



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 332 258**

② Número de solicitud: 200930538

⑤ Int. Cl.:
C07K 7/06 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **30.07.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **29.01.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
29.01.2010

⑰ Solicitante/s: **Universitat de Girona
Plaça Sant Domènec, 3
17071 Girona, ES**

⑱ Inventor/es: **Badosa Romañó, Esther;
Bardají Rodríguez, Eduard;
Feliu Soley, Lidia;
Güell Costa, Imma;
Montesinos Seguí, Emilio y
Planas Grabuleda, Marta**

⑳ Agente: **Coca Torrens, Manuela**

㉔ Título: **Péptidos lineales antimicrobianos con aminoácidos de la serie D.**

㉕ Resumen:

Péptidos lineales antimicrobianos con aminoácidos de la serie D.

La presente invención se refiere a nuevos péptidos lineales que presentan actividad antimicrobiana. Dichos péptidos están formados por 11 residuos de aminoácidos, y contienen al menos un aminoácido de la serie D. La invención describe la síntesis y la utilización de los mencionados péptidos como agentes antimicrobianos frente a bacterias patógenas de vegetales y/o humanos y/o animales. También se refiere a composiciones que comprenden una cantidad efectiva de dichos péptidos y al menos un agente auxiliar, y al uso de dichas composiciones para tratar enfermedades infecciosas en plantas, humanos y animales causadas por bacterias patógenas.

ES 2 332 258 A1

DESCRIPCIÓN

Péptidos lineales antimicrobianos con aminoácidos de la serie D.

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a péptidos lineales que incluyen al menos un aminoácido de la serie D, que presentan propiedades antimicrobianas, y que son particularmente eficaces frente a microorganismos patógenos de plantas y/o humanos y/o animales.

10

Estado de la técnica anterior

Las enfermedades de origen microbiano continúan siendo responsables de pérdidas de gran importancia económica en los procesos productivos y en la salud humana y/o animal. Las bacterias fitopatógenas son responsables de pérdidas de gran importancia económica en agricultura. Entre ellas se destacan, por ejemplo, las bacteriosis causadas por las bacterias *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, y *Xanthomonas vesicatoria*.

15

Por otra parte, un gran número de bacterias son responsables de enfermedades infecciosas en humanos y animales. Entre ellas se destacan, por ejemplo, las causadas por las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, y *Listeria monocytogenes*.

20

El uso de antibióticos, tanto en protección vegetal, como en clínica o veterinaria, está limitado por la aparición de cepas resistentes de los patógenos causantes de enfermedades. Por ello, es necesario el desarrollo de nuevos antimicrobianos que puedan evitar la resistencia en las bacterias. Además, para su uso en agricultura deben ser poco persistentes en el medio ambiente.

25

En los últimos años se ha intensificado la investigación sobre la aplicación de péptidos antimicrobianos naturales, presentes en plantas y animales, como alternativa a los antibióticos convencionales.

30

Por ejemplo, la cecropina A es un péptido lineal formado por 37 aminoácidos que se encuentra en la hemolinfa de la mariposa *Hyalophora cecropia*. Dicho péptido presenta una potente actividad lítica contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Se ha observado que los péptidos de origen natural habitualmente tienen secuencias largas de aminoácidos, presentan una baja biodisponibilidad, y son susceptibles a la degradación por proteasas o son tóxicos. Por lo tanto, juntamente con el elevado coste de producción debido a su longitud considerable, existen dificultades para su empleo en protección vegetal, clínica, o veterinaria.

35

Se ha descrito la preparación de péptidos con secuencias más cortas, que contienen la combinación de fragmentos de péptidos de origen natural. También se han desarrollado nuevos agentes antimicrobianos por introducción de modificaciones en péptidos de origen natural o derivados de ellos.

40

Por ejemplo, en Ali *et al.*, Mol. Plant-Microbe Interact., 2000, 13, 847-859 se describe un undecapéptido formado por fragmentos de los péptidos de origen natural cecropina A y melitina, que es activo frente a algunas bacterias patógenas de las plantas como son *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, y *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*.

45

Por ejemplo en el artículo de Badosa *et al.*, A library of linear undeca-peptides with antibacterial activity against phytopathogenic bacteria, Peptides, 2007, 28, 2276-2285, se describen undecapéptidos con propiedades antimicrobianas frente a las bacterias fitopatógenas *E. amylovora*, *X. vesicatoria*, y *P. syringae*.

50

Por ejemplo en el artículo de Friedrich *et al.*, Antibacterial Action of Structurally Diverse Cationic Peptides on Gram-Positive Bacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000, 44: 2086-2092, se describen péptidos de 12 a 26 aminoácidos con propiedades antimicrobianas frente a bacterias patógenas de humanos y animales como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* o *Streptococcus pyogenes*.

55

A pesar de dichos desarrollos, subsiste la necesidad de disponer de nuevos compuestos antimicrobianos que sean activos frente a bacterias patógenas, y que además posean características adicionales apropiadas, como por ejemplo espectro de acción amplio, toxicidad baja y estabilidad frente a proteasas.

60

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar péptidos lineales que presentan propiedades antimicrobianas.

65

También forma parte del objeto de la invención dichos péptidos para uso como medicamento.

Forma también parte del objeto de la invención la utilización de dichos péptidos como agentes antimicrobianos.

ES 2 332 258 A1

También forma parte del objeto de la invención la utilización de dichos péptidos para la preparación de una composición antimicrobiana.

5 También es objeto de la invención una composición antimicrobiana que comprende los péptidos de la invención y un agente auxiliar.

Forma parte también del objeto de la invención un método para prevenir y/o tratar enfermedades infecciosas en plantas causadas por bacterias.

10 También forma parte del objeto de la invención la utilización de dichos péptidos para preparar un medicamento para tratar enfermedades infecciosas en humanos y animales causadas por bacterias.

Descripción de la invención

15 Los autores de la presente invención han desarrollado nuevos péptidos que resultan de fácil preparación y que presentan una elevada eficacia para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas tanto para plantas como para humanos o animales. Además dichos péptidos presentan grados variables de estabilidad frente a proteasas y de toxicidad.

Péptidos

20 El objeto de la presente invención es proporcionar péptidos lineales que responden a la fórmula (I):



25 en donde al menos uno de los aminoácidos es de la serie D, y en donde el aminoácido leucina del extremo C-terminal está en forma de grupo carboxilo o carboxamida.

30 En una realización preferida, los péptidos de la invención tienen el aminoácido leucina del extremo C-terminal en forma de carboxamida, y se pueden representar mediante la fórmula:



35 en donde al menos uno de los restos de aminoácidos es de la serie D.

40 En la fórmula (I) los aminoácidos se representan mediante una única letra de acuerdo con la Comisión para la Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB, según se describe en el libro *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, 2nd edition, Portland Press, 1992, Londres [ISBN 1-85578-005-4] y que es bien conocida por el experto en la materia.

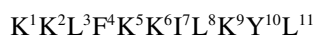
Según dicha nomenclatura, la letra K representa el aminoácido L-lisina, la letra L el aminoácido L-leucina, la letra I el aminoácido L-isoleucina, la letra Y el aminoácido L-tirosina y la letra F el aminoácido L-fenilalanina.

45 En esta descripción, los aminoácidos de la serie D se representan en letra minúscula, negrita y subrayada: la letra **k** representa el aminoácido D-lisina, la letra **l** el aminoácido D-leucina, la letra **i** el aminoácido D-isoleucina, la letra **y** el aminoácido D-tirosina y la letra **f** el aminoácido D-fenilalanina.

50 Siguiendo la nomenclatura de la IUPAC, los péptidos de esta descripción se representan con el extremo N-terminal en la parte izquierda de la fórmula y con el extremo C-terminal en la parte derecha de la misma.

Entre los péptidos de la invención resultan preferidos aquéllos definidos por la fórmula (I) que incluyen un residuo de aminoácido de la serie D en cualquiera de las posiciones 1 a 8.

