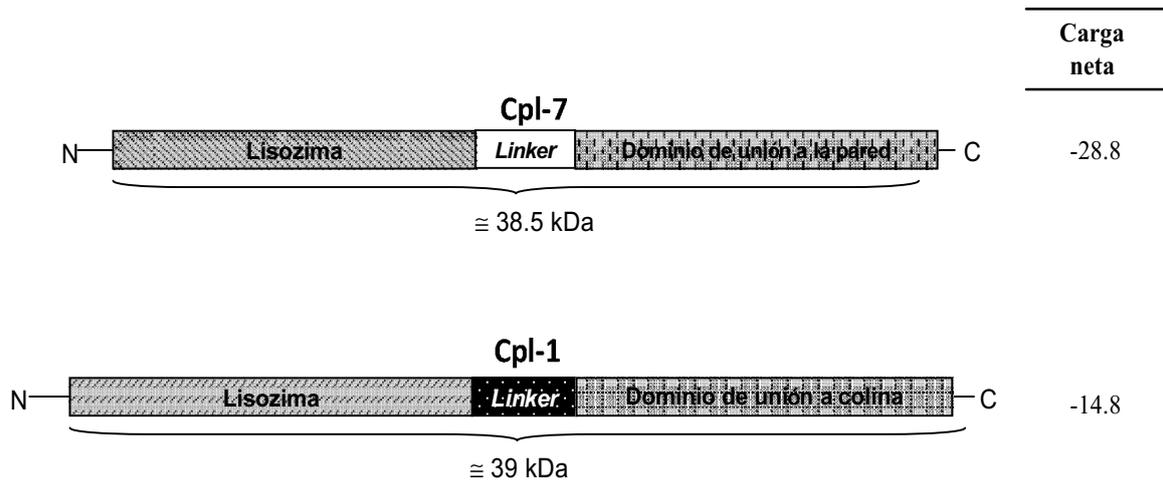


FIG. 1B

**Esquema de lisozimas modificadas y quimeras**

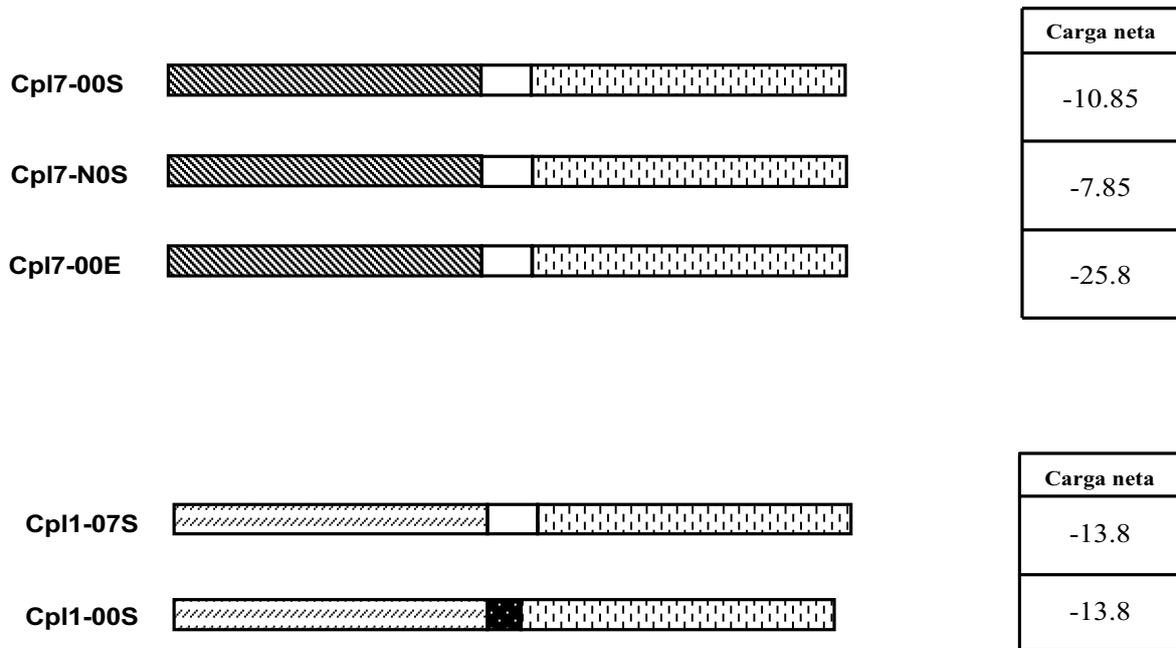
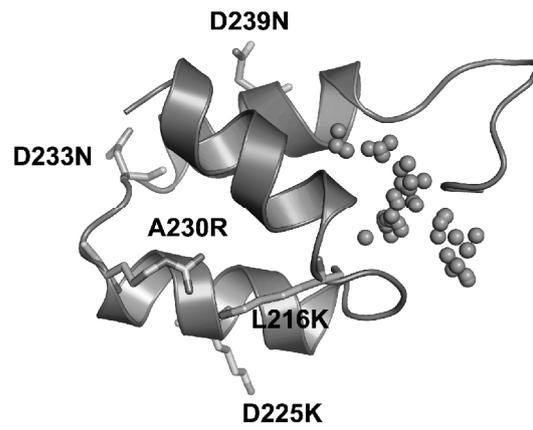


FIG. 2

**A**

LTTVANEVIQGLWGNQERYDSLANAGYDPOAVQDKVNEILN AREIAD  
K K R N N



**B**

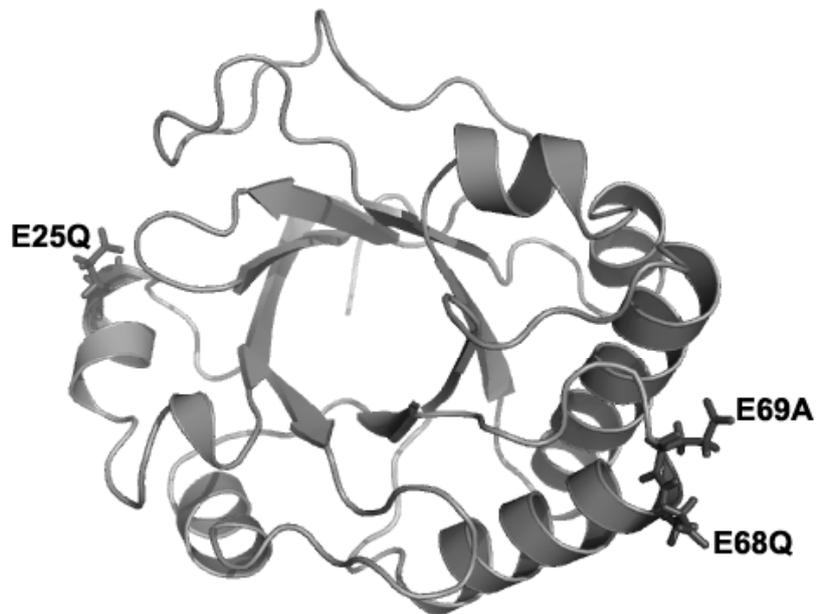
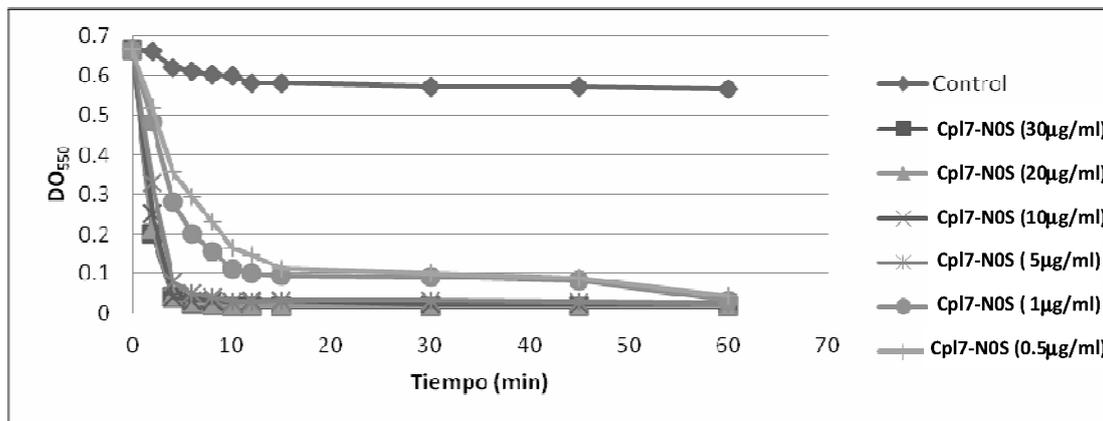
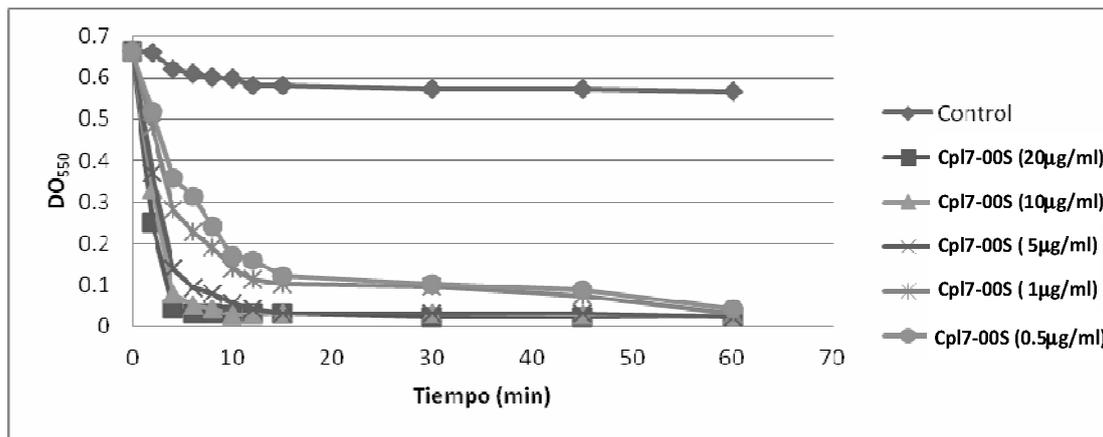
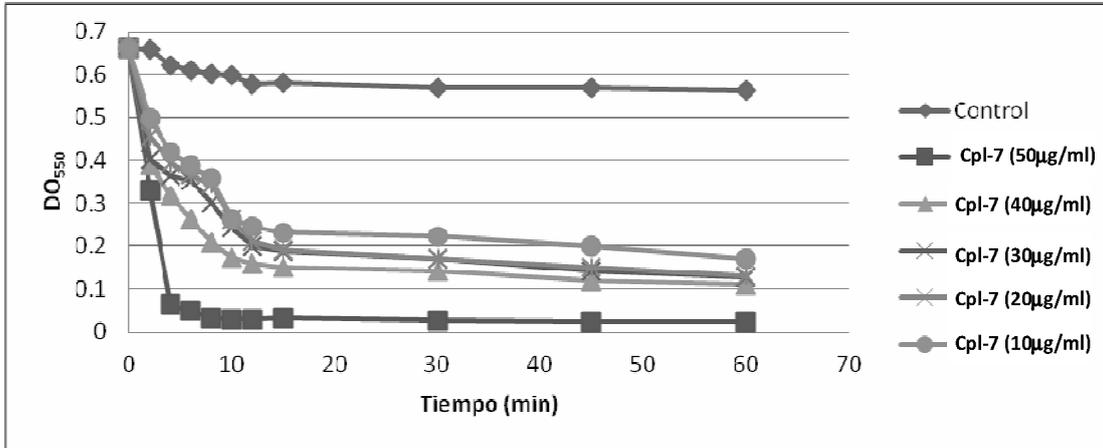
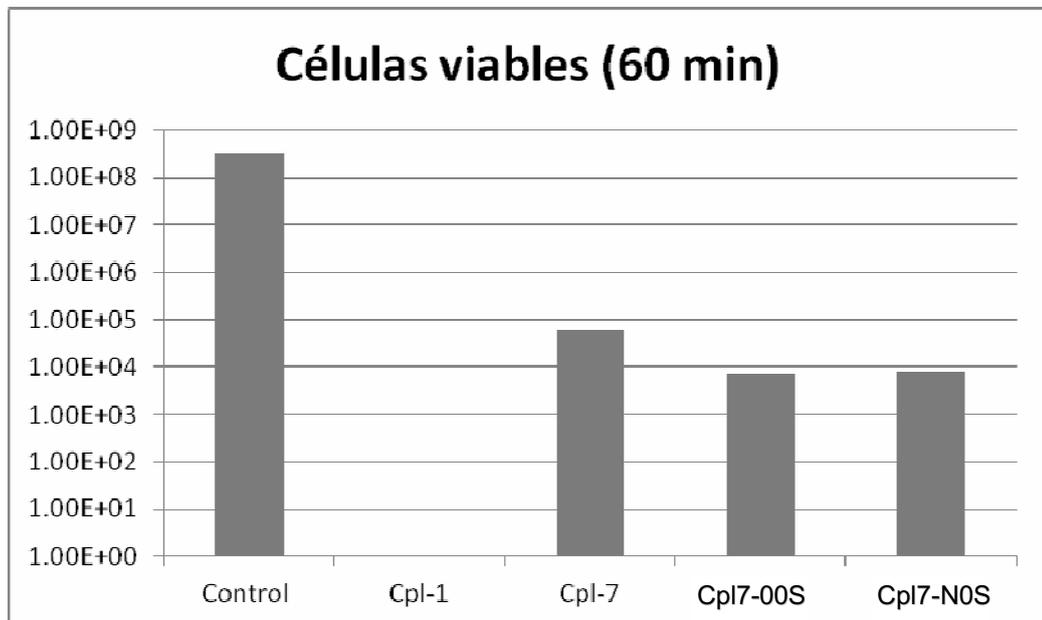
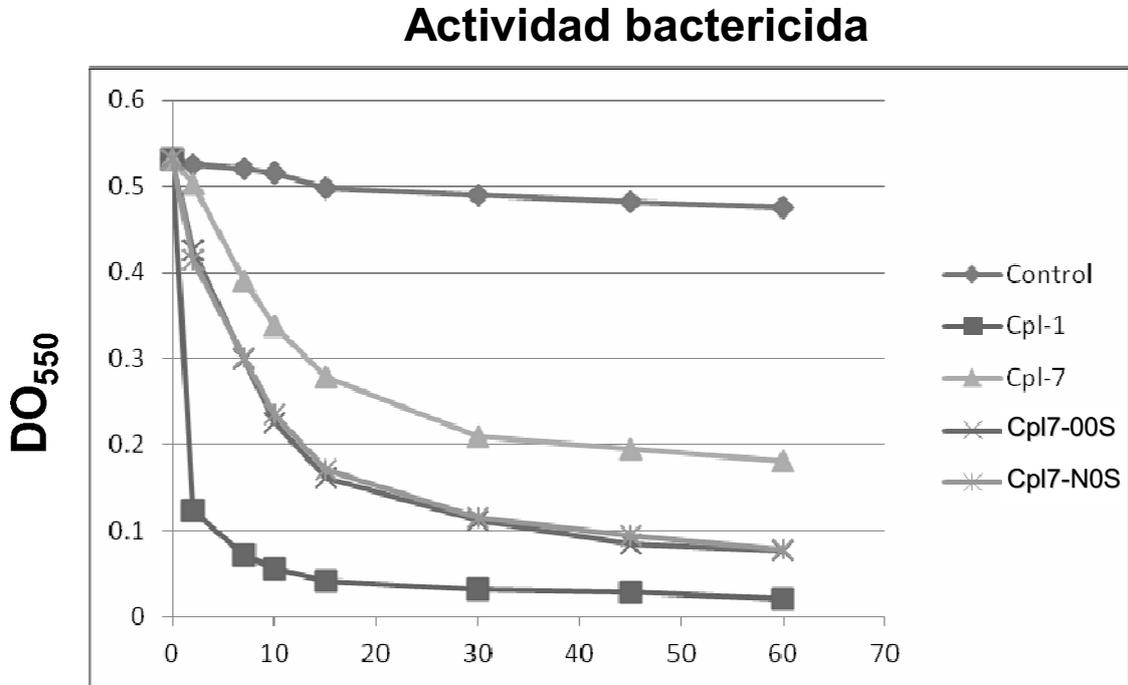


FIG. 3



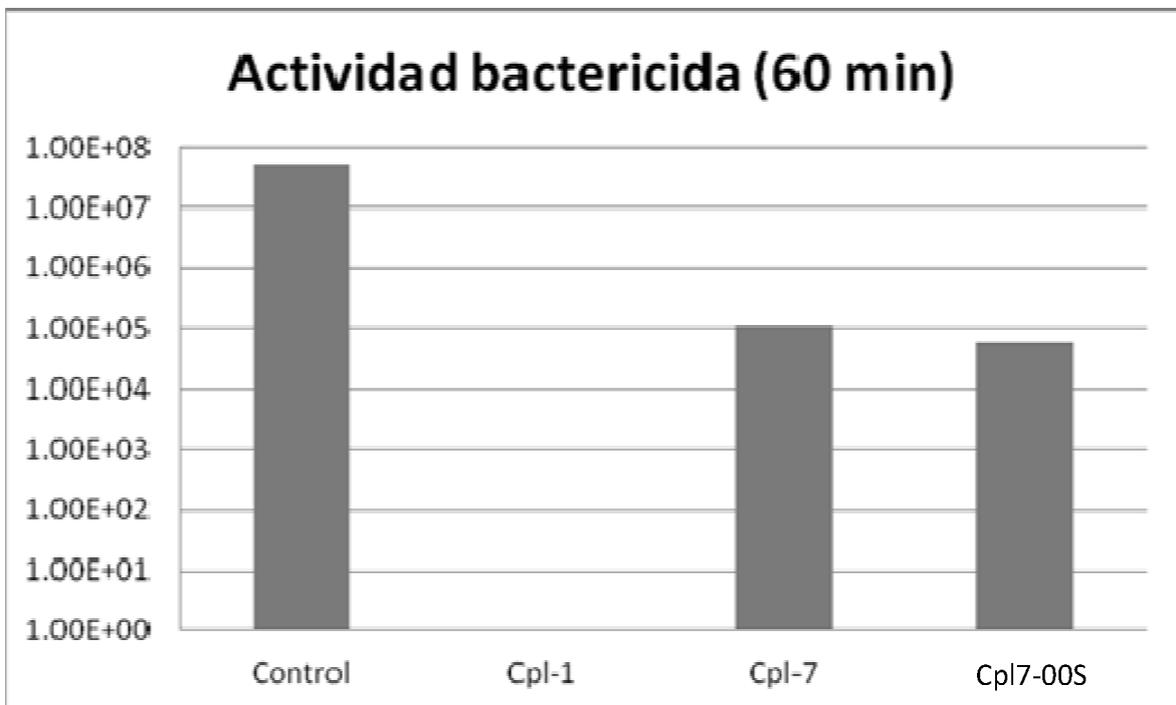
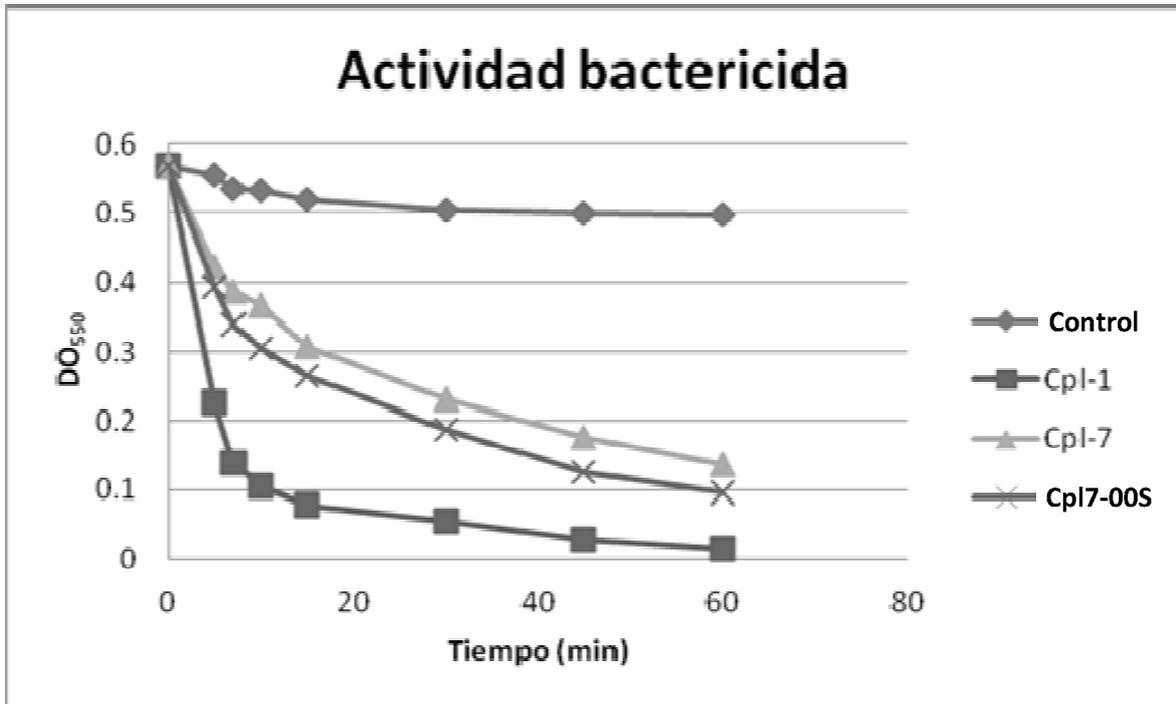
*S. pneumoniae* R6

FIG. 4.



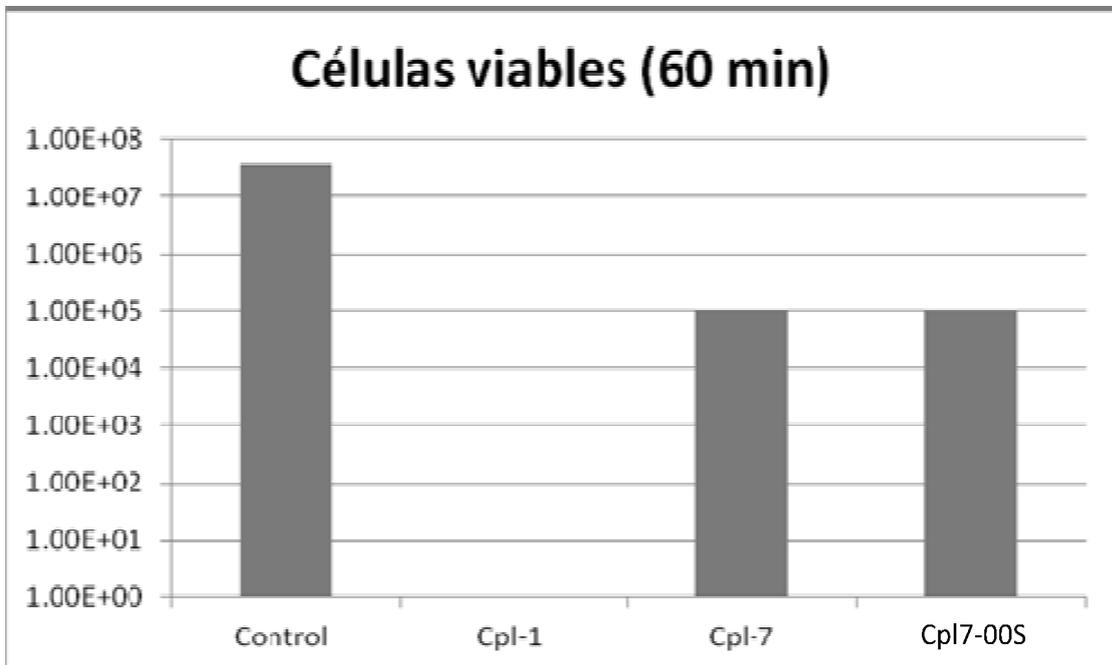
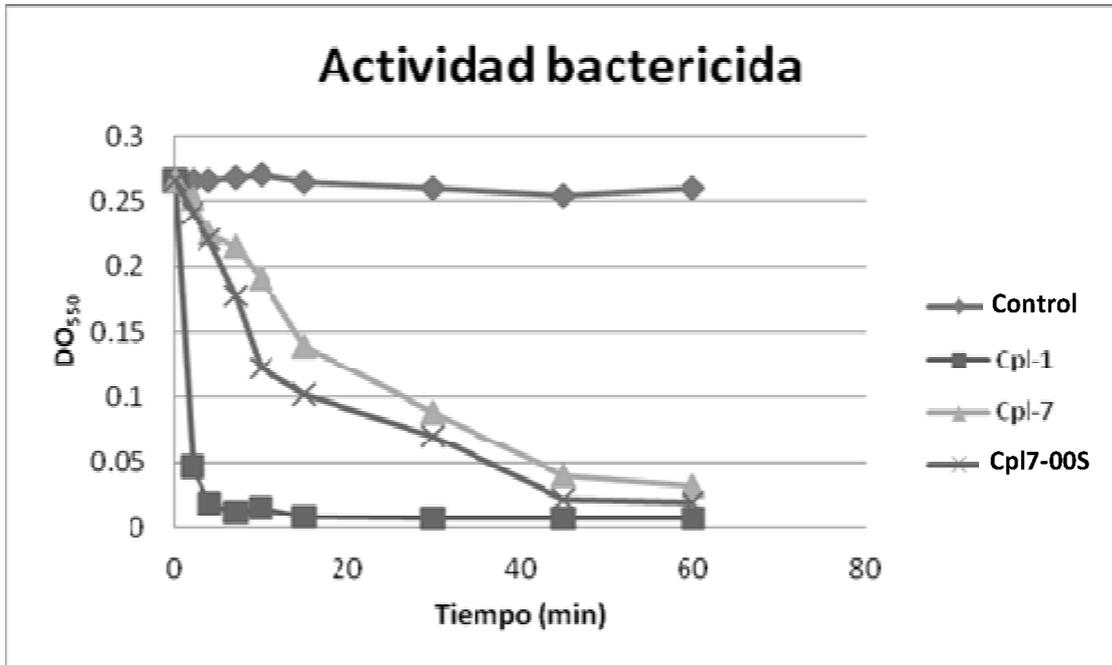
*S. pneumoniae* R6

FIG. 5.