55 De acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC, la numeración de las posiciones de los aminoácidos se inicia en el extremo N-terminal, tal como se puede ver a continuación:



60

65

ES 2 332 258 A1

Resultan especialmente preferidos los péptidos seleccionados entre el grupo formado por los péptidos que Figuran en la Tabla I;

TABLA I

SEQ_ID_NO:	Referencia	Secuencia
4	BP141	KKLFKKI <u>I</u> KYL
5	BP142	KKLF <u>k</u> KKILKYL
6	BP143	KKL <u>I</u> KKILKYL
7	BP144	KKI <u>F</u> KKILKYL
8	BP145	K <u>k</u> LFKKILKYL
9	BP146	KKLFK <u>k</u> ILKYL
10	BP147	<u>k</u> KLFFKKILKYL

Más especialmente preferido es el péptido definido por la fórmula KKLFKKILKYL (SEQ_ID_NO: 6, BP143).

También resultan preferidos aquéllos definidos por la fórmula (I) que incluyen entre cinco y once aminoácidos de la serie D consecutivos.

Dichos aminoácidos de la serie D pueden estar colocados en cualquier posición en la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo pueden estar colocados consecutivos, o alternados, o siguiendo ningún orden particular.

Resultan especialmente preferidos los péptidos seleccionados entre el grupo formado por los péptidos que figuran en la Tabla II:

TABLA II

SEQ_ID_NO:	Referencia	Secuencia
16	BP153	<u>kklfkkilkyl</u>
19	BP156	KKLFKK <u>ilkyl</u>
20	BP157	KKLFK <u>ilkyl</u>
21	BP158	KKLF <u>kkilkyl</u>
22	BP159	KKL <u>fkilkyl</u>
23	BP160	KKI <u>fkilkyl</u>
24	BP161	K <u>klfkkilkyl</u>

ES 2 332 258 A1

Aún más especialmente preferidos resultan los péptidos seleccionados entre el grupo formado por los péptidos definidos por las fórmulas **kklfkkilkyl** (SEQ_ID_NO: 16, BP153) y **KKLfkilkyl** (SEQ_ID_NO: 21, BP158).

5 También resultan preferidos aquellos péptidos definidos por la fórmula (I) que incluyen dos o tres aminoácidos de la serie D.

Resultan especialmente preferidos los péptidos seleccionados entre el grupo formado por los péptidos que figuran en la Tabla III:

10

TABLA III

15

SEQ_ID_NO:	Referencia	Secuencia
12	BP149	KKl f KKIL k YL
13	BP150	KKL F KKI l kYL
14	BP151	KKl f KK l IL k YL
15	BP152	KKL F KK i l k YL
17	BP154	kk L f KKILKYL

20

25

30

Aún más especialmente preferidos resultan los péptidos seleccionados entre el grupo formado por los péptidos definidos por las fórmulas **KKL**F**KKI**l**kYL** (SEQ_ID_NO: 13, BP150) y **KKl**f**KK**l**IL**k**YL** (SEQ_ID NO: 14, BP151).

35

Como ya se ha indicado anteriormente resultan preferidos aquellos péptidos que tienen un grupo carboxamido en el grupo C-terminal.

40

Los péptidos descritos en la invención están formados por 11 aminoácidos que los hace apropiados para ser preparados empleando los procedimientos habituales de síntesis de péptidos en fase sólida, como por ejemplo los descritos por R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 1963, 85: 2149-2154.

45

Entre ellos se puede mencionar el que emplea como soporte sólido la resina 4-metilbencidrilamina (MBHA) funcionalizada con grupos amino. Sobre dicho soporte sólido se llevan a cabo las reacciones sucesivas de acoplamiento entre los diferentes aminoácidos que integran el péptido.

50

Dicho procedimiento es bien conocido por el experto en la materia y se encuentra descrito, por ejemplo, en S.A. Kates, F. Albericio Eds., Solid-Phase Synthesis. A practical guide, Marcel Dekker, New York, 2000 [ISBN: 0-8247-0359-6], o en K. Burgess Eds., Solid-Phase Organic Synthesis, Wiley. John & Sons. New York, 1999 [ISBN: 0471318256].

Cuando se emplea la resina MBHA como soporte sólido, habitualmente se incorpora a dicha resina un espaciador bifuncional sensible al medio ácido, que permite el desanclaje en condiciones suaves del péptido una vez sintetizada.

55

Por ejemplo un espaciador bifuncional apropiado es el Fmoc-Rink-Linker (número CAS: 145469-56-3) comercializado por la empresa Iris Biotech (Alemania).

Dicho espaciador, una vez se ha unido a través de su grupo carboxílico al grupo amino de la resina MBHA, y se ha eliminado el grupo protector Fmoc, presenta un grupo amino libre que permite el anclaje de un aminoácido que tenga un grupo carboxílico libre.

60

En el mercado se puede adquirir la resina Fmoc-Rink-MBHA en la empresa Iris Biotech, que ya tiene incorporado el espaciador mencionado.

También se puede emplear el ácido 4-hidroximetilfenoxiacético (HMPA) como espaciador unido a una resina, comercializado por ejemplo por la compañía Novabiochem.

65

Un procedimiento para la preparación de los péptidos de la invención puede ser por ejemplo el que se describe a continuación.

ES 2 332 258 A1

En dicho procedimiento se utiliza la química del grupo Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo) como protector del grupo α -amino de los aminoácidos que se emplean para preparar los péptidos de la invención.

5 Para la protección de la cadena lateral de la lisina (Lys) se ha empleado el grupo *tert*-butiloxicarbonilo (Boc). Para la protección de la cadena lateral de la tirosina (Tyr) se ha empleado el grupo *tert*-butilo (t-Bu).

10 En la primera etapa se procede a la eliminación del grupo protector Fmoc, presente en el grupo amino del espaciador bifuncional. A continuación se procede al anclaje del aminoácido leucina, que también tiene el grupo α -amino protegido por el grupo Fmoc.

10 Antes de proceder al nuevo acoplamiento se elimina el grupo protector Fmoc de la leucina anclada en la resina.

El ciclo de acoplamiento-desprotección se repite hasta completar la estructura del péptido.

15 La incorporación de los dos últimos aminoácidos del péptido se realiza habitualmente mediante 2 o 3 acoplamientos sucesivos con el fin de completar la reacción de acoplamiento del aminoácido con el péptido anclado en la resina.

20 La escisión del péptido del soporte sólido se realiza en condiciones ácidas, al mismo tiempo que se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos que forman el péptido.

25 El empleo del Fmoc-Rink-Linker (número CAS: 145469-56-3) comercializado por la empresa Iris Biotech (Alemania) en la síntesis de los péptidos conduce a la formación de un grupo carboxamido en el extremo C-terminal de los péptidos.

Al emplear como espaciador el HMPA, la escisión del péptido de la resina conduce a obtener el extremo C-terminal en forma de grupo carboxílico. Se ha observado que los péptidos que tienen un grupo carboxílico en el extremo C-terminal en lugar de un grupo carboxamido también presentan actividad antimicrobiana.

30 Tras un proceso convencional de aislamiento, los péptidos de la invención se obtienen con una buena pureza, habitualmente superior al 80%, determinada por HPLC, en forma de sólidos pulverulentos, y se pueden caracterizar por espectrometría de masas (ESI-MS).

35 Sorprendentemente se ha comprobado que los péptidos de la invención presentan una actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas de plantas y/o humanos y/o animales, que es particularmente efectiva frente a bacterias patógenas de las plantas como son las bacterias *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, y *Pseudomonas syringae*, y que además es posible modular la citotoxicidad frente a células eucariotas y la estabilidad frente a proteasas.

40 Forma parte del objeto de la invención los péptidos de la invención para uso como medicamento.

Forma parte del objeto de la invención la utilización de los péptidos de la invención como agentes antimicrobianos.

45 También forma parte del objeto de la invención la utilización de los péptidos de la invención para la preparación de una composición antimicrobiana.

Forma parte también del objeto de la invención la utilización de los péptidos de la invención para preparar un medicamento para tratar enfermedades infecciosas en animales y humanos.