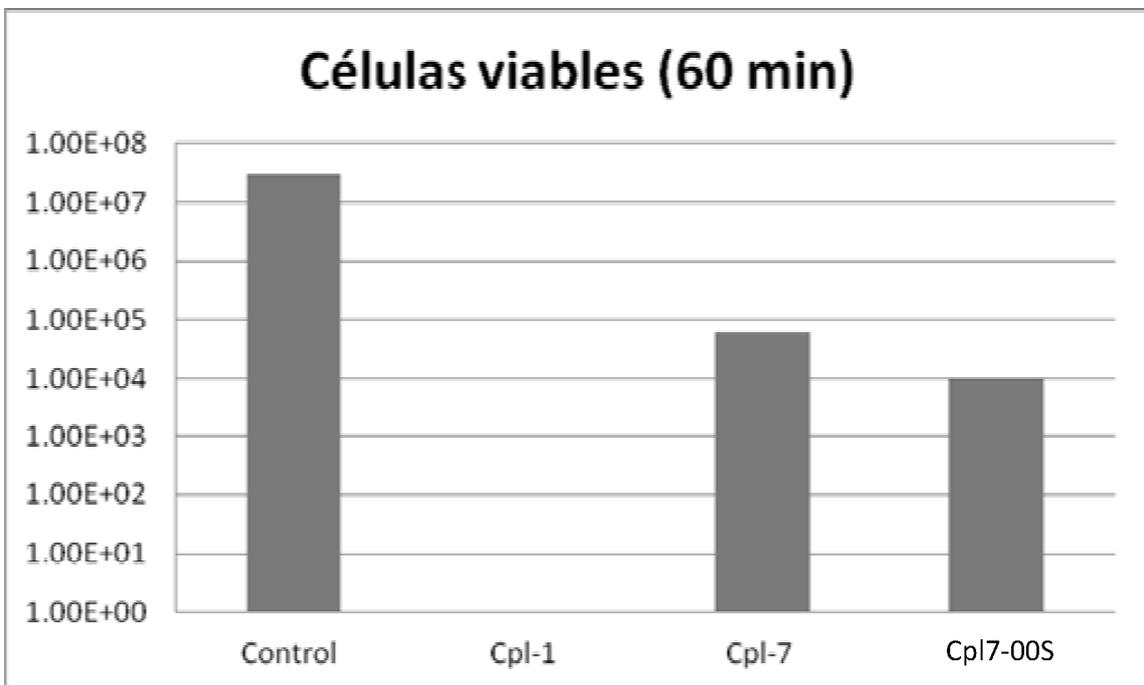
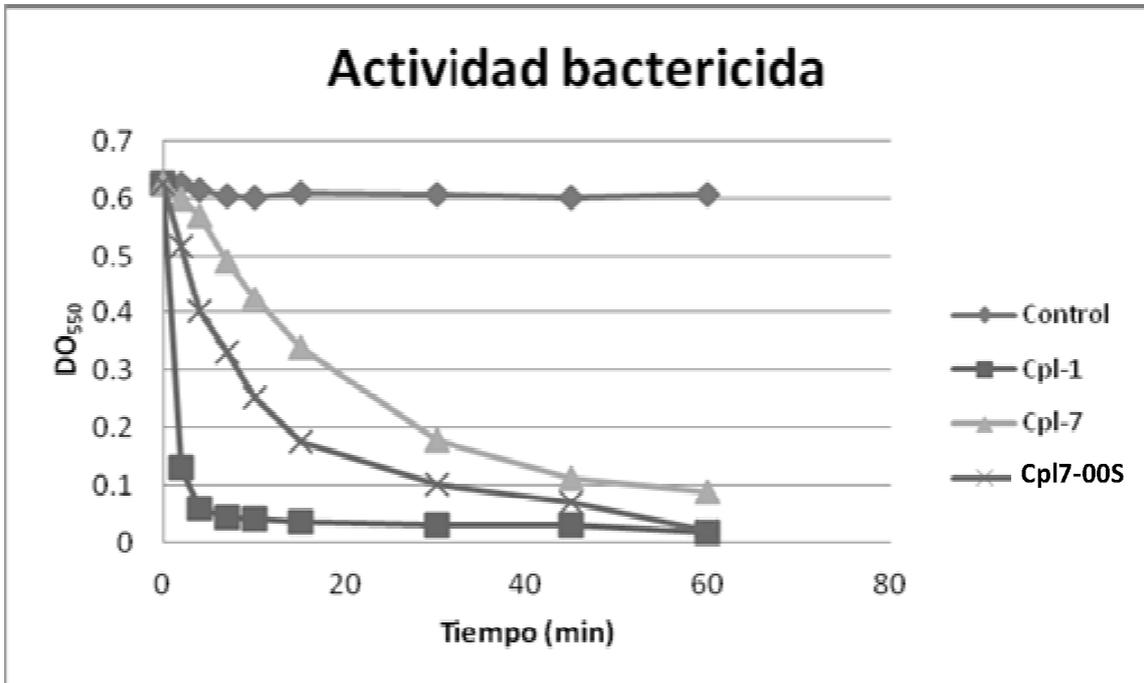
*S. pneumoniae* D39

FIG. 6



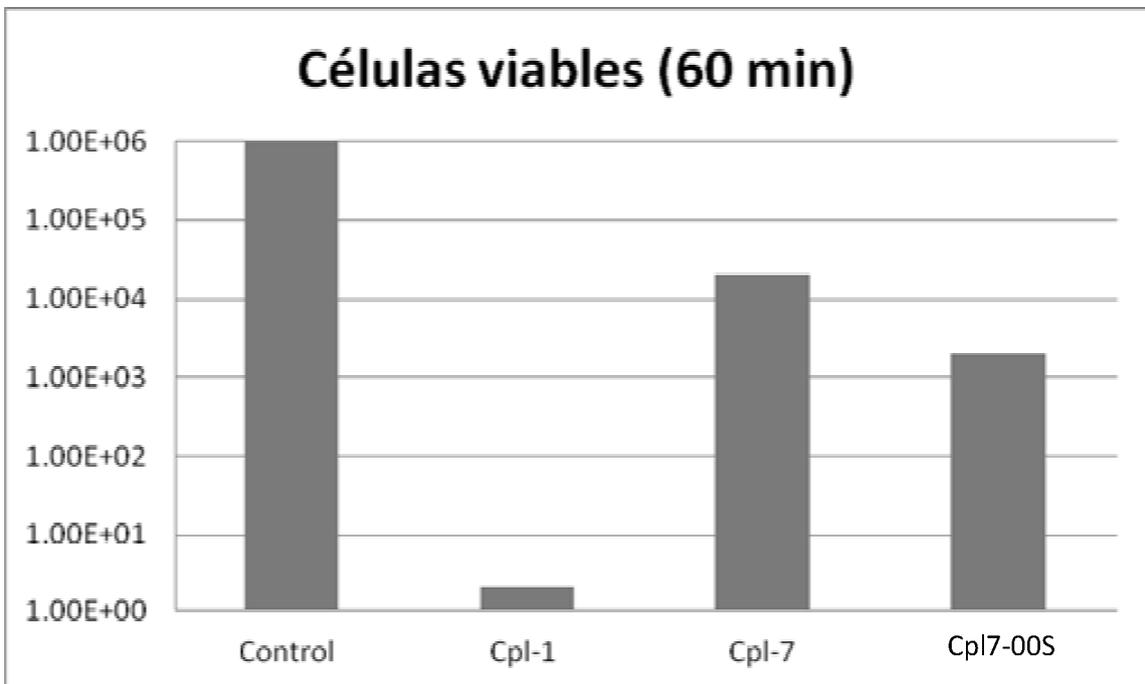
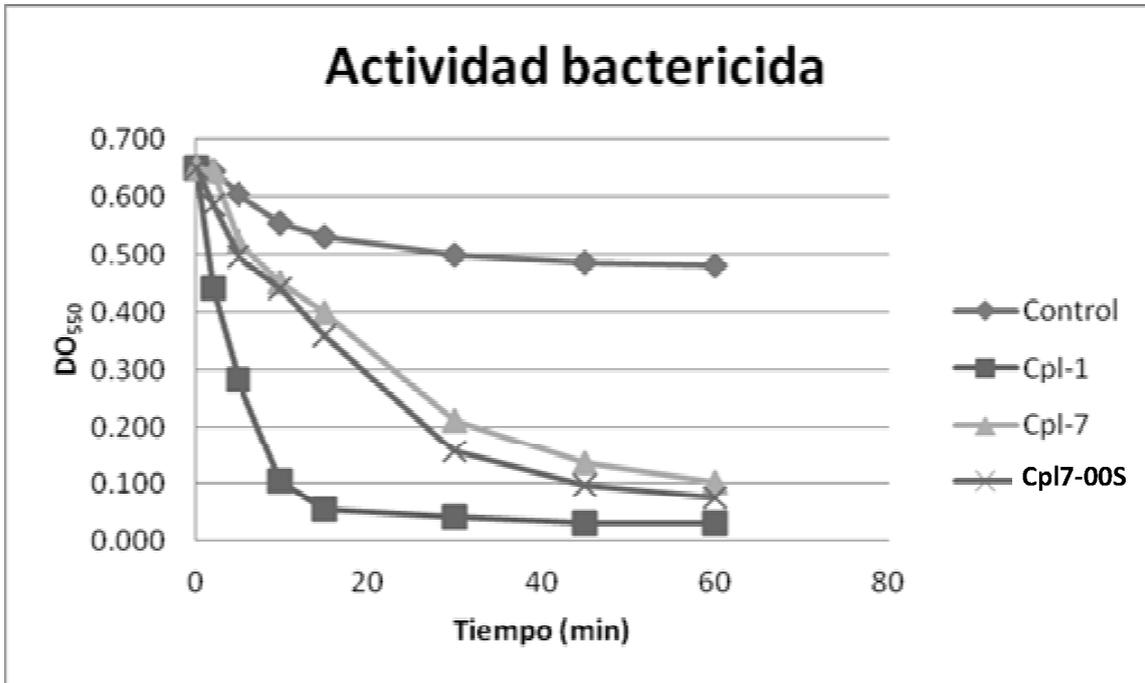
*S. pneumoniae* P007

FIG. 7



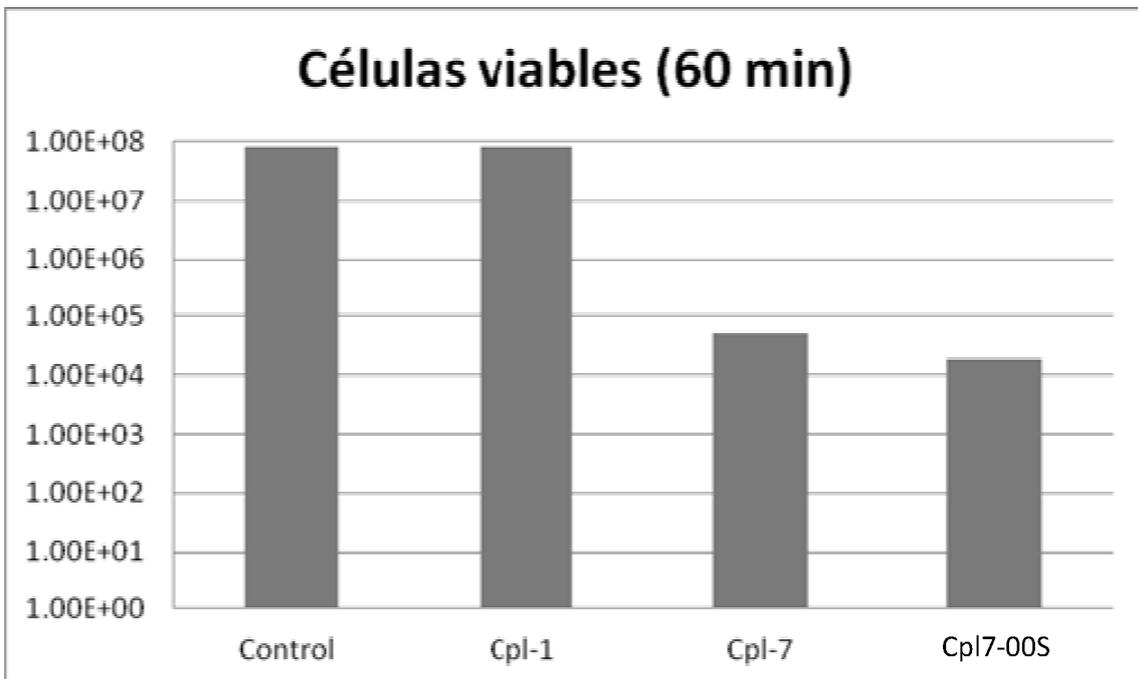
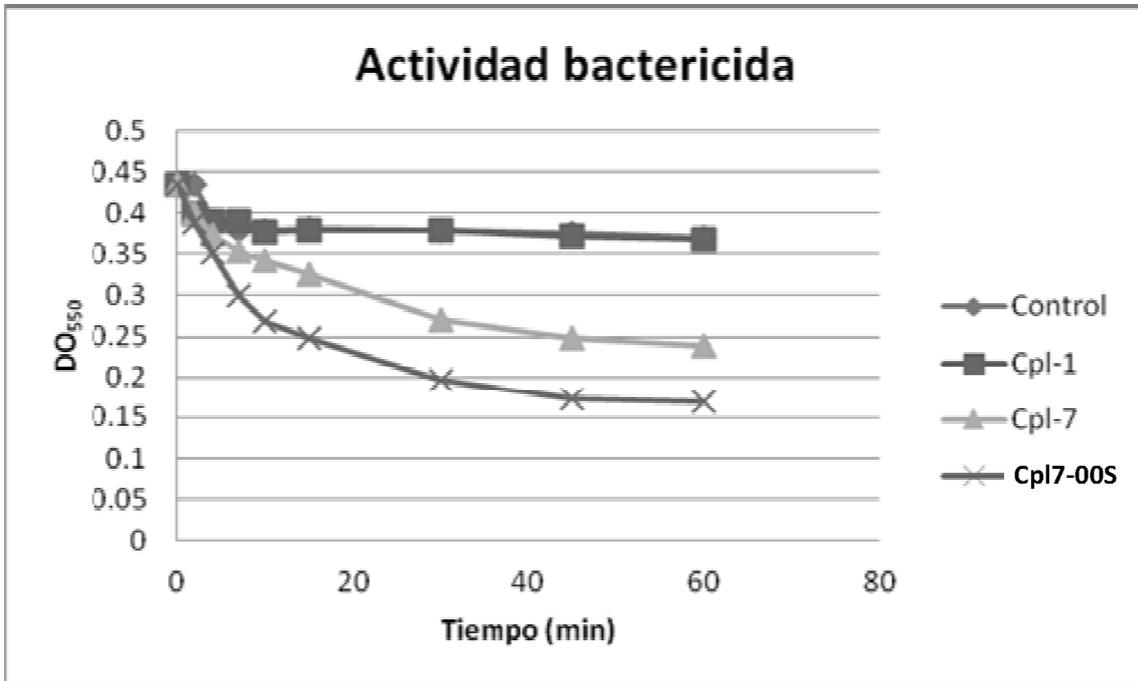
*S. pneumoniae* P008