50 Los péptidos de la invención presentan diferentes grados de citotoxicidad y diferentes grados de estabilidad a la degradación enzimática, de modo que se pueden combinar varios de los péptidos de la invención en una composición antimicrobiana para modular la citotoxicidad y la degradación frente a proteasas.

55 Preferiblemente los péptidos de la invención se utilizan como agentes antimicrobianos frente a bacterias patógenas de las plantas.

Preferiblemente las bacterias fitopatógenas se seleccionan entre el grupo formado por *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, y *Pseudomonas syringae*.

60 Entre los péptidos de la invención que resultan ser preferidos para ser utilizados como agentes antimicrobianos frente a bacterias patógenas de las plantas, se encuentran los péptidos preferidos indicados anteriormente en este mismo apartado.

65 Las bacterias mencionadas resultan ser indicadores apropiados para determinar la actividad antimicrobiana de compuestos que son susceptibles de ser empleados para combatir infecciones y enfermedades causadas por bacterias en plantas.

Erwinia amylovora es una bacteria Gram-negativa que causa la enfermedad conocida como fuego bacteriano que afecta a las plantas de la familia de las rosáceas, entre las que se encuentran árboles frutales de gran importancia

económica como son el manzano y el peral, y plantas ornamentales como el serbal, el espino de fuego, y el mostajo. En Europa está catalogada como una bacteria de cuarentena en agricultura. El fuego bacteriano puede afectar a prácticamente todos los órganos de la planta y con frecuencia implica la muerte de los árboles o arbustos enfermos. Actualmente no hay métodos efectivos para el control del fuego bacteriano y es necesario combinar distintas medidas encaminadas a eliminar o reducir el inóculo.

Xanthomonas vesicatoria es una bacteria Gram-negativa que provoca la enfermedad denominada mancha bacteriana en plantas de la familia de las solanáceas que tienen una gran importancia económica como son el tomate y el pimiento. Esta enfermedad afecta a hojas, tallos y frutos provocando su marchitez o muerte.

Pseudomonas syringae es una bacteria Gram-negativa que causa un gran número de enfermedades denominadas necrosis bacterianas en plantas de cultivos hortícolas y leñosos como frutales. La patogenicidad de *P. syringae* reside en muchos casos en su actividad nucleadora del hielo (INA+) que potencia los daños por helada, y la producción de diversas fitotoxinas como las siringomicinas.

Preferiblemente las plantas que se pueden tratar con los péptidos de la invención se seleccionan entre el grupo formado por árboles frutales, plantas hortícolas, y plantas ornamentales.

Entre los árboles frutales se pueden mencionar los de pepita (manzano, peral), y hueso (melocotonero, albaricquero, ciruelo, cerezo) y el platanero.

Entre las plantas hortícolas se encuentran las solanáceas (tomate, pimiento, patata) y cucurbitáceas (melón, sandía).

Ejemplos de plantas ornamentales son serbal, clavel, espino albar y mostajo.

Los péptidos de la invención también se pueden emplear como agentes antimicrobianos frente a bacterias patógenas de humanos y animales.

Escherichia coli y *Salmonella* sp. son enterobacterias Gram-negativas, que ocasionan típicamente toxiinfecciones alimentarias y causan gastroenteritis, que se combaten con diversos antibióticos y tienen una gran incidencia en la alimentación humana y animal.

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram-positiva que produce infecciones en diversos órganos en peces, aves y mamíferos. En humanos afecta a profesionales que trabajan con animales y también se transmite por alimentos, sobre todo leche, derivados lácteos, productos cárnicos crudos o fermentados, y productos vegetales frescos. Se combate con diversos antibióticos.

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram-positiva que vive en la superficie de la piel de animales, en especial mamíferos, y causa infecciones tanto en la piel como en mucosas y otros órganos, que se tratan con diversos antibióticos, aunque es frecuentemente resistente a antibióticos convencionales, siendo diversas cepas multiresistentes responsables de infecciones nosocomiales. Producen diversas toxinas muy activas en mamíferos.

Con los péptidos de la invención se pueden tratar tanto los animales o humanos, como los alimentos o materiales destinados a estar en contacto con éstos.

Composiciones antimicrobianas

También forma parte del objeto de la invención una composición antimicrobiana que comprende

- a) una cantidad efectiva de al menos un péptido lineal de la invención, y
- b) un agente auxiliar.

El péptido lineal de la invención responde a la fórmula (I):



en donde al menos uno de los aminoácidos es de la serie D.

Entre los péptidos de la invención que resultan ser preferidos para formar parte de dichas composiciones antimicrobianas, se encuentran los péptidos mencionados como preferidos en el apartado anterior denominado Péptidos.

Las composiciones antimicrobianas de la invención presentan buenas propiedades antimicrobianas frente a bacterias patógenas de las plantas y/o de los humanos y/o de los animales. Preferiblemente las composiciones antimicrobianas de la invención son composiciones fitosanitarias que se emplean frente a bacterias patógenas de plantas.

ES 2 332 258 A1

Habitualmente, en las composiciones antimicrobianas se combinan varios principios activos para obtener una mayor eficacia o un espectro más amplio de actuación. En este caso, las composiciones antimicrobianas de la invención también pueden comprender la combinación de varios péptidos de la invención o bien la combinación de éstos con otros agentes antibacterianos para conseguir una mayor eficacia antimicrobiana.

En el caso de composiciones fitosanitarias los péptidos de la invención también se pueden combinar con agentes antifúngicos, y así desplegar una acción antimicrobiana más amplia.

La cantidad de péptido que forma parte de la composición fitosanitaria puede ser variable en función de factores tales como el tipo de planta, la concentración de las bacterias patógenas en la planta, la extensión de la enfermedad, etc. La concentración efectiva del péptido se puede determinar y ajustar fácilmente mediante métodos de rutina bien conocidos por el experto en la materia. Habitualmente la concentración efectiva del péptido se encuentra comprendida entre 0,01 y 0,5 g/l, preferiblemente entre 0,02 y 0,3 g/l, y aún más preferiblemente entre 0,05 y 0,2 g/l.

El agente auxiliar que acompaña los péptidos de la invención en dichas composiciones antimicrobianas puede tener varias funciones, como por ejemplo, facilitar la dosificación del péptido, proporcionar un producto fácilmente manipulable, mejorar el mojado de las plantas con la composición antimicrobiana.

Dicho agente auxiliar puede ser seleccionado entre el grupo formado por disolventes, diluyentes, cargas inertes, agentes tensioactivos humectantes, agentes tamponantes, agentes dispersantes, agentes antiapelmazantes, lubricantes, filtros de la radiación ultravioleta, y/o mezclas de los mismos.

Preferiblemente el agente auxiliar se selecciona entre el grupo formado por disolventes, tensioactivos, agentes tamponantes, filtros de la radiación ultravioleta y/o sus mezclas.

Más preferiblemente el disolvente es agua.

Las composiciones fitosanitarias pueden presentarse en forma líquida o en forma sólida. Por ejemplo, en el caso de formulaciones líquidas, la composición de la invención puede presentarse en forma de una composición diluida lista para ser empleada, o bien en forma de una composición concentrada, que requiere su dilución antes de ser usada, habitualmente con agua.

En el caso de composiciones fitosanitarias líquidas acuosas, la presencia de agentes tensioactivos humectantes facilita el mojado de las plantas cuando se pulverizan con dicha composición.

Una ventaja de los péptidos de la invención es que se pueden disolver en agua con facilidad, y se pueden formular generalmente como disoluciones acuosas sin necesidad de emplear disolventes orgánicos adicionales.

Las composiciones fitosanitarias en forma sólida pueden ser en forma de gránulos, o polvos, en las que los péptidos de la invención se mezclan con cargas inertes finamente divididas como, por ejemplo, caolín, tierra de diatomeas, dolomita, carbonato cálcico, o talco. También pueden presentarse en forma de polvos o gránulos dispersables, que comprenden un agente humectante para facilitar la dispersión de los mismos en el líquido.

Las composiciones antimicrobianas de la invención también se pueden emplear como composiciones farmacéuticas para hacer frente a bacterias patógenas en humanos y en animales.

Dichas composiciones farmacéuticas se pueden formular en formas sólidas tales como granulados, tabletas, cápsulas, grageas y supositorios, en formas semisólidas tales como pomadas, o geles, o en formas líquidas tales como disoluciones inyectables, emulsiones o suspensiones.

Dependiendo de la formulación se pueden utilizar excipientes apropiados bien conocidos por el experto en la materia, como los que se describen en el libro de R.C. Rowe y col. "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 4ª edición. Pharmaceutical Press, Londres, 2003 [ISBN: 0-85359-472-9].

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden administrar por las vías oral, parenteral o rectal, o se pueden utilizar por vía tópica.

Las composiciones útiles por vía oral son, por ejemplo, los granulados, los comprimidos, las cápsulas o las grageas. Son composiciones útiles por vía parenteral, por ejemplo, las emulsiones acuosas, las suspensiones o las disoluciones. Se pueden aplicar por vía tópica las pomadas, las emulsiones y suspensiones acuosas u oleosas así como los pulverizadores.

También forma parte del objeto de la invención un método para prevenir y/o tratar infecciones y enfermedades en plantas causadas por bacterias que comprende poner en contacto la planta con una composición antimicrobiana que incluye los péptidos de la invención.

ES 2 332 258 A1

En el método de la invención la composición antimicrobiana se puede aplicar de forma preventiva a las plantas para evitar la aparición de enfermedades infecciosas causadas por bacterias. El tratamiento preventivo tiene su base en que los péptidos de la invención inhiben el crecimiento de bacterias patógenas de las plantas.

5 Entre los péptidos de la invención que resultan ser preferidos para formar parte de dichas composiciones antimicrobianas, se encuentran los péptidos mencionados como preferidos en el apartado anterior denominado Péptidos.

En el método de la invención, la composición antimicrobiana también se puede emplear para tratar enfermedades infecciosas una vez se ha detectado su presencia en las plantas, ya que los péptidos de la invención inhiben el crecimiento de las bacterias causantes de dichas enfermedades infecciosas.

En esta descripción la expresión “enfermedad infecciosa” se refiere a la invasión y destrucción de un órgano, por ejemplo, hojas, flores, o frutos, por parte de los microorganismos patógenos. Por tanto, se trata de un proceso localizado. En cambio, el término enfermedad se refiere a un proceso que afecta a la planta, dando lugar a unos determinados síntomas.

Preferiblemente el método de la invención se emplea para tratar enfermedades infecciosas provocadas por bacterias patógenas de las plantas seleccionadas entre el grupo formado por *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, y *Pseudomonas syringae*.

Preferiblemente las plantas que se pueden tratar con los péptidos de la invención se seleccionan entre el grupo formado por árboles frutales, plantas hortícolas, y plantas ornamentales.

En el método de la invención, la composición se puede poner en contacto con las partes de las plantas seleccionadas entre el grupo formado por semillas, raíces, tallos, hojas, o frutos, o con el suelo o cualquier medio de crecimiento que rodee las raíces de las plantas.

En el método de la invención, la composición antimicrobiana se puede poner en contacto con la planta por cualquier técnica convencional, entre las que destacan, la pulverización, la inmersión o el riego.

Por ejemplo se puede preparar una disolución acuosa de los péptidos de la invención y proceder a la pulverización de las partes de las plantas afectadas o susceptibles de ser afectadas. Si se trata de los Frutos de un árbol frutal, por ejemplo, también se puede realizar el tratamiento de los mismos por pulverización o por inmersión antes de su cosecha o en post-cosecha.

El tratamiento de las raíces puede llevarse a cabo por ejemplo empleando una composición sólida en la que los péptidos se encuentran dispersos en tina carga inerte, o por pulverización con la mencionada disolución acuosa, o mediante su aplicación por riego.

También forma parte del objeto de la invención un método para tratar enfermedades infecciosas en animales y humanos causadas por bacterias que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de la invención.

Preferiblemente el método de la invención se emplea para tratar enfermedades infecciosas provocadas por bacterias patógenas de los animales y humanos seleccionadas entre el grupo formado por *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, y *Listeria monocytogenes*.

La composición antimicrobiana se puede aplicar para tratar infecciones y enfermedades causadas por bacterias, ya que dichos péptidos inhiben el crecimiento de bacterias patógenas de animales y humanos.

En el método de la invención, la composición antimicrobiana también se puede emplear para tratar dichas enfermedades una vez se ha detectado su presencia, ya que los péptidos de la invención inhiben el crecimiento de las bacterias causantes de dichas infecciones y enfermedades.

En esta descripción la expresión “enfermedad infecciosa” se refiere a la invasión y destrucción de un órgano, por ejemplo, piel, pulmones, sistema gastrointestinal, genitourinario, etc., por parte de los microorganismos patógenos.

En el método de la invención, la composición conteniendo una disolución acuosa de los péptidos de la invención se puede administrar por vía oral o por vía parenteral.

Ensayos biológicos

La actividad antimicrobiana de los péptidos de la invención frente a bacterias patógenas para plantas se ha evaluado mediante la determinación de la concentración mínima de péptido necesaria para inhibir el crecimiento de los microorganismos. Habitualmente dicha concentración se denomina concentración mínima inhibitoria (CMI).

ES 2 332 258 A1

Este tipo de ensayos es habitual en microbiología y es bien conocido por el experto en la materia. Una descripción de la metodología empleada se encuentra por ejemplo en V.L.J. Pelezar Jr, E.C.S. Chan. N.R. Krieg. Microbiology: Concepts and Applications. New York: McGraw-Hill, 1997.

5 Para evaluar dicho efecto antimicrobiano de los péptidos de la invención se emplearon las siguientes cepas de bacterias patógenas: *Erwinia amylovora* PMV6076 (INRA, Angers, Francia), *Xanthomonas vesicatoria* 2133-2 (IVIA, Valencia, España), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* EPS94 (INTEA, Universitat de Girona, España), *Escherichia coli* ATCC11775 (American Type Culture Collection), *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Staphylococcus aureus* ATCC 9144, y *Salmonella typhimurium* LT2 ATCC 15277.

10 Se ha comprobado que las composiciones que comprenden los péptidos de la invención disueltos en agua a concentraciones comprendidas entre 0,8 y 7,5 μM son efectivas para inhibir el crecimiento de bacterias como *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, y/o *Pseudomonas syringae*.

15 Estos resultados demuestran la eficacia de la actividad antimicrobiana de los péptidos de la invención, ya que en Avrahami *et al.* Biochemistry, 2001, 40, 12591-12603, se describe que una concentración inhibitoria mínima inferior a 50 μM es considerada como significativa.

20 Los péptidos de la invención presentan una actividad antimicrobiana igual o superior a la del péptido descrito en el artículo de Badosa *et al.*, y además se puede modular su citotoxicidad frente a células eucariotas y su estabilidad frente a proteasas.

25 Entre los péptidos de la invención se encuentran péptidos activos preferentemente frente a patógenos de plantas como por ejemplo: BP141, BP142, BP144; y también de amplio espectro como por ejemplo: BP147, BP153, BP154, BP160, BP161.

30 La actividad hemolítica de los péptidos es un indicador de la toxicidad en células eucariotas, y una característica que generalmente se determina para aquellos compuestos que pueden llegar a entrar en contacto con el cuerpo humano. Éste sería el caso si frutas u hortalizas tratadas con los péptidos de la invención contuvieran restos de los mismos y fuesen consumidos por las personas, o al ser manipulados por operarios durante su aplicación o preparación.