FIG. 8



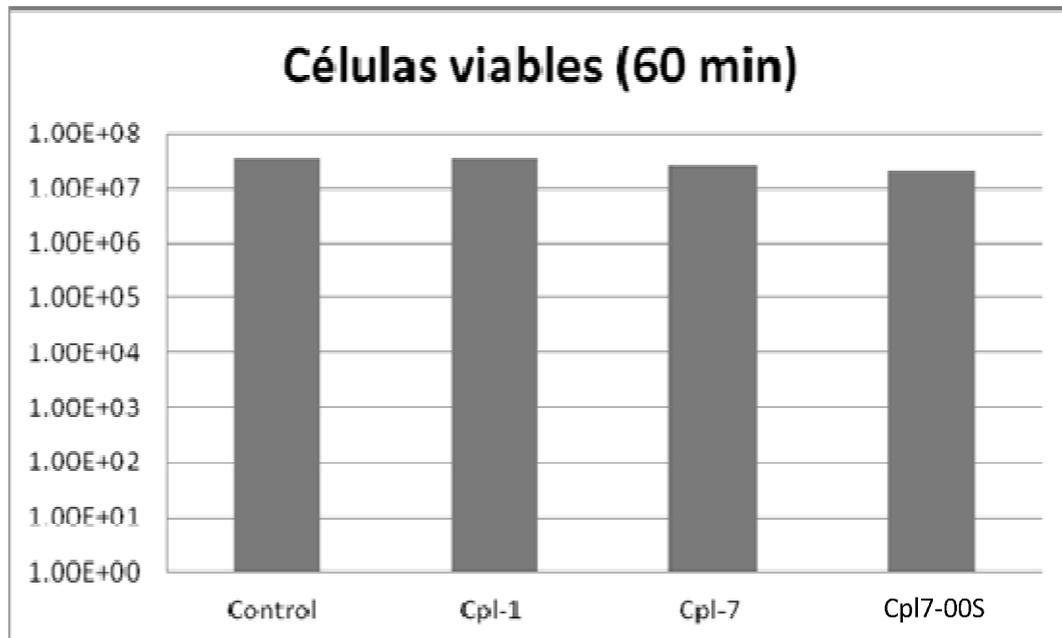
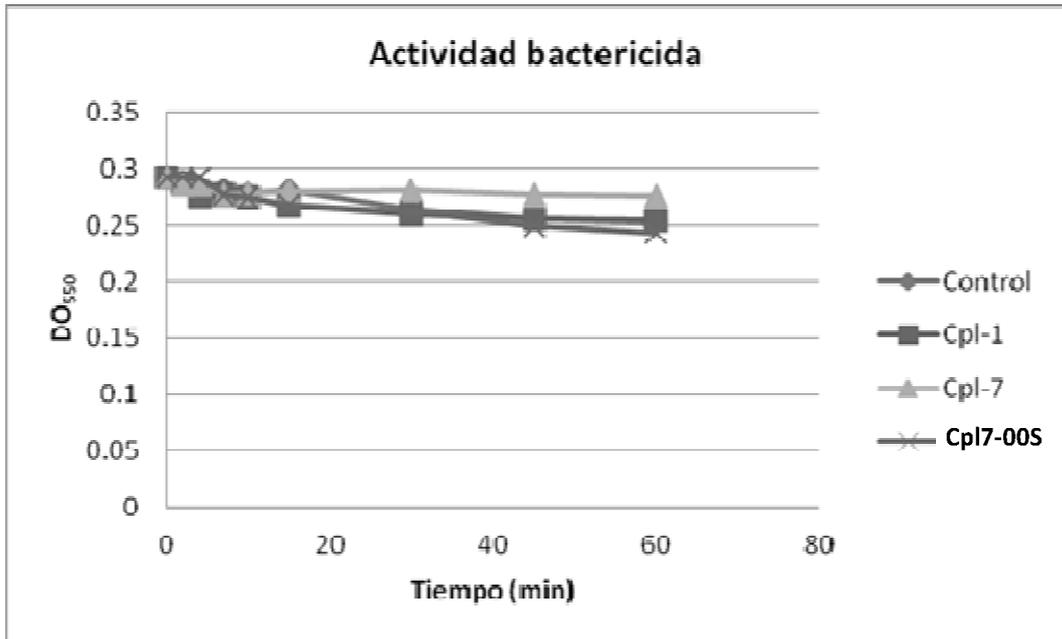
*S. pneumoniae* D48

FIG. 9



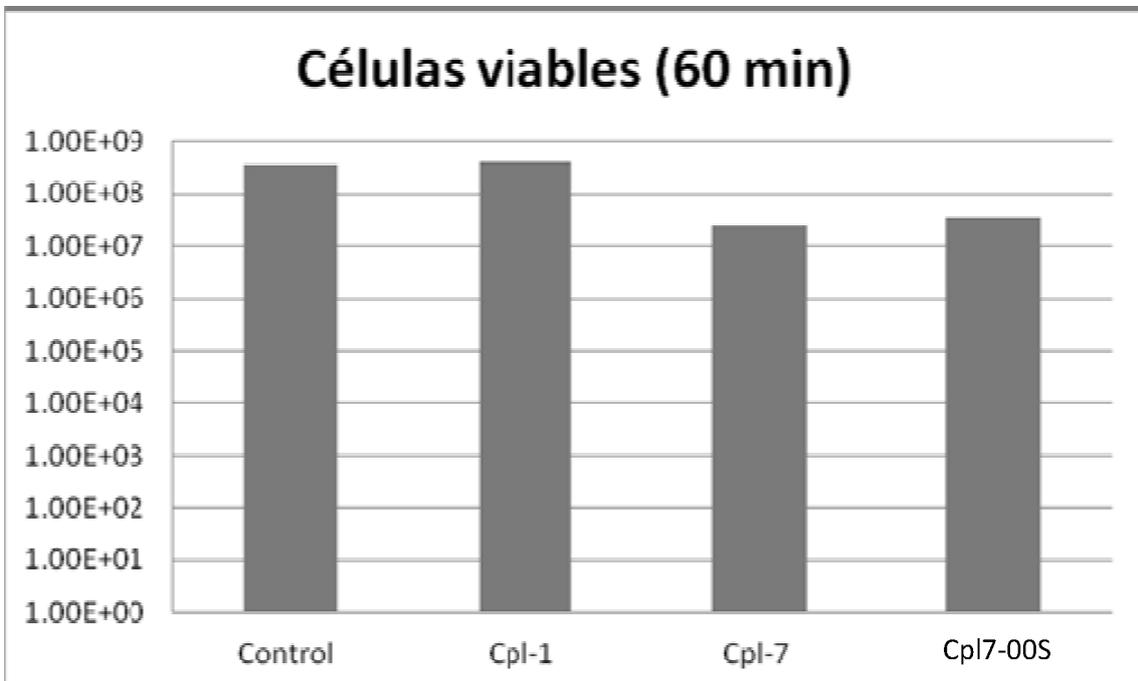
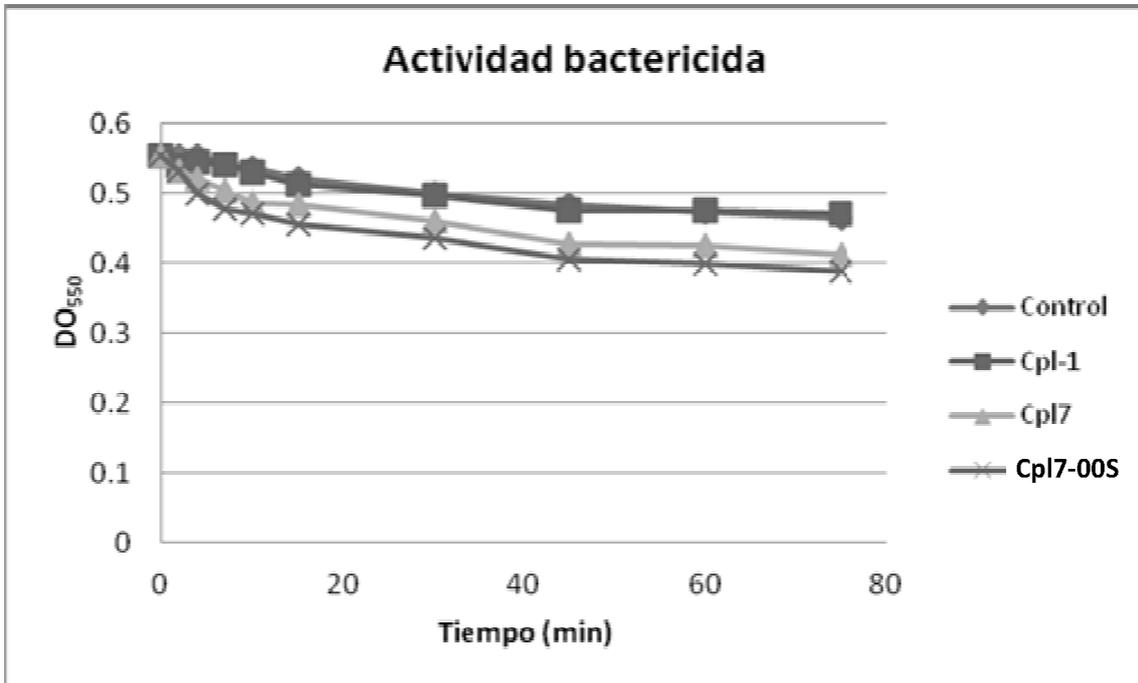
*S. pyogenes*

FIG. 10



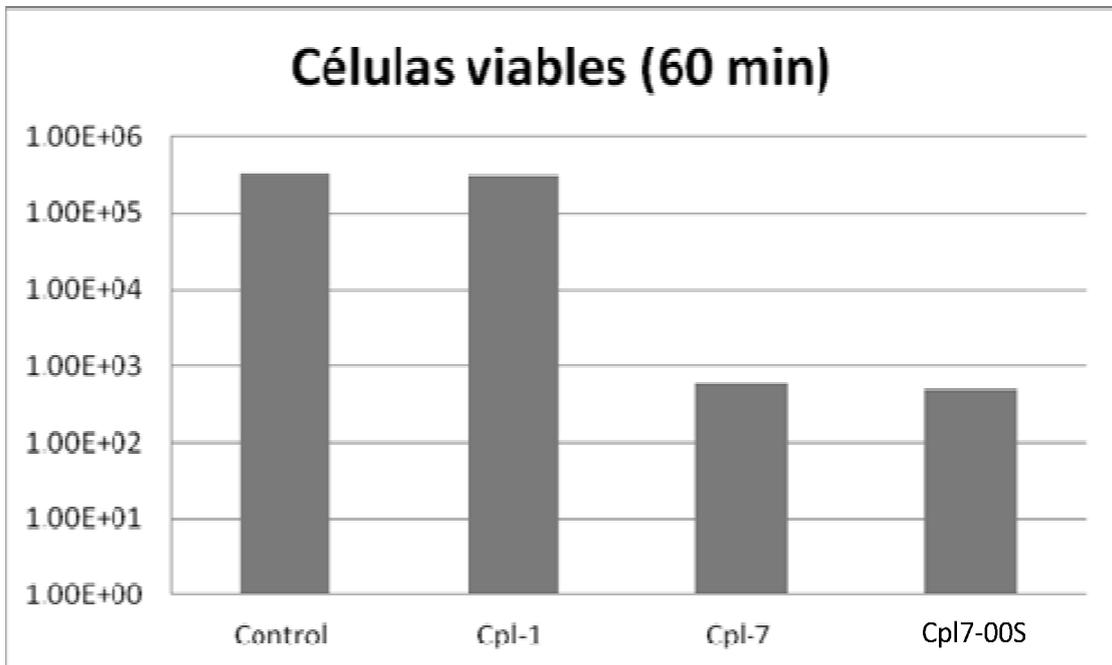
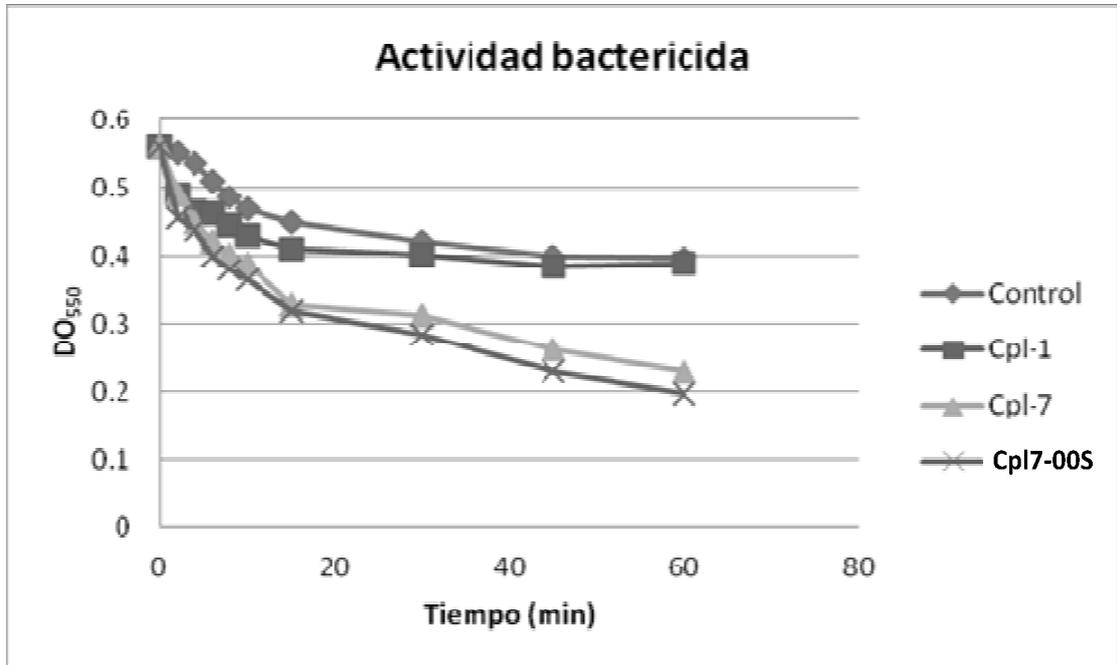
***S. aureus***