35 La mencionada actividad hemolítica se ha evaluado mediante la determinación de la liberación de hemoglobina que se produce al poner en contacto una solución de dichos péptidos en tampón de TRIS con suspensiones de eritrocitos al 5% en volumen/volumen procedentes de sangre humana fresca. El resultado de dicha determinación se expresa como el porcentaje de hemólisis que se produce para una concentración conocida de péptido. Una descripción de la metodología empleada para la determinación de la actividad hemolítica se encuentra en Oren *et al.* Biochemistry, 2000, 39, 6103-6114, y en Raguse *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2002, 124, 12774-12785.

40 Se ha comprobado que la gran mayoría de los péptidos de la invención presentan una actividad hemolítica significativa a una concentración que puede llegar a ser varios órdenes de magnitud superior a la concentración a la que son activos para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas.

45 La estabilidad de los péptidos a la degradación por proteasas es una característica que permite evaluar que los péptidos se encuentren inalterados en la planta o en el cuerpo humano o en el cuerpo de los animales durante un tiempo de vida medio razonable. Los péptidos pueden ser degradados tanto por proteasas como por microorganismos.

50 La estabilidad de los péptidos a la degradación por proteasas se ha evaluado mediante el tratamiento de soluciones de los péptidos en tampón TRIS con Proteinasa K (Sigma-Aldrich), y la monitorización de su degradación por HPLC a diferentes intervalos de tiempo. La degradación se expresa como el porcentaje de péptido degradado después de 45 minutos calculados a partir de la disminución del área del pico del péptido nativo por HPLC. Una descripción de la metodología empleada para la determinación de la estabilidad a proteasas se encuentra en Rozek *et al.*, Biochemistry, 2003, 42, 14130-14138.

55 Se ha comprobado que algunos péptidos de la invención son mucho más estables a la degradación por proteasas que el péptido descrito por Badosa *et al.*

60

65

ES 2 332 258 A1

En la Tabla IV se presentan la citotoxicidad (H_{250} , hemólisis a $250 \mu M$) y la degradación frente a proteasas a los 45 minutos de algunos de los péptidos de la invención para poner de manifiesto que es posible modular dichas propiedades con dichos péptidos solos o en combinación:

TABLA IV

SEQ_ID_NO:	Referencia	Secuencia	H_{250} (%)	Degradación (%)
4	BP141	KKLFKKI <u>I</u> KYL	4	1
5	BP142	KKLF <u>k</u> KILKYL	3	35
6	BP143	KKL <u>f</u> KKILKYL	5	18
7	BP144	KKI <u>f</u> KKILKYL	7	50
8	BP145	K <u>k</u> LFKKILKYL	51	61
9	BP146	KKLFK <u>k</u> ILKYL	53	24
10	BP147	<u>k</u> KLFKKILKYL	70	47
16	BP153	<u>kklfkkilkyl</u>	50	5
21	BP158	KKLF <u>kkilkyl</u>	28	0
22	BP159	KKL <u>fkkilkyl</u>	58	12
23	BP160	KKI <u>fkkilkyl</u>	65	0
24	BP161	K <u>klfkkilkyl</u>	66	1
12	BP149	KKI <u>f</u> KKIL <u>k</u> YL	0	6
13	BP150	KKLFKKI <u>Ik</u> YL	1	0
14	BP151	KKI <u>f</u> KK <u>Il</u> kYL	1	0
15	BP152	KKLFKK <u>Ik</u> YL	5	1
17	BP154	<u>k</u> KL <u>f</u> KKILKYL	41	37

Se puede observar que la actividad hemolítica no está directamente relacionada con el número de aminoácidos de la serie D que figuran en un determinado péptido.

Así, se pueden encontrar péptidos con una baja actividad hemolítica que tienen o bien un único aminoácido de la serie D (BP142) o bien varios (BP151). Análogamente, se pueden encontrar péptidos con una actividad hemolítica considerable que tienen o bien un único aminoácido de la serie D (BP147) o bien varios (BP161).

También se puede observar que la degradación frente a proteasas tampoco está relacionada con el número de aminoácidos de la serie D que figuran en un determinado péptido.

ES 2 332 258 A1

De esta forma se pueden encontrar péptidos con una baja degradación que tienen o bien un único aminoácido de la serie D (BP141) o bien varios (BP161). Análogamente, se pueden encontrar péptidos que sufren una degradación considerable que tienen o bien un único aminoácido de la serie D (BP145) o bien varios (BP154).

5

Así pues, con los péptidos antimicrobianos de la invención se dispone de compuestos antimicrobianos frente a bacterias patógenas de plantas y/o humanos y/o animales, cuya citotoxicidad frente a células eucariotas y degradación frente a las proteasas se puede modular tal como se muestra en la Tabla V:

10

TABLA V

Hemólisis (H ₂₅₀)	Degradación	Ejemplos
Alta	Alta	BP154, BP147
Baja	Alta	BP142, BP144
Alta	Baja	BP160, BP161
Baja	Baja	BP150, BP151

15

20

25

A continuación, a los efectos de completar de forma suficiente la anterior descripción, se exponen los siguientes ejemplos.

30

Ejemplos

35

En los ejemplos que siguen se emplean las siguientes abreviaciones: BHI, Brain Heart infusion; Boc: *tert*-butiloxi-carbonilo; t-Bu: *tert*-butilo; CMI: concentración mínima inhibitoria; DIEA: N,N-diisopropiletilamina; DMF: N,N-dimetilformamida; EDTA, ácido etilendiaminotetracético; ESI-MS: espectrometría de masas con ionización por electropulverización; Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonilo; HBTU: hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il)(dimetilamino)metil]-N-metilmetanaminio; HOBt: 1-hidroxibenzotriazol; HPLC: cromatografía líquida de alta resolución; LB: Luria Bertani; MBHA: 4-metilbencidrilamina; NMP: N-metilpirrolidona; TFA: ácido trifluoroacético; TIS: triisopropilsilano; TRIS: tris(hidroximetil)aminometano; TSB: Trypticase Soy Broth; VV: ultravioleta.

40

Los productos Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-D-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-D-Ile-OH, Fmoc-D-Tyr(tBu)-OH, la resina Fmoc-Rink-MBHA funcionalizada con grupos amino, HOBt y HBTU, se obtuvieron de Iris Biotech. Los productos ácido trifluoroacético, N-metilpirrolidona, y TIS se obtuvieron de Aldrich. Los productos piperidina y DIEA se obtuvieron de Fluka.

45

Las siguientes indicaciones sobre el procedimiento para la preparación de los péptidos son de carácter general:

50

- Se emplearon aminoácidos que tienen el grupo α -amino protegido con el grupo Fmoc.
- Para la protección de la cadena lateral de la lisina se empleó el grupo *tert*-butiloxi-carbonilo (Boc). Para la protección de la cadena lateral de la tirosina se empleó el grupo *tert*-butilo (t-Bu).
- Las reacciones se llevaron a cabo en jeringas de 2 ml que tenían incorporado un Filtro microporoso de polipropileno.
- Todas las transformaciones y lavados se llevaron a cabo a 25°C, a no ser que se indique lo contrario.
- El análisis por HPLC se llevó a cabo con un flujo de 1.0 ml/min empleando una columna de fase reversa Kromasil (4.6 × 40 mm: tamaño de partículas de 3,5 μ m). Se emplearon gradientes lineales con TFA acuoso al 0.1% y TFA en acetonitrilo al 0.1%, con una relación comprendida entre 0.98:0.02 y 0.98:0.1 durante un periodo de tiempo de 7 minutos con detección UV a una longitud de onda de 220 nm.
- Los espectros ESI-MS fueron adquiridos empleando un instrumento Esquire 6000 ESI ion Trap LC/MS (Bruker Daltonics), operando en el modo positivo de iones (ES+).
- Todas las relaciones entre los disolventes son volumen/volumen, a no ser que se especifique otro tipo de proporción.