FIG. 11



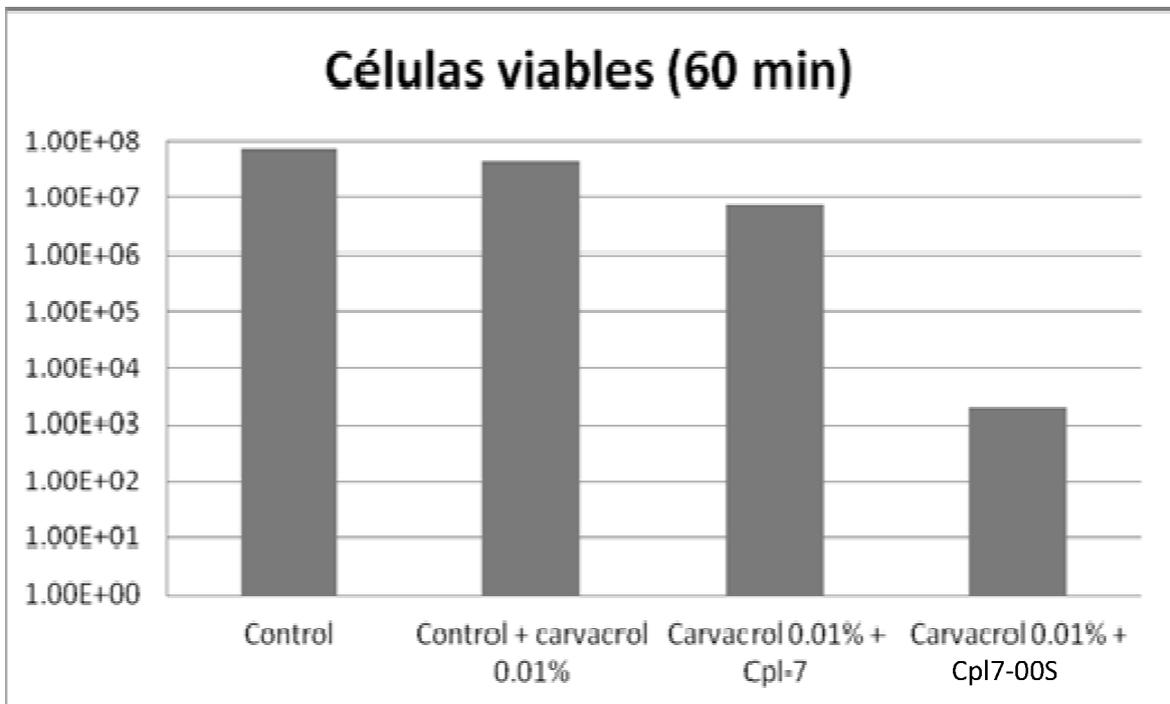
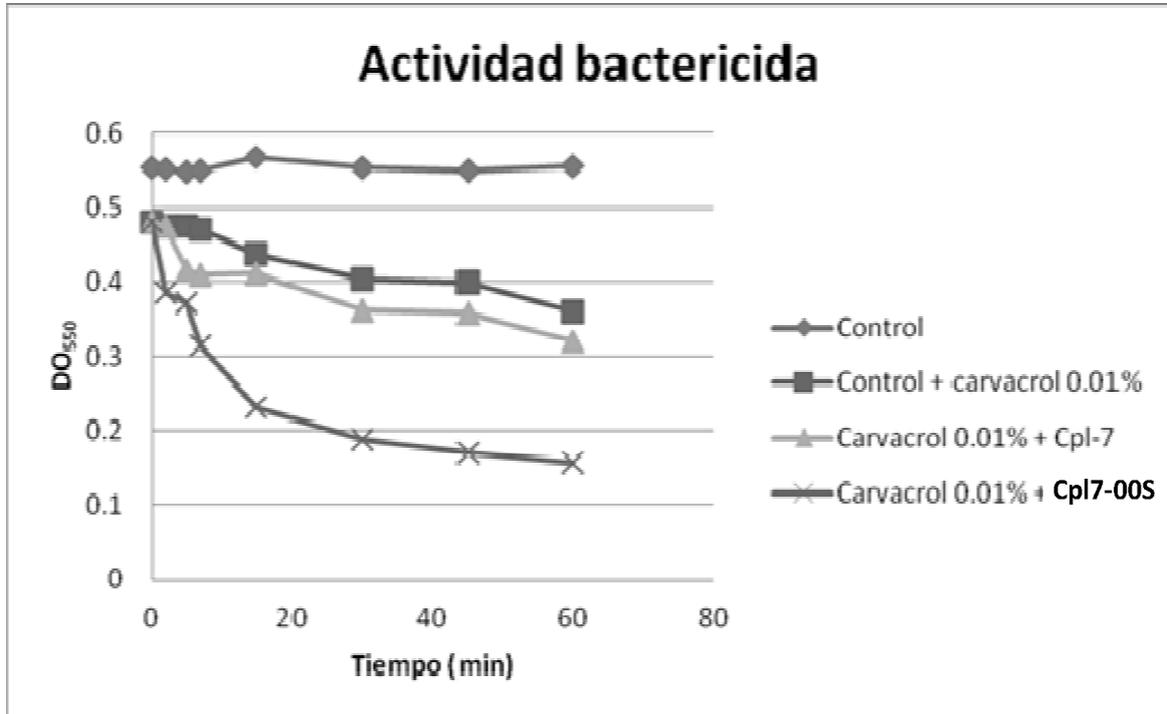
*S. iniae*

FIG. 12



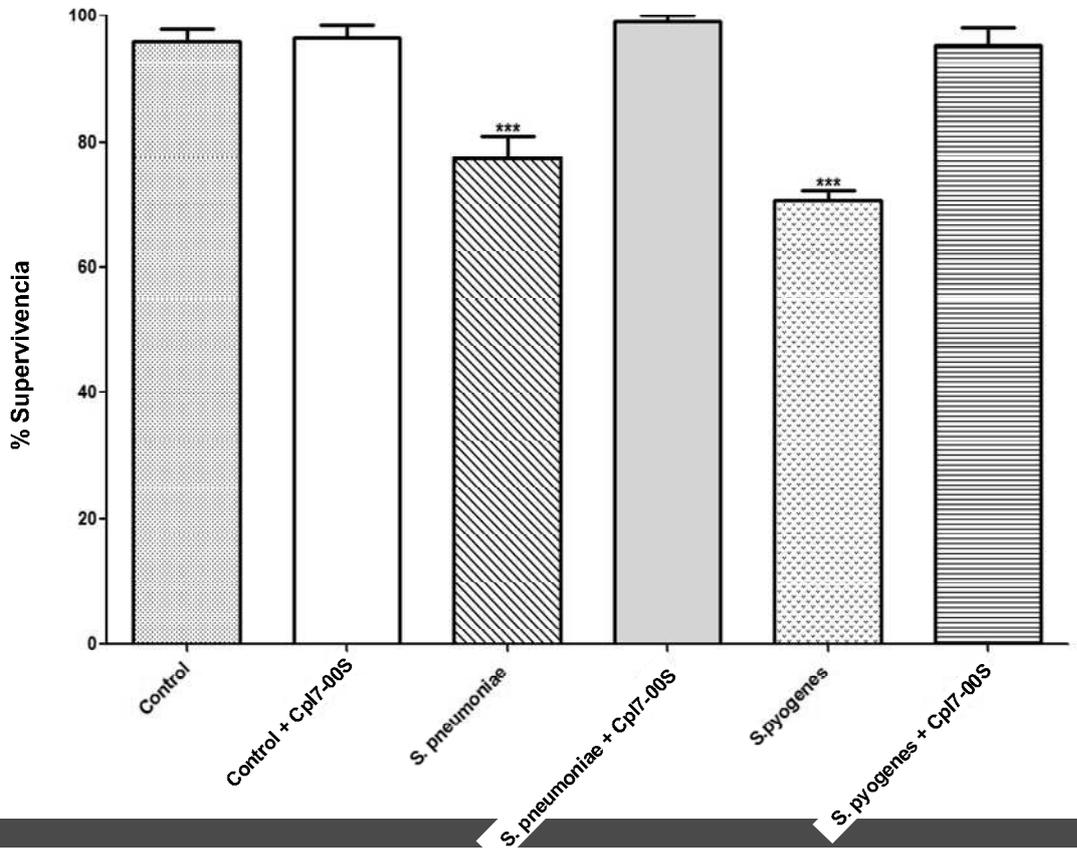
*S. mitis* SK598

FIG. 13



**E. coli DH10B**

FIG. 14



Šā ca[ Ā^Ā^&^} &ā Ā

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
CIBER Enfermedades Respiratorias

<120> ENZIBIÓTICOS BACTERICIDAS MEJORADOS FRENTE A NEUMOCOCO Y OTRAS BACTERIAS

<130> 2013-0312

<160> 26

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 342

<212> PRT

<213> Cp-7

<220>

<223> Native Sequence

<400> 1

```

Met Val Lys Lys Asn Asp Leu Phe Val Asp Val Ala Ser His Gln Gly
1      5      10     15
Tyr Asp Ile Ser Gly Ile Leu Glu Glu Ala Gly Thr Thr Asn Thr Ile
20     25     30
Ile Lys Val Ser Glu Ser Thr Ser Tyr Leu Asn Pro Cys Leu Ser Ala
35     40     45
Gln Val Ser Gln Ser Asn Pro Ile Gly Phe Tyr His Phe Ala Trp Phe
50     55     60
Gly Gly Asn Glu Glu Glu Ala Glu Ala Glu Ala Arg Tyr Phe Leu Asp
65     70     75     80
Asn Val Pro Thr Gln Val Lys Tyr Leu Val Leu Asp Tyr Glu Asp His
85     90     95
Ala Ser Ala Ser Val Gln Arg Asn Thr Thr Ala Cys Leu Arg Phe Met
100    105
Gln Ile Ile Ala Glu Ala Gly Tyr Thr Pro Ile Tyr Tyr Ser Tyr Lys
115    120    125
Pro Phe Thr Leu Asp Asn Val Asp Tyr Gln Gln Ile Leu Ala Gln Phe
130    135    140
Pro Asn Ser Leu Trp Ile Ala Gly Tyr Gly Leu Asn Asp Gly Thr Ala
145    150    155
Asn Phe Glu Tyr Phe Pro Ser Met Asp Gly Ile Arg Trp Trp Gln Tyr
165    170    175
Ser Ser Asn Pro Phe Asp Lys Asn Ile Val Leu Leu Asp Asp Glu Lys
180    185    190
Glu Asp Asn Ile Asn Asn Glu Asn Thr Leu Lys Ser Leu Thr Thr Val
195    200    205
Ala Asn Glu Val Ile Gln Gly Leu Trp Gly Asn Gly Gln Glu Arg Tyr
210    215    220
Asp Ser Leu Ala Asn Ala Gly Tyr Asp Pro Gln Ala Val Gln Asp Lys
225    230    235
Val Asn Glu Ile Leu Asn Ala Arg Glu Ile Ala Asp Leu Thr Thr Val
245    250    255
Ala Asn Glu Val Ile Gln Gly Leu Trp Gly Asn Gly Gln Glu Arg Tyr
260    265    270
Asp Ser Leu Ala Asn Ala Gly Tyr Asp Pro Gln Ala Val Gln Asp Lys
275    280    285
Val Asn Glu Ile Leu Asn Ala Arg Glu Ile Ala Asp Leu Thr Thr Val
290    295    300
Ala Asn Glu Val Ile Gln Gly Leu Trp Gly Asn Gly Gln Glu Arg Tyr
305    310    315
Asp Ser Leu Ala Asn Ala Gly Tyr Asp Pro Gln Ala Val Gln Asp Lys
325    330    335
Val Asn Glu Leu Leu Ser
340

```

<210> 2

<211> 1029

ES 2 525 954 A2

<212> DNA  
 <213> Cp-7

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..1029  
 <223> /mol\_type="unassigned DNA"  
 /organism="Cp-7"

```

<400> 2
atggttaaga aaaatgattt atttgtagac gttgcaagcc atcaaggcta cgacatttca      60
ggaatttttag aagaagcagg gacaacaaac acaattatta aagtgtcaga aagtacaagc      120
tatttaaacc cttgcttgtc tgctcaagtg agccagtcaa atcctatcgg gttttatcat      180
tttgcttggt ttggtggaaa tgaagaagaa gcagaagcag aagcacgcta tttccttgat      240
aacgtgccta cacaagttaa ataccttgta ctagattatg aagaccatgc aagcgcaagc      300
gtacaaagaa acactaccgc gtgcttacgc tttatgcaaa ttatcgcaga agctggatat      360
acacctattht attatagtta caaacctgtt acgcttgata atgtggacta tcagcagatt      420
ttagcacagt tccctaattc tctatggatt gcaggctatg gcttaaatga tggtagcagct      480
aactttgaat actttccaag catggacggt atcagatggt ggcaatattc tagtaaccgg      540
tttgacaaga atattgtact gttagatgat gagaaagaag ataataaaa caatgaaaac      600
actctaaaaa gccttaccac agtagccaac gaggtcattc aggactttg gggcaacggt      660
caagaacggt atgacagttt agcgaatgca gggtatgacc cccaagcggg tcaagacaaa      720
gtgaatgaaa tcttaaacgc tagagaaatt gcagacctta ccacagtagc caacgaggtc      780
attcagggac tttggggcaa cgggtcaagaa cgttatgaca gtttagcgaa tgcagggtat      840
gaccccccaag cggttcaaga caaagtgaat gaaatcttaa acgctagaga aattgcagac      900
cttaccacag tagccaacga ggtcattcag ggactttggg gcaacgggtca agaacgttat      960
gacagtttag cgaatgcagg gtatgacccc caagcgggtc aagacaaagt gaatgaatta     1020
ctttcataa                                     1029
  