65

ES 2 332 258 A1

Ejemplo I

Preparación de Lys-Lys-Leu-D-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂ (KKLfKKILKYL-NH₂ SEQ ID NO: 6, BP143)

5 En una jeringa de 2 ml de capacidad, equipada con un filtro microporoso en la parte inferior, se colocaron 30 mg de resina Fmoc-Rink-MBHA con una funcionalización de 0.66 mmol/g, equivalentes a 19,8 μ moles de grupos amino, y se llenó la jeringa con disolvente para hinchar-lavar la resina de acuerdo con la siguiente secuencia: CH₂Cl₂ (1 \times 20 min) y DMF (1 \times 20 min). La expresión CH₂Cl₂ (1 \times 20 min) se refiere a que se realizó 1 lavado de 20 minutos con cloruro de metileno. Después de cada etapa de lavado se eliminó el disolvente mediante un filtrador de vacío múltiple
10 (Vac Man Laboratory Vacuum Manifold de Promega Distribuidora).

Después de hinchar-lavar la resina, ésta se trató con una mezcla de piperidina y DMF (3:7, 1 \times 2 min y 1 \times 10 min) para eliminar el grupo Fmoc presente en el grupo amino del espaciador bifuncional, y, a continuación, se lavó con DMF (6 \times 1 min).
15

Seguidamente la resina se trató con 28 mg de Fmoc-Leu-OH (79 μ moles), 28 mg de HBTU (75 μ moles), 11 mg de HOBt (79 μ moles) y 27 μ l de DIEA (154 μ moles) en 0,1 ml de DMF. Después de 1 h se lavó la resina con DMF (6 \times 1 min) y se comprobó que el test de ninhidrina era negativo (Kaiser *et al*, Anal. Biochem., 1970, 34, 595-598).

20 La eliminación del grupo Fmoc y los lavados subsiguientes se realizaron como ya se ha descrito anteriormente.

El ciclo de acoplamiento-desprotección se repitió para los siguientes cuatro aminoácidos protegidos con el grupo N^o-Fmoc: Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH y Fmoc-Ile-OH. En cada etapa se procedió al lavado con DMF (6 \times 1 min).
25

A partir del quinto aminoácido incorporado, tanto la eliminación del grupo Fmoc, los ciclos acoplamiento-desprotección como los correspondientes lavados se realizaron de la misma manera substituyendo en estos casos la DMF por NMP. Los seis últimos aminoácidos se incorporaron protegidos con el grupo N^o-Fmoc: Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Phe-OH y Fmoc-Leu-OH. Para la incorporación de los dos últimos aminoácidos se realizaron 2-3 acoplamientos sucesivos para obtener un test de ninhidrina negativo.
30

Después de eliminar el grupo Fmoc del último aminoácido acoplado, como ya se ha descrito anteriormente, se lavó la resina con NMP (6 \times 1 min) y CH₂Cl₂ (6 \times 1 min), y se obtuvo el péptido lineal unido a la resina, Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-D-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Leu-Rink-MBHA. A continuación se escindió el péptido de la resina mediante un tratamiento con 1 ml de una mezcla de TFA, agua y TIS (95:2,5:2,5) durante 2 horas. Se recogieron los filtrados en un vial mediante una presión positiva de nitrógeno. La resina se lavó con una mezcla de TFA, agua y TIS (95:2,5:2,5, 2 \times 0,5 ml). Los filtrados se combinaron y se evaporaron casi a sequedad bajo una corriente de nitrógeno hasta obtener un aceite. Dicho aceite se precipitó con éter dietílico, se centrifugó, y el éter se decantó. Este proceso se repitió 3 o 4 veces. Finalmente, el producto sólido obtenido se disolvió en agua, y se liofilizó.
40

Se obtuvo un sólido pulverulento que tenía una pureza superior al 80% analizada por HPLC (tiempo de retención 6,28 minutos), y su estructura se confirmó por FSI-MS.

45 Ejemplos 2 a 24

Preparación de péptidos de la invención

50 Siguiendo un procedimiento análogo al descrito en el Ejemplo 1 se prepararon los péptidos de la invención que se muestran en la Tabla VI:

TABLA VI

Ejemplo	SEQ_ID_NO	Referencia	Secuencia
2	1	BP138	KKLFKKILK <u>Y</u> L
3	2	BP139	KKLFKKILK <u>Y</u> I
4	3	BP140	KKLFKKIL <u>k</u> YL
5	4	BP141	KKLFKKI <u>l</u> KYL
6	5	BP142	KKLF <u>k</u> ILKYL

ES 2 332 258 A1

5	7	BP144	KKI <u>F</u> KKILKYL
	8	BP145	K <u>k</u> LFFKKILKYL
10	9	BP146	KKLFFK <u>k</u> ILKYL
	10	BP147	<u>k</u> KLFFKKILKYL
15	11	BP148	KKLFFKK <u>i</u> LKYL
	12	BP149	KKI <u>F</u> KKIL <u>k</u> YL
20	13	BP150	KKLFFKKI <u>l</u> kYL
	14	BP151	KKI <u>F</u> KK <u>i</u> L <u>k</u> YL
25	15	BP152	KKLFFKK <u>i</u> l <u>k</u> YL
	16	BP153	<u>kklfkkilkyl</u>
30	17	BP154	<u>kkLf</u> KKILKYL
35	18	BP155	KKLFFKKI <u>l</u> kyl
	19	BP156	KKLFFKK <u>i</u> l <u>kyl</u>
40	20	BP157	KKLFFK <u>kil</u> kyl
	21	BP158	KKL <u>Fkk</u> ilkyl
45	22	BP159	KKL <u>fk</u> ilkyl
50	23	BP160	KKI <u>fk</u> ilkyl
	24	BP161	<u>Kklfkkilkyl</u>
55			

Todos los péptidos de la Tabla VI tienen un grupo carboxamida en el grupo C-terminal.

Ejemplo 25

Ensayos de actividad antimicrobiana

5 El efecto antimicrobiano de los péptidos de la invención se determinó frente a cepas de bacterias fitopatógenas y cepas patógenas de importancia en clínica humana. Las cepas fitopatógenas corresponden a: *Erwinia amylovora* PMV6076 (IN-RA, Angers, Francia), *Xanthomonas vesicatoria* 2133-2 (IVIA, Valencia, España), y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* EPS94 (INTEA, Universitat de Girona, España). Las cepas patógenas de clínica humana corresponden a: *Escherichia coli* ATCC11775 (American Type Culture Collection), *Listeria monocytogenes* ATCC15313,
10 *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 y *Salmonella typhimurium* LT2 ATCC 15277.

Todas las bacterias se conservaron a una temperatura de -80°C en medio Luria-Bertani (LB) complementado con glicerina al 20% en volumen/volumen.

15 Las suspensiones de las bacterias *E. amylovora* PMV6076 y *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 se obtuvieron después de un crecimiento de 24 horas a 25°C en agar LB. *X. vesicatoria* 2133-2 se obtuvo después de la incubación durante 48 horas a 25°C en agar LB. En cuanto a las cepas de *E. coli* ATCC 1 1775, *S. aureus* ATCC 9144 y *S. typhimurium* LT2 ATCC 15277 se obtuvieron después de un crecimiento de 24 horas a 37°C en agar LB y *L. monocytogenes* ATCC 15313 se obtuvo después de la incubación durante 24 horas a 37°C en medio Brain Heart Infusion (BHI). En todos los
20 casos se resuspendieron en agua estéril para obtener una suspensión ajustada a una absorbancia de 0.2 a 600 nm, que correspondía aproximadamente a 10⁸ unidades formadoras de colonias/ml.

Para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), los péptidos se solubilizaron en agua estéril milli-Q hasta una concentración final de 1000 µM y se esterilizaron a través de un filtro de 0,22 µm de poro.

25 Se realizaron diluciones de los péptidos de la invención para obtener soluciones a las concentraciones 500: 250: 125: 100: 75: 62.5: 50: 31,2: 25: 16.5; 12,5 y 8 µM.

Se mezclaron 20 µl de cada dilución con 20 µl de la suspensión del indicador bacteriano correspondiente, y 160
30 µl de medio líquido correspondiente (Trypticase Soy Broth (TSB), para las bacterias fitopatógenas *X. vesicatoria*, *E. amylovora* y *P. syringae*: LB para *E. coli*, *S. aureus* y *S. typhimurium* y BHI para *L. monocytogenes*), hasta un volumen total de 200 µl en cada pocillo de una microplaca. Así las concentraciones efectivas a las que se sometían las suspensiones de bacterias fueron 50: 25: 12.5: 10: 7,5: 6.25; 5: 3.12: 2,5: 1,65: 1.25 y 0,8 µM.