```

<210> 3  
 <211> 188  
 <212> PRT  
 <213> Cp-7

<220>  
 <223> N-terminal domain Cp1-7

```

<400> 3
Met Val Lys Lys Asn Asp Leu Phe Val Asp Val Ala Ser His Gln Gly
1      5      10      15
Tyr Asp Ile Ser Gly Ile Leu Glu Glu Ala Gly Thr Thr Asn Thr Ile
20     25     30
Ile Lys Val Ser Glu Ser Thr Ser Tyr Leu Asn Pro Cys Leu Ser Ala
35     40     45
Gln Val Ser Gln Ser Asn Pro Ile Gly Phe Tyr His Phe Ala Trp Phe
50     55     60
Gly Gly Asn Glu Glu Glu Ala Glu Ala Glu Ala Arg Tyr Phe Leu Asp
65     70     75     80
Asn Val Pro Thr Gln Val Lys Tyr Leu Val Leu Asp Tyr Glu Asp His
85     90     95
Ala Ser Ala Ser Val Gln Arg Asn Thr Thr Ala Cys Leu Arg Phe Met
100    105    110
  
```

ES 2 525 954 A2

Gln Ile Ile Ala Glu Ala Gly Tyr Thr Pro Ile Tyr Tyr Ser Tyr Lys  
 115 120 125  
 Pro Phe Thr Leu Asp Asn Val Asp Tyr Gln Gln Ile Leu Ala Gln Phe  
 130 135 140  
 Pro Asn Ser Leu Trp Ile Ala Gly Tyr Gly Leu Asn Asp Gly Thr Ala  
 145 150 155 160  
 Asn Phe Glu Tyr Phe Pro Ser Met Asp Gly Ile Arg Trp Trp Gln Tyr  
 165 170 175  
 Ser Ser Asn Pro Phe Asp Lys Asn Ile Val Leu Leu  
 180 185

<210> 4  
 <211> 564  
 <212> DNA  
 <213> Cp-7

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..564  
 <223> /mol\_type="unassigned DNA"  
 /note="N-terminal domain Cp1-7"  
 /organism="Cp-7"

<400> 4  
 atgggtaaga aaaatgattt atttgtagac gttgcaagcc atcaaggcta cgacatttca 60  
 ggaatttttag aagaagcagg gacaacaaac acaattatta aagtgtcaga aagtacaagc 120  
 tatttaaacc cttgcttgtc tgctcaagtg agccagtcaa atcctatcgg gttttatcat 180  
 tttgcttggt ttggtggaaa tgaagaagaa gcagaagcag aagcacgcta tttccttgat 240  
 aacgtgccta cacaagttaa ataccttghta ctagattatg aagaccatgc aagcgcaagc 300  
 gtacaaagaa aactaccgc gtgcttacgc tttatgcaaa ttatcgcaga agctggatat 360  
 acacctattt attatagtta caaacggttt acgcttgata atgtggacta tcagcagatt 420  
 ttagcacagt tcctaattc tctatggatt gcaggctatg gcttaaata tggtacagct 480  
 aactttgaat actttccaag catggacggt atcagatggt ggcaatattc tagtaaccg 540  
 tttgacaaga atattgtact gtta 564

<210> 5  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Cp-7

<220>  
 <223> Linker Cp1-7

<400> 5  
 Asp Asp Glu Lys Glu Asp Asn Ile Asn Asn Glu Asn Thr Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

<210> 6  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Cp-7

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..45  
 <223> /mol\_type="unassigned DNA"  
 /note="Linker Cp1-7"  
 /organism="Cp-7"

ES 2 525 954 A2

<400> 6  
 gatgatgaga aagaagataa tataaacaat gaaaacactc taaaa

45

<210> 7  
 <211> 138  
 <212> PRT  
 <213> Cp-7

<220>  
 <223> C-Terminal domain

<400> 7  
 Leu Thr Thr Val Ala Asn Glu Val Ile Gln Gly Leu Trp Gly Asn Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Glu Arg Tyr Asp Ser Leu Ala Asn Ala Gly Tyr Asp Pro Gln Ala  
 20 25 30  
 Val Gln Asp Lys Val Asn Glu Ile Leu Asn Ala Arg Glu Ile Ala Asp  
 35 40 45  
 Leu Thr Thr Val Ala Asn Glu Val Ile Gln Gly Leu Trp Gly Asn Gly  
 50 55 60  
 Gln Glu Arg Tyr Asp Ser Leu Ala Asn Ala Gly Tyr Asp Pro Gln Ala  
 65 70 75 80  
 Val Gln Asp Lys Val Asn Glu Ile Leu Asn Ala Arg Glu Ile Ala Asp  
 85 90 95  
 Leu Thr Thr Val Ala Asn Glu Val Ile Gln Gly Leu Trp Gly Asn Gly  
 100 105 110  
 Gln Glu Arg Tyr Asp Ser Leu Ala Asn Ala Gly Tyr Asp Pro Gln Ala  
 115 120 125  
 Val Gln Asp Lys Val Asn Glu Leu Leu Ser  
 130 135

<210> 8  
 <211> 420  
 <212> DNA  
 <213> Cp-7

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..420  
 <223> /mol\_type="unassigned DNA"  
 /note="C-terminal domain Cp1-7"  
 /organism="Cp-7"

<400> 8  
 agccttacca cagtagccaa cgaggtcatt cagggacttt ggggcaacgg tcaagaacgt 60  
 tatgacagtt tagcgaatgc agggatgac cccaagcgg ttcaagacaa agtgaatgaa 120  
 atcttaaacg ctagagaaat tgcagacctt accacagtag ccaacgaggt cattcagga 180  
 ctttggggca acgggtcaaga acgttatgac agtttagcga atgcagggta tgaccccaaa 240  
 gcggttcaag acaaagtcaa tgaaatctta aacgctagag aaattgcaga ccttaccaca 300  
 gtagccaacg aggtcattca gggactttgg ggcaacggtc aagaacgtta tgacagtta 360  
 gcgaatgcag ggtatgaccc ccaagcgggt caagacaaag tgaatgaatt actttcataa 420

<210> 9  
 <211> 188  
 <212> PRT  
 <213> Cp-7

<220>  
 <223> N-terminal domain Mutant 7N

<400> 9

ES 2 525 954 A2

Met Val Lys Lys Asn Asp Leu Phe Val Asp Val Ala Ser His Gln Gly  
 1 5 10  
 Tyr Asp Ile Ser Gly Ile Leu Glu Gln Ala Gly Thr Thr Asn Thr Ile  
 20 25 30  
 Ile Lys Val Ser Glu Ser Thr Ser Tyr Leu Asn Pro Cys Leu Ser Ala  
 35 40 45  
 Gln Val Ser Gln Ser Asn Pro Ile Gly Phe Tyr His Phe Ala Trp Phe  
 50 55 60  
 Gly Gly Asn Gln Ala Glu Ala Glu Ala Glu Ala Arg Tyr Phe Leu Asp  
 65 70 75 80  
 Asn Val Pro Thr Gln Val Lys Tyr Leu Val Leu Asp Tyr Glu Asp His  
 85 90 95  
 Ala Ser Ala Ser Val Gln Arg Asn Thr Thr Ala Cys Leu Arg Phe Met  
 100 105 110  
 Gln Ile Ile Ala Glu Ala Gly Tyr Thr Pro Ile Tyr Tyr Ser Tyr Lys  
 115 120 125  
 Pro Phe Thr Leu Asp Asn Val Asp Tyr Gln Gln Ile Leu Ala Gln Phe  
 130 135 140  
 Pro Asn Ser Leu Trp Ile Ala Gly Tyr Gly Leu Asn Asp Gly Thr Ala  
 145 150 155 160  
 Asn Phe Glu Tyr Phe Pro Ser Met Asp Gly Ile Arg Trp Trp Gln Tyr  
 165 170 175  
 Ser Ser Asn Pro Phe Asp Lys Asn Ile Val Leu Leu  
 180 185

<210> 10  
 <211> 564  
 <212> DNA  
 <213> Cp-7

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..564  
 <223> /mol\_type="unassigned DNA"  
 /note="N-terminal domain Mutant Cp1-7N"  
 /organism="Cp-7"

<400> 10  
 atggttaaaa agaacgacct gttcgttgac gttgcgtctc accagggtta cgacatctct 60  
 ggtatcctgg aacaggcggg taccaccaac accatcatca aagtttctga atctaccagc 120  
 tacctgaacc cgtgcctgtc tgcgcagggt tctcagtcta acccgatcgg tttctaccac 180  
 ttcgcgtggt tcggtggttaa ccaggcggaa gcggaagcgg aagcgcgtta cttcctggac 240  
 aacgttccga cccagggttaa atacctggtt ctggactacg aagaccacgc gtctgcgtct 300  
 gttcagcgtgta acaccaccgc gtgcctgcgt ttcattgcaga tcatcgcgga agcgggttac 360  
 accccgatct actactctta caaacggttc accctggaca acgttgacta ccagcagatc 420  
 ctggcgcagt tcccgaactc tctgtggatc gcgggttacg gtctgaacga cggatccgcg 480  
 aacttgaat acttcccgtc tatggacggt atccggtggt ggcagtactc ttctaaccgc 540  
 ttcgacaaaa acatcgttct gctg 564

<210> 11  
 <211> 138  
 <212> PRT  
 <213> Cp-7

<220>  
 <223> C-terminal domain Mutant Cp1-7S

<400> 11  
 Leu Thr Thr Val Ala Asn Glu Val Ile Gln Gly Lys Trp Gly Asn Gly  
 1 5 10 15

ES 2 525 954 A2

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

<210> 12  
 <211> 415  
 <212> DNA  
 <213> Cp-7

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..415  
 <223> /mol\_type="unassigned DNA"  
 /note="C-terminal domain Mutant 7N"  
 /organism="Cp-7"

<400> 12  
 gacgaccggt gcgaatgaag ttatccaagg taaatggggt aatggccagg agcgctacaa 60  
 atctctggcc aaccgtggtt acaatccgca ggccgtgcag aataaagtta acgagattct 120  
 gaatgcgctg gagatcgctg atctcactac ggtggcaaac gaagtgattc aaggcaagtg 180  
 ggggaacggg caggaacggt acaagtcctt ggcaaaccgc ggctacaacc cacaggcagt 240  
 acagaacaag gtaaacgaaa tcttgaacgc tcgcgaaatt gctgacctta ccacagtagc 300  
 caatgaggtc attcagggaa aatggggcaa cggccaagaa cgttataaaa gtttagcgaa 360  
 tcgagggtat aatccccaag cggttcaaaa taaagtgaat gaattacttt cataa 415

<210> 13  
 <211> 188  
 <212> PRT  
 <213> Cp-7

<220>  
 <223> N-terminal domain Cpl-1

<400> 13  
 Met Val Lys Lys Asn Asp Leu Phe Val Asp Val Ser Ser His Asn Gly  
 1 5 10 15  
 Tyr Asp Ile Thr Gly Ile Leu Glu Gln Met Gly Thr Thr Asn Thr Ile  
 20 30  
 Ile Lys Ile Ser Glu Ser Thr Thr Tyr Leu Asn Pro Cys Leu Ser Ala  
 35 40 45  
 Gln Val Glu Gln Ser Asn Pro Ile Gly Phe Tyr His Phe Ala Arg Phe  
 50 55 60  
 Gly Gly Asp Val Ala Glu Ala Glu Arg Glu Ala Gln Phe Phe Leu Asp  
 65 70 75 80  
 Asn Val Pro Met Gln Val Lys Tyr Leu Val Leu Asp Tyr Glu Asp Asp  
 85 90 95  
 Pro Ser Gly Asp Ala Gln Ala Asn Thr Asn Ala Cys Leu Arg Phe Met  
 100 105 110  
 Gln Met Ile Ala Asp Ala Gly Tyr Lys Pro Ile Tyr Tyr Ser Tyr Lys  
 115 120 125

ES 2 525 954 A2

Pro Phe Thr His Asp Asn Val Asp Tyr Gln Gln Ile Leu Ala Gln Phe  
 130 135 140  
 Pro Asn Ser Leu Trp Ile Ala Gly Tyr Gly Leu Asn Asp Gly Thr Ala  
 145 150 155 160  
 Asn Phe Glu Tyr Phe Pro Ser Met Asp Gly Ile Arg Trp Trp Gln Tyr  
 165 170 175  
 Ser Ser Asn Pro Phe Asp Lys Asn Ile Val Leu Leu  
 180 185

<210> 14  
 <211> 564  
 <212> DNA  
 <213> Cp-7

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..564  
 <223> /mol\_type="unassigned DNA"  
 /note="N-terminal domain Cp1-1"  
 /organism="Cp-7"

<400> 14  
 atgggttaaaa agaatgattt attttagat gtttcaagtc acaacggta cgatataaca 60  
 ggtatcttgg agcaaatggg aacaactaac accatcatta aaatttctga aagtagcacc 120  
 tatttaaac cttgcttgtc tgctcaagtg gagcagtaa accctattgg cttttatcac 180  
 ttcgcacgct ttggcggaga cgtagcagaa gccgaaagag aagcgcagtt tttccttgac 240  
 aacgtgccta tgcaagttaa ataccttcta ttggactacg aggacgacc aagcggagac 300  
 gcacaagcga acactaacgc atgcttacgc tttatgcaga tgattgctga cgctggatat 360  
 aaacctattt attatagtta taaaccgttt acacatgata atgtggacta tcagcaaadc 420  
 cttgcacagt tccctaattc tctatggatt gcaggctatg gcttaaacga tggtagcact 480  
 aactttgaat acttccaag catggacggg ataagatggt ggcagtattc tagtaacccg 540  
 tttgacaaga atattgtact gttta 564