35 Se llevaron a cabo tres réplicas para cada cepa, concentración y péptido en ensayo.

Los controles positivos contenían agua en lugar de péptido, y los controles negativos contenían los péptidos sin la suspensión bacteriana.

40 El crecimiento microbiano se determinó automáticamente mediante la medida de la densidad óptica a 600 nm empleando el Microbiology Analyser Bioscreen C (Labsystems).

Las microplacas se incubaron a 25°C para *E. amylovora*, *P. syringae* y *X. vesicatoria* y a 37°C para *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *S. aureus* y *E. coli* durante 48 horas con una agitación de 10 segundos antes de la medida de
45 la absorbancia cada hora. Cada experimento se realizó dos veces.

Como CMI se tomó la concentración de péptido más baja a la que no se producía crecimiento bacteriano al final del experimento.

50 En la Tabla VII se presenta el rango de concentraciones entre las que se encuentra la CMI, expresada en µM, después de 48 h de incubación a 25°C, para diferentes péptidos de la invención frente a las bacterias *Xanthomonas vesicatoria* (X v.), *Pseudomonas syringae* (P.s.) y *Erwinia amylovora* (E.a.).

55

60

65

ES 2 332 258 A1

TABLA VII

Ejemplo	Referencia	Secuencia	X.v.	P.s.	E.a.
Comparativo	BP100	KKLFFKKILKYL	5-7.5	2.5-5	2.5-5
5	BP141	KKLFFKKIILKYL	>7.5	2.5-5	2.5-5
6	BP142	KKLFFKILKYL	>7.5	2.5-5	5-7.5
7	BP143	KKLFFKKILKYL	5-7.5	2.5-5	2.5-5
8	BP144	KKLFFKKILKYL	>7.5	2.5-5	>7.5
9	BP145	KKLFFKKILKYL	5-7.5	2.5-5	2.5-5
10	BP146	KKLFFKILKYL	>7.5	2.5-5	>7.5
11	BP147	KKLFFKKILKYL	2.5-5	2.5-5	2.5-5
14	BP150	KKLFFKKIILKYL	3.12-6.25	12.5-25	6.25-12.5
17	BP153	kklfkkilkyl	0.8-1.65	1.65-3.12	1.65-3.12
18	BP154	kkLffKKILKYL	6.25-12.5	3.12-6.25	6.25-12.5
20	BP156	KKLFFKkilkyl	5 - 7.5	2.5 - 5	12.5 - 25
21	BP157	KKLFFKkilkyl	2.5 - 5	2.5 - 5	2.5 - 5
22	BP158	KKLFFkilkyl	2.5 - 5	1.25 - 2.5	2.5 - 5
23	BP159	KKLffkilkyl	2.5 - 5	1.25 - 2.5	2.5 - 5
24	BP160	Kklfkkilkyl	1.25 - 2.5	1.25 - 2.5	2.5 - 5
25	BP161	Kklfkkilkyl	1.25 - 2.5	1.25 - 2.5	1.25 - 2.5

Se puede comprobar que los péptidos de la invención presentan una buena eficacia para inhibir el crecimiento de las bacterias *Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae*, y/o *Erwinia amylovora*, siendo muchos de ellos más activos que el péptido ya conocido, cuyos resultados se presentan en la primera fila de la tabla anterior bajo la denominación de Ejemplo comparativo y referencia BP100.

ES 2 332 258 A1

En la Tabla VIII se presenta el rango de concentraciones entre las que se encuentra la CMI, expresada en μM , después de 48 h de incubación a 25°C, para diferentes péptidos de la invención frente a las bacterias patógenas para humanos y/o animales *Escherichia coli* (E.c.), *Staphylococcus aureus* (S.a.), *Salmonella typhimurium* (S.t.), y *Lysteria monocytogenes* (L.m):

TABLA VIII

Ejemplo	Ref.	Secuencia	E. c.	S. a.	S. t.	L. m.
Comparativo	BP100	KKLFKKILKYL	2.5-5	>20	5-10	>15
8	BP144	KKI F KKILKYL	12.5-25	>50	6.25-12.5	>50
9	BP145	K k LFFKKILKYL	<6.25	>50	<6.25	12.5-25
10	BP146	KKLFFK k ILKYL	12.5-25	25-50	6.25-12.5	>50
11	BP147	k KLFFKKILKYL	<6.25	25-50	<6.25	25-50
13	BP149	KKI F KKIL k YL	<6.25	>50	>50	>50
17	BP153	kk l fk kkil ky l	<6.25	25-50	<6.25	<6.25
18	BP154	kk L f KKILKYL	<6.25	>50	6.25-12.5	12.5-25
20	BP156	KKLFFK k il ky l	<6.25	25-50	6.25-12.5	25-50
21	BP157	KKLFFK kk il ky l	6.25-12.5	12.5-25	6.25-12.5	12.5-25
22	BP158	KKL F kk il ky l	<6.25	25-50	12.5-25	25-50
23	BP159	KKL f kk il ky l	<6.25	12.5-25	6.25-12.5	12.5-25
24	BP160	Kk l fk kkil ky l	<6.25	25-50	<6.25	12.5-25
25	BP161	Kk l fk kkil ky l	<6.25	12.5-25	<6.25	6.25-12.5

ES 2 332 258 A1

Se puede comprobar que los péptidos de la invención presentan una buena eficacia para inhibir el crecimiento de las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurim*, y *Listeria monocytogenes*, siendo muchos de ellos más activos que el péptido ya conocido, cuyos resultados se presentan en la primera fila de la tabla anterior bajo la denominación de Ejemplo comparativo y referencia BP100.

5

Ejemplo 26

Ensayos de actividad hemolítica

10

La actividad hemolítica de los péptidos de la invención se evaluó mediante la determinación de la liberación de hemoglobina que se produce al poner en contacto una solución de los péptidos con una suspensión de eritrocitos al 5% en volumen procedentes de sangre humana fresca.

15

La sangre se recogió asépticamente empleando un sistema Vacutainer K2E (Belliver, Gran Bretaña) con EDTA, y se almacenó a 4°C durante un período inferior a 2 horas.

20

La sangre se centrifugó a 6.000 g durante 5 minutos para separar los eritrocitos. Éstos se lavaron tres veces con tampón TRIS (10 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7,2), y se suspendieron en tampón TRIS hasta obtener una suspensión que contenía un 10% en volumen de eritrocitos.

Los péptidos se solubilizaron en tampón TRIS hasta una concentración final de 500 µM.

25

Se emplearon tres réplicas para cada péptido y concentración.

Se mezclaron 65 µl de la suspensión de eritrocitos al 10% en volumen con 65 µl de la solución de péptido en cada pocillo de una placa de 96 pocillos Micro-Amp (Applied Biosystems, EE.UU.) (5% en volumen de eritrocitos), y se incubó la mezcla durante 1 h a 37°C bajo agitación. De este modo las suspensiones de eritrocitos se sometieron a una concentración de péptido de 250 µM.

30

A continuación se centrifugaron las placas a 3.500 g durante 10 minutos, y se transfirieron alicuotas de 80 µl del sobrenadante a microplacas de 100 pocillos (Bioscreen), que se diluyeron con 80 µl de agua milli-Q.

35

El grado de hemólisis se determinó a partir de la absorbancia a 540 nm con un lector de placas Bioscreen.

El control positivo de hemólisis completa se determinó en una solución de tampón TRIS que contenía melitina 200 µM (Sigma-Aldrich, España).

40

El porcentaje de hemólisis (H) se determinó empleando la ecuación:

$$H = 100 \times [(Op - Ob) / (Om - Ob)]$$

45

donde Op es la densidad óptica medida para una concentración de péptido determinada, Ob es la densidad óptica de la solución tampón, y Om es la densidad óptica para el control positivo con melitina.