<210> 15  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Cp-7

<220>  
 <223> Linker Cp1-1

<400> 15  
 Asp Asp Glu Glu Asp Asp Lys Pro Lys Thr Ala  
 1 5 10

<210> 16  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Cp-7

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..33  
 <223> /mol\_type="unassigned DNA"  
 /note="Linker Cp1-1"  
 /organism="Cp-7"

<400> 16  
 gacgatgaag aagacgacaa gccaaagacc gct 33

ES 2 525 954 A2

<210> 17  
 <211> 342  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Artificial Chimera

<400> 17  
 Met Val Lys Lys Asn Asp Leu Phe Val Asp Val Ala Ser His Gln Gly  
 1 5 10 15  
 Tyr Asp Ile Ser Gly Ile Leu Glu Glu Ala Gly Thr Thr Asn Thr Ile  
 20 25 30  
 Ile Lys Val Ser Glu Ser Thr Ser Tyr Leu Asn Pro Cys Leu Ser Ala  
 35 40 45  
 Gln Val Ser Gln Ser Asn Pro Ile Gly Phe Tyr His Phe Ala Trp Phe  
 50 55 60  
 Gly Gly Asn Glu Glu Ala Glu Ala Glu Ala Arg Tyr Phe Leu Asp  
 65 70 75 80  
 Asn Val Pro Thr Gln Val Lys Tyr Leu Val Leu Asp Tyr Glu Asp His  
 85 90 95  
 Ala Ser Ala Ser Val Gln Arg Asn Thr Thr Ala Cys Leu Arg Phe Met  
 100 105 110  
 Gln Ile Ile Ala Glu Ala Gly Tyr Thr Pro Ile Tyr Tyr Ser Tyr Lys  
 115 120 125  
 Pro Phe Thr Leu Asp Asn Val Asp Tyr Gln Gln Ile Leu Ala Gln Phe  
 130 135 140  
 Pro Asn Ser Leu Trp Ile Ala Gly Tyr Gly Leu Asn Asp Gly Thr Ala  
 145 150 155 160  
 Asn Phe Glu Tyr Phe Pro Ser Met Asp Gly Ile Arg Trp Trp Gln Tyr  
 165 170 175  
 Ser Ser Asn Pro Phe Asp Lys Asn Ile Val Leu Leu Asp Asp Glu Lys  
 180 185 190  
 Glu Asp Asn Ile Asn Asn Glu Asn Thr Leu Lys Ser Leu Thr Thr Val  
 195 200 205  
 Ala Asn Glu Val Ile Gln Gly Lys Trp Gly Asn Gly Gln Glu Arg Tyr  
 210 215 220  
 Lys Ser Leu Ala Asn Arg Gly Tyr Asn Pro Gln Ala Val Gln Asn Lys  
 225 230 235 240  
 Val Asn Glu Ile Leu Asn Ala Arg Glu Ile Ala Asp Leu Thr Thr Val  
 245 250 255  
 Ala Asn Glu Val Ile Gln Gly Lys Trp Gly Asn Gly Gln Glu Arg Tyr  
 260 265 270  
 Lys Ser Leu Ala Asn Arg Gly Tyr Asn Pro Gln Ala Val Gln Asn Lys  
 275 280 285  
 Val Asn Glu Ile Leu Asn Ala Arg Glu Ile Ala Asp Leu Thr Thr Val  
 290 295 300  
 Ala Asn Glu Val Ile Gln Gly Lys Trp Gly Asn Gly Gln Glu Arg Tyr  
 305 310 315 320  
 Lys Ser Leu Ala Asn Arg Gly Tyr Asn Pro Gln Ala Val Gln Asn Lys  
 325 330 335  
 Val Asn Glu Leu Leu Ser  
 340

<210> 18  
 <211> 1029  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..1029  
 <223> /mol\_type="unassigned DNA"  
 /note="Chimera"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 18  
 atggttaaaa agaacgacct gttcgttgac gttgcgtctc accagggtta cgacatctct

ES 2 525 954 A2

ggtatcctgg aagaagcggg taccaccaac accatcatca aagtttctga atctaccagc 120  
 tacctgaacc cgtgcctgtc tgcgcagggt tctcagtcta acccgatcgg tttctaccac 180  
 ttcgcgtggt tcggtggtaa cgaagaagaa gcggaagcgg aagcgcgtaa cttcctggac 240  
 aacgttccga cccagggttaa atacctgggt ctggactacg aagaccacgc gtctgctgtct 300  
 gttcagcgtgta acaccaccgc gtgcctgctgt ttcattgcaga tcatcgcgga agcgggttac 360  
 accccgatct actactctta caaaccttc accctggaca acgttgacta ccagcagatc 420  
 ctggcgcagt tcccgaactc tctgtggatc gcgggttacg gtctgaacga cgggtaccgcg 480  
 aacttcgaat acttcccgtc tatggacggt atccggtggt ggcagtactc ttctaaccgcg 540  
 ttcgacaaaa acatcgttct gctggacgac gaaaaagaag acaacatcaa caacgaaaac 600  
 accctgaaat ctctgacgac cgttgcaat gaagttatcc aaggtaaag gggtaatggc 660  
 caggagcgt acaaatctct ggccaaccgt gggtacaatc cgcaggccgt gcagaataaa 720  
 gttaacgaga ttctgaatgc gcgtgagatc gcggatctca ctacggtggc aaacgaagtg 780  
 attcaaggca agtgggggaa cgggcaggaa cgggtacaagt ccttgcaaa ccgcggttac 840  
 aaccacag cagtacagaa caaggtaaac gaaatcttga acgctcgcga aattgctgac 900  
 cttaccacag tagccaatga ggtcattcag ggaaaatggg gcaacggtca agaacgttat 960  
 aaaagtttag cgaatcgagg gtataatccc caagcgggtc aaaataaagt gaatgaatta 1020  
 ctttcataa 1029

<210> 19  
 <211> 342  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Chimera

<400> 19  
 Met Val Lys Lys Asn Asp Leu Phe Val Asp Val Ala Ser His Gln Gly  
 1 5 10 15  
 Tyr Asp Ile Ser Gly Ile Leu Glu Gln Ala Gly Thr Thr Asn Thr Ile  
 20 25 30  
 Ile Lys Val Ser Glu Ser Thr Ser Tyr Leu Asn Pro Cys Leu Ser Ala  
 35 40 45  
 Gln Val Ser Gln Ser Asn Pro Ile Gly Phe Tyr His Phe Ala Trp Phe  
 50 55 60  
 Gly Gly Asn Gln Ala Glu Ala Glu Ala Glu Ala Arg Tyr Phe Leu Asp  
 65 70 75 80  
 Asn Val Pro Thr Gln Val Lys Tyr Leu Val Leu Asp Tyr Glu Asp His  
 85 90 95  
 Ala Ser Ala Ser Val Gln Arg Asn Thr Thr Ala Cys Leu Arg Phe Met  
 100 105 110  
 Gln Ile Ile Ala Glu Ala Gly Tyr Thr Pro Ile Tyr Tyr Ser Tyr Lys  
 115 120 125  
 Pro Phe Thr Leu Asp Asn Val Asp Tyr Gln Gln Ile Leu Ala Gln Phe  
 130 135 140  
 Pro Asn Ser Leu Trp Ile Ala Gly Tyr Gly Leu Asn Asp Gly Thr Ala  
 145 150 155 160  
 Asn Phe Glu Tyr Phe Pro Ser Met Asp Gly Ile Arg Trp Trp Gln Tyr  
 165 170 175  
 Ser Ser Asn Pro Phe Asp Lys Asn Ile Val Leu Leu Asp Asp Glu Lys  
 180 185 190  
 Glu Asp Asn Ile Asn Asn Glu Asn Thr Leu Lys Ser Leu Thr Thr Val  
 195 200 205

ES 2 525 954 A2

Ala Asn Glu Val Ile Gln Gly Lys Trp Gly Asn Gly Gln Glu Arg Tyr  
 210 215 220  
 Lys Ser Leu Ala Asn Arg Ala Val Gln Asn Lys  
 225 230 235 240  
 Val Asn Glu Ile Leu Asn Ala Arg Glu Ile Ala Asp Leu Thr Thr Val  
 245 250 255  
 Ala Asn Glu Val Ile Gln Gly Lys Trp Gly Asn Gly Gln Glu Arg Tyr  
 260 265 270  
 Lys Ser Leu Ala Asn Arg Gly Tyr Asn Pro Gln Ala Val Gln Asn Lys  
 275 280 285  
 Val Asn Glu Ile Leu Asn Ala Arg Glu Ile Ala Asp Leu Thr Thr Val  
 290 295 300  
 Ala Asn Glu Val Ile Gln Gly Lys Trp Gly Asn Gly Gln Glu Arg Tyr  
 305 310 315 320  
 Lys Ser Leu Ala Asn Arg Gly Tyr Asn Pro Gln Ala Val Gln Asn Lys  
 325 330 335  
 Val Asn Glu Leu Leu Ser  
 340

<210> 20  
 <211> 1029  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..1029  
 <223> /mol\_type="unassigned DNA"  
 /note="Chimera"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 20  
 atggttaaaa agaacgacct gttcgttgac gttgcgtctc accagggtta cgacatctct 60  
 ggtatcctgg aacaggcggg taccaccaac accatcatca aagtttctga atctaccagc 120  
 tacctgaacc cgtgcctgtc tgcgcagggt tctcagtcta acccgatcgg tttctaccac 180  
 ttcgcgtggt tcggtggtaa ccaggcggaa gcggaagcgg aagcgcgtaa cttcctggac 240  
 aacgttccga cccagggtta atacctggtt ctggactacg aagaccacgc gtctgcgtct 300  
 gttcagcgta acaccaccgc gtgcctgcgt ttcattgcaga tcatcgcgga agcgggttac 360  
 accccgatct actactctta caaaccttc accctggaca acgttgacta ccagcagatc 420  
 ctggcgcagt tcccgaactc tctgtggatc gcgggttacg gtctgaacga cggtagccgc 480  
 aacttcgaat acttcccgtc tatggacggt atccggtggt ggcagtactc ttctaaccgc 540  
 ttcgacaaaa acatcgttct gctggacgac gaaaaagaag acaacatcaa caacgaaaac 600  
 accctgaaat ctctgacgac cgttgcaaat gaagttatcc aaggtaaag gggtaatggc 660  
 caggagcgtt acaaatctct ggccaaccgt ggttacaatc cgcaggccgt gcagaataaa 720  
 gttaacgaga ttctgaatgc gcgtgagatc gcggatctca ctacggtggc aaacgaagtg 780  
 attcaaggca agtgggggaa cgggcaggaa cggtagaagt ccttggcaaa ccgaggctac 840  
 aaccacaggg cagtacagaa caaggtaac gaaatcttga acgctcgcga aattgctgac 900  
 cttaccacag tagccaatga ggtcattcag ggaaaatggg gcaacggtca agaacgttat 960  
 aaaagtttag cgaatcgagg gtataatccc caagcggttc aaaataaagt gaatgaatta 1020  
 ctttcataa 1029

<210> 21

ES 2 525 954 A2

<211> 342  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Chimera

<400> 21  
 Met Val Lys Lys Asn Asp Leu Phe Val Asp Val Ala Ser His Gln Gly  
 1 5 10 15  
 Tyr Asp Ile Ser Gly Ile Leu Glu Glu Ala Gly Thr Thr Asn Thr Ile  
 20 25 30  
 Ile Lys Val Ser Glu Ser Thr Ser Tyr Leu Asn Pro Cys Leu Ser Ala  
 35 40 45  
 Gln Val Ser Gln Ser Asn Pro Ile Gly Phe Tyr His Phe Ala Trp Phe  
 50 55 60  
 Gly Gly Asn Glu Glu Glu Ala Glu Ala Glu Ala Arg Tyr Phe Leu Asp  
 65 70 75 80  
 Asn Val Pro Thr Gln Val Lys Tyr Leu Val Leu Asp Tyr Glu Asp His  
 85 90 95  
 Ala Ser Ala Ser Val Gln Arg Asn Thr Thr Ala Cys Leu Arg Phe Met  
 100 105 110  
 Gln Ile Ile Ala Glu Ala Gly Tyr Thr Pro Ile Tyr Tyr Ser Tyr Lys  
 115 120 125  
 Pro Phe Thr Leu Asp Asn Val Asp Tyr Gln Gln Ile Leu Ala Gln Phe  
 130 135 140  
 Pro Asn Ser Leu Trp Ile Ala Gly Tyr Gly Leu Asn Asp Gly Thr Ala  
 145 150 155 160  
 Asn Phe Glu Tyr Phe Pro Ser Met Asp Gly Ile Arg Trp Trp Gln Tyr  
 165 170 175  
 Ser Ser Asn Pro Phe Asp Lys Asn Ile Val Leu Leu Asp Asp Glu Lys  
 180 185 190  
 Glu Asp Asn Ile Asn Asn Glu Asn Thr Leu Lys Ser Leu Thr Thr Val  
 195 200 205  
 Ala Asn Glu Val Ile Gln Gly Leu Trp Gly Asn Gly Gln Ala Arg Tyr  
 210 215 220  
 Asp Ser Leu Ala Asn Ala Gly Tyr Asp Pro Gln Ala Val Gln Asp Lys  
 225 230 235 240  
 Val Asn Glu Ile Leu Asn Ala Arg Glu Ile Ala Asp Leu Thr Thr Val  
 245 250 255  
 Ala Asn Glu Val Ile Gln Gly Leu Trp Gly Asn Gly Gln Ala Arg Tyr  
 260 265 270  
 Asp Ser Leu Ala Asn Ala Gly Tyr Asp Pro Gln Ala Val Gln Asp Lys  
 275 280 285  
 Val Asn Glu Ile Leu Asn Ala Arg Glu Ile Ala Asp Leu Thr Thr Val  
 290 295 300  
 Ala Asn Glu Val Ile Gln Gly Leu Trp Gly Asn Gly Gln Ala Arg Tyr  
 305 310 315 320  
 Asp Ser Leu Ala Asn Ala Gly Tyr Asp Pro Gln Ala Val Gln Asp Lys  
 325 330 335  
 Val Asn Glu Leu Leu Ser  
 340

<210> 22  
 <211> 1029  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..1029  
 <223> /mol\_type="unassigned DNA"  
 /note="Chimera"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 22  
 atgggtaaaa agaacgacct gttcgttgac gttgcgtctc accagggtta cgacatctct 60  
 ggtatcctgg aagaagcggg taccaccaac accatcatca aagtttctga atctaccagc 120

ES 2 525 954 A2

tacctgaacc cgtgcctgtc tgcgcaggtt tctcagtcta acccgatcgg tttctaccac 180  
 ttcgcgtggt tcggtggtaa cgaagaagaa gcggaagcgg aagcgcgtta cttcctggac 240  
 aacgttccga cccaggttaa atacctgggt ctggactacg aagaccacgc gtctgctgtc 300  
 gttcagcgtgta acaccaccgc gtgcctgcgt ttcattgcaga tcattcgcgga agcggggttac 360  
 accccgatct actactctta caaaccttc accctggaca acgttgacta ccagcagatc 420  
 ctggcgcagt tcccgaactc tctgtggatc gcggggttacg gtctgaacga cggtagccgcg 480  
 aacttcgaat acttcccgtc tatggacggt atccgttggg ggcagtactc ttctaaccgc 540  
 ttcgacaaaa acatcgttct gctggacgac gaaaaagaag acaacatcaa caacgaaaac 600  
 accctgaaat ctctgacgac cgttgcgaat gaagttatcc aaggtctgtg gggtaatggc 660  
 caggcgcgct acgattctct ggccaacgcg ggtagcgtc cgcaggccgt gcaggataaa 720  
 gttaacgaga ttctgaatgc gcgtgagatc gcggatctca ctacgggtggc aaacgaagtg 780  
 attcaaggcc tctgggggaa cgggcaggcg cggtagcact cttggcaaa cgctggctac 840  
 gaccacagc cagtacagga caaggtaaac gaaatcttga acgctcgcga aattgctgac 900  
 cttaccacag tagccaacga ggtcattcag ggactttggg gcaacggta agcgcgttat 960  
 gacagtttag cgaatgcagg gtatgacccc caagcgggtc aagacaaagt gaatgaatta 1020  
 ctttcataa 1029

<210> 23  
 <211> 342  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Chimera

<400> 23  
 Met Val Lys Lys Asn Asp Leu Phe Val Asp Val Ser Ser His Asn Gly  
 1 5 10 15  
 Tyr Asp Ile Thr Gly Ile Leu Glu Gln Met Gly Thr Thr Asn Thr Ile  
 20 25 30  
 Ile Lys Ile Ser Glu Ser Thr Thr Tyr Leu Asn Pro Cys Leu Ser Ala  
 35 40 45  
 Gln Val Glu Gln Ser Asn Pro Ile Gly Phe Tyr His Phe Ala Arg Phe  
 50 55 60  
 Gly Gly Asp Val Ala Glu Ala Glu Arg Glu Ala Gln Phe Phe Leu Asp  
 65 70 75 80  
 Asn Val Pro Met Gln Val Lys Tyr Leu Val Leu Asp Tyr Glu Asp Asp  
 85 90 95  
 Pro Ser Gly Asp Ala Gln Ala Asn Thr Asn Ala Cys Leu Arg Phe Met  
 100 105 110  
 Gln Met Ile Ala Asp Ala Gly Tyr Lys Pro Ile Tyr Tyr Ser Tyr Lys  
 115 120 125  
 Pro Phe Thr His Asp Asn Val Asp Tyr Gln Gln Ile Leu Ala Gln Phe  
 130 135 140  
 Pro Asn Ser Leu Trp Ile Ala Gly Tyr Gly Leu Asn Asp Gly Thr Ala  
 145 150 155 160  
 Asn Phe Glu Tyr Phe Pro Ser Met Asp Gly Ile Arg Trp Trp Gln Tyr  
 165 170 175  
 Ser Ser Asn Pro Phe Asp Lys Asn Ile Val Leu Leu Asp Asp Glu Lys  
 180 185 190  
 Glu Asp Asn Ile Asn Asn Glu Asn Thr Leu Lys Ser Leu Thr Thr Val  
 195 200 205  
 Ala Asn Glu Val Ile Gln Gly Lys Trp Gly Asn Gly Gln Glu Arg Tyr  
 210 215 220

ES 2 525 954 A2

Lys Ser Leu Ala Asn Arg Gly Tyr Asn Pro Gln Ala Val Gln Asn Lys  
 225 230 235 240  
 Val Asn Glu Ile Leu Asn Ala Arg Glu Ile Ala Asp Leu Thr Thr Val  
 245 250 255  
 Ala Asn Glu Val Ile Gln Gly Lys Trp Gly Asn Gly Gln Glu Arg Tyr  
 260 265 270  
 Lys Ser Leu Ala Asn Arg Gly Tyr Asn Pro Gln Ala Val Gln Asn Lys  
 275 280 285  
 Val Asn Glu Ile Leu Asn Ala Arg Glu Ile Ala Asp Leu Thr Thr Val  
 290 295 300  
 Ala Asn Glu Val Ile Gln Gly Lys Trp Gly Asn Gly Gln Glu Arg Tyr  
 305 310 315 320  
 Lys Ser Leu Ala Asn Arg Gly Tyr Asn Pro Gln Ala Val Gln Asn Lys  
 325 330 335  
 Val Asn Glu Leu Leu Ser  
 340

<210> 24  
 <211> 1029  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..1029  
 <223> /mol\_type="unassigned DNA"  
 /note="Artificial Chimera"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 24  
 atgggttaaaa agaatgattt atttgtagat gtttcaagtc acaacgggta cgatataaca 60  
 ggtatcttgg agcaaatggg aacaactaac accatcatta aaatttctga aagtacgacc 120  
 tatttaaac cttgcttgtc tgctcaagtg gagcagtcaa accctattgg cttttatcac 180  
 ttcgcacgct ttggcgggaga cgtagcagaa gccgaaagag aagcgcagtt tttccttgac 240  
 aacgtgccta tgcaagttaa ataccttghta ttggactacg aggacgacct aagcggagac 300  
 gcacaagcga aactaacgc atgcttacgc tttatgcaga tgattgctga cgctggatat 360  
 aaacctattt attatagtta taaaccgttt acacatgata atgtggacta tcagcaaadc 420  
 cttgcacagt tccctaattc tctatggatt gcaggctatg gcttaaacga tggtagcagct 480  
 aactttgaat acttccaag catggacggg ataagatggg ggcagtattc tagtaaccgg 540  
 tttgacaaga atattgtact gttagacgac gaaaaagaag acaacatcaa caacgaaaac 600  
 accctgaaat ctctgacgac cgttgcgaat gaagttatcc aaggtaaagtg gggtaagtg 660  
 caggagcgcct acaaatctct ggccaaccgt ggttacaatc cgaggccgt gcagaataaa 720  
 gttaacgaga ttctgaatgc gcgtgagatc gcggatctca ctacgggtggc aaacgaagtg 780  
 attcaaggca agtgggggaa cgggcaggaa cgggtacaagt ccttggcaaa ccgaggctac 840  
 aaccacagc cagtacagaa caaggtaaac gaaatcttga acgctcgca aattgctgac 900  
 cttaccacag tagccaatga ggtcattcag ggaaaatggg gcaacggatc agaacgttat 960  
 aaaagtttag cgaatcgagg gtataatccc caagcggttc aaaataaagt gaatgaatta 1020  
 ctttcataa 1029

<210> 25  
 <211> 337  
 <212> PRT

ES 2 525 954 A2

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimera

<400> 25

```

Met Val Lys Lys Asn Asp Leu Phe Val Asp Val Ser Ser His Asn Gly
1      5      5      5      5      5      5      5      5      5      5      5      5      5
Tyr Asp Ile Thr Gly Ile Leu Glu Gln Met Gly Thr Thr Asn Thr Ile
      20      20      20      20      20      20      20      20      20      20      20      20      20
Ile Lys Ile Ser Glu Ser Thr Thr Tyr Leu Asn Pro Cys Leu Ser Ala
      35      35      35      35      35      35      35      35      35      35      35      35      35
Gln Val Glu Gln Ser Asn Pro Ile Gly Phe Tyr His Phe Ala Arg Phe
      50      50      50      50      50      50      50      50      50      50      50      50      50
Gly Gly Asp Val Ala Glu Ala Glu Arg Glu Ala Gln Phe Phe Leu Asp
65      65      65      65      65      65      65      65      65      65      65      65      65
Asn Val Pro Met Gln Val Lys Tyr Leu Val Leu Asp Tyr Glu Asp Asp
      85      85      85      85      85      85      85      85      85      85      85      85      85
Pro Ser Gly Asp Ala Gln Ala Asn Thr Asn Ala Cys Leu Arg Phe Met
      100     100     100     100     100     100     100     100     100     100     100     100     100
Gln Met Ile Ala Asp Ala Gly Tyr Lys Pro Ile Tyr Tyr Ser Tyr Lys
      115     115     115     115     115     115     115     115     115     115     115     115     115
Pro Phe Thr His Asp Asn Val Asp Tyr Gln Gln Ile Leu Ala Gln Phe
130     130     130     130     130     130     130     130     130     130     130     130     130
Pro Asn Ser Leu Trp Ile Ala Gly Tyr Gly Leu Asn Asp Gly Thr Ala
145     145     145     145     145     145     145     145     145     145     145     145     145
Asn Phe Glu Tyr Phe Pro Ser Met Asp Gly Ile Arg Trp Trp Gln Tyr
      165     165     165     165     165     165     165     165     165     165     165     165     165
Ser Ser Asn Pro Phe Asp Lys Asn Ile Val Leu Leu Asp Asp Glu Glu
      180     180     180     180     180     180     180     180     180     180     180     180     180
Asp Asp Lys Pro Lys Thr Ala Leu Thr Thr Val Ala Asn Glu Val Ile
195     195     195     195     195     195     195     195     195     195     195     195     195
Gln Gly Lys Trp Gly Asn Gly Gln Glu Arg Tyr Lys Ser Leu Ala Asn
210     210     210     210     210     210     210     210     210     210     210     210     210
Arg Gly Tyr Asn Pro Gln Ala Val Gln Asn Lys Val Asn Glu Ile Leu
225     225     225     225     225     225     225     225     225     225     225     225     225
Asn Ala Arg Glu Ile Ala Asp Leu Thr Thr Val Ala Asn Glu Val Ile
      245     245     245     245     245     245     245     245     245     245     245     245     245
Gln Gly Lys Trp Gly Asn Gly Gln Glu Arg Tyr Lys Ser Leu Ala Asn
260     260     260     260     260     260     260     260     260     260     260     260     260
Arg Gly Tyr Asn Pro Gln Ala Val Gln Asn Lys Val Asn Glu Ile Leu
275     275     275     275     275     275     275     275     275     275     275     275     275
Asn Ala Arg Glu Ile Ala Asp Leu Thr Thr Val Ala Asn Glu Val Ile
290     290     290     290     290     290     290     290     290     290     290     290     290
Gln Gly Lys Trp Gly Asn Gly Gln Glu Arg Tyr Lys Ser Leu Ala Asn
305     305     305     305     305     305     305     305     305     305     305     305     305
Arg Gly Tyr Asn Pro Gln Ala Val Gln Asn Lys Val Asn Glu Leu Leu
      325     325     325     325     325     325     325     325     325     325     325     325     325
Ser

```

<210> 26

<211> 1014

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..1014

<223> /mol\_type="unassigned DNA"

/note="Chimera"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 26

```

atgggttaaaa agaatgattt attttagat gtttcaagtc acaacggta cgatataaca      60
ggatcttgg agcaaatggg aacaactaac accatcatta aaatttctga aagtacgacc      120
tatttaaacc cttgctgtc tgctcaagtg gagcagtcaa accctattgg cttttatcac      180

```

ES 2 525 954 A2

ttcgcacgct	ttggcggaga	cgtagcagaa	gccgaaagag	aagcgcagtt	tttccttgac	240
aacgtgccta	tgcaagttaa	ataccttgta	ttggactacg	aggacgacc	aagcggagac	300
gcacaagcga	acactaacgc	atgcttacgc	tttatgcaga	tgattgctga	cgctggatat	360
aaacctat	attatagtta	taaaccgttt	acacatgata	atgtggacta	tcagcaaadc	420
cttgcacagt	tccctaattc	tctatggatt	gcaggctatg	gcttaaacga	tggtacagct	480
aactttgaat	acttccaag	catggacggg	ataagatggt	ggcagtattc	tagtaaccgc	540
tttgacaaga	atattgtact	gttagacgat	gaagaagacg	acaagccaaa	gaccgctctg	600
acgaccgttg	cgaatgaagt	tatccaaggt	aatgggggta	atggccagga	gcgctacaaa	660
tctctggcca	accgtggtta	caatccgcag	gccgtgcaga	ataaagttaa	cgagattctg	720
aatgcgcgtg	agatcgcgga	tctcactacg	gtggcaaacg	aagtgattca	aggcaagtgg	780
gggaacgggc	aggaacggta	caagtccttg	gcaaaccgcg	gctacaacc	acaggcagta	840
cagaacaagg	taaacgaaat	cttgaacgct	cgcgaaattg	ctgaccttac	cacagtagcc	900
aatgagggtca	ttcagggaaa	atggggcaac	ggtcaagaac	gttataaaag	tttagcgaat	960
cgaggggtata	atccccaagc	ggttcaaaat	aaagtgaatg	aattactttc	ataa	1014