50

En la Tabla IX se presentan los resultados de actividad hemolítica, expresada como el porcentaje de hemólisis calculado según la ecuación anterior, para una concentración de péptidos de la invención correspondiente a 250 µM. En dicha Tabla se incluye el resultado obtenido con el péptido descrito por Badosa *et al*, como Ejemplo comparativo y referencia BP100.

55

TABLA IX

Ejemplo	Referencia	Secuencia	H ₂₅₀ (%)
Comparativo	BP100	KKLFFKKILKYL	54
5	BP141	KKLFFKKIKYL	4

65

ES 2 332 258 A1

6	BP142	KKLF <u>k</u> KILKYL	3
7	BP143	KKL <u>f</u> KKILKYL	5
8	BP144	KKI <u>f</u> KKILKYL	7
9	BP145	K <u>k</u> LFKKILKYL	51
10	BP146	KKLFF <u>k</u> ILKYL	53
11	BP147	<u>k</u> KLFFKKILKYL	70
14	BP150	KKLFFKKI <u>k</u> YL	1
17	BP153	<u>kklfkkilkyl</u>	50
18	BP154	<u>kkL</u> <u>f</u> KKILKYL	41
20	BP156	KKLFFK <u>kilkyl</u>	49
21	BP157	KKLFF <u>kilkyl</u>	59
22	BP158	KKLFF <u>kkilkyl</u>	28
23	BP159	KKL <u>fkkilkyl</u>	58
24	BP160	K <u>klfkkilkyl</u>	65
25	BP161	K <u>klfkkilkyl</u>	66

En todos los casos se observa que la concentración en la que se llegaría a producir una hemólisis significativa puede llegar a ser varios órdenes de magnitud superior a la concentración en la que los péptidos de la invención presentan actividad antimicrobiana.

Ejemplo 27

Ensayos de estabilidad a la degradación por proteasas

La estabilidad de los péptidos de la invención a la degradación por proteasas se determinó mediante un ensayo de digestión del péptido por Proteinasa K (Sigma-Aldrich Corporation, Madrid, España).

Se empleó una disolución de 50 µg/ml de péptido y de 1 µg/ml de Proteinasa K en tampón TRIS 100 mM a pH 7,6, a temperatura ambiente.

El progreso de la hidrólisis del péptido se determinó cromatográficamente a tiempos comprendidos entre 5 minutos y 1 hora. Para ello se empleó una columna C₁₈ de fase reversa (Kromasil, 4,6 × 40 mm: 3,5 µm de tamaño de partícula), y gradientes lineales de TFA acuoso al 0,1% y TFA en acetonitrilo al 0,1% desde 0,98:0,02 a 0:1 durante 7 min realizando la detección mediante absorbancia en el ultravioleta a 220 nm.

ES 2 332 258 A1

En la Tabla X se presentan los resultados de estabilidad a la degradación por proteasas de algunos de los péptidos de la invención.

La estabilidad se expresa como el porcentaje de degradación de cada péptido a los 45 minutos. En dicha Tabla se incluye como Ejemplo comparativo y referencia BP 100 el resultado correspondiente al péptido descrito en Badosa *et al.*

TABLA X

Ejemplo	Referencia	Secuencia	Degradación (%)
Comparativo	BP100	KKLFFKKILKYL	75
5	BP141	KKLFFKKI KYL	1
6	BP142	KKL FkKILKYL	35
7	BP143	KKL fKKILKYL	18
8	BP144	KKI fKKILKYL	50
9	BP145	KkLFFKKILKYL	61
10	BP146	KKLFFk ILKYL	24
11	BP147	k KLFFKKILKYL	47
13	BP149	KKI fKKILkYL	6
17	BP153	<u>kk ffkkilkyl</u>	5
18	BP154	<u>kkL fKKILKYL</u>	37
22	BP158	KKLFF <u>kkilkyl</u>	0
23	BP159	KKL <u>fkkilkyl</u>	12
24	BP160	Kk <u>ffkkilkyl</u>	0
25	BP161	<u>Kk ffkkilkyl</u>	1

Se puede observar que es posible modular la degradación por proteasas de los péptidos antimicrobianos de la invención, de modo que se puede ajustar dicha degradación en función de las necesidades de la aplicación.

ES 2 332 258 A1

Texto libre de la lista de secuencias

Traducción por orden alfabético

- 5 • Artificial sequence: Secuencia artificial
- Linear peptides containing D-amino acids: Péptidos lineales conteniendo aminoácidos de la serie D
- PatentIn version 3.3: PatentIn versión 3.3
- 10 • PEPTIDE: Péptido
- Residue: Residuo
- 15 • Residues 2 to 11 are D-amino acids: los residuos 2 a 11 son aminoácidos de la serie D
- Residues 3 to 11 are D-amino acids: los residuos 3 a 11 son aminoácidos de la serie D
- Residues 4 to 11 are D-amino acids: los residuos 4 a 11 son aminoácidos de la serie D
- 20 • Residues 5 to 11 are D-amino acids: los residuos 5 a 11 son aminoácidos de la serie D
- Residues 6 to 11 are D-amino acids: los residuos 6 a 11 son aminoácidos de la serie D
- 25 • Residues 7 to 11 are D-amino acids: los residuos 7 a 11 son aminoácidos de la serie D
- Residues 8 to 11 are D-amino acids: los residuos 8 a 11 son aminoácidos de la serie D
- 30 • SEQUENCE LISTING: Listado de secuencias
- University of Girona: Universidad de Girona
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

ES 2 332 258 A1

REIVINDICACIONES

1. Péptidos lineales antimicrobianos que responden a la fórmula (I):

5

KKLFFKKILKYL

(I)

10

caracterizados porque al menos uno de los aminoácidos es de la serie D, y en donde el aminoácido leucina del extremo C-terminal está en forma de grupo carboxilo o carboxamida,

2. Péptidos según la reivindicación 1, **caracterizados** porque incluyen un residuo de aminoácido de la serie D en cualquiera de las posiciones 1 a 8.

15

3. Péptidos según la reivindicación 2 seleccionados entre el grupo formado por los péptidos definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10.

4. Péptido según la reivindicación 3, **caracterizado** por la SEQ_ID_NO: 6.

20

5. Péptidos según la reivindicación 1, **caracterizados** porque incluyen entre cinco y once aminoácidos de la serie D consecutivos.

6. Péptidos según la reivindicación 5 seleccionados entre el grupo formado por los péptidos definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 16, 19, 20, 21, 22, 23 y 24.

25

7. Péptidos según la reivindicación 6 seleccionados entre el grupo formado por los péptidos definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 16 y 21.

8. Péptidos según la reivindicación 1, **caracterizados** porque incluyen dos o tres aminoácidos de la serie D.

30

9. Péptidos según la reivindicación 8 seleccionados entre el grupo formado por los péptidos definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 12, 13, 14, 15 y 17.

10. Péptidos según la reivindicación 9 seleccionados entre el grupo formado por los péptidos definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 13 y 14.

35

11. Péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizados** porque el grupo C-terminal es un grupo carboxamida.

40

12. Péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para uso como medicamento.

13. Utilización de los péptidos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 como agentes antimicrobianos.

45

14. Utilización de los péptidos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la preparación de un medicamento para tratar enfermedades infecciosas en animales y humanos.

15. Utilización según la reivindicación 13 como agentes antimicrobianos frente a bacterias patógenas de las plantas.

50

16. Utilización según la reivindicación 13 como agentes antimicrobianos frente a bacterias patógenas de animales y humanos.

17. Utilización de los péptidos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para preparar un medicamento para tratar enfermedades infecciosas en humanos y animales causadas por bacterias.

55

18. Utilización de los péptidos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la preparación de una composición antimicrobiana.

19. Composición antimicrobiana **caracterizada** porque comprende

60

a) una cantidad efectiva de al menos un péptido lineal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y

b) un agente auxiliar.

65

20. Método para tratar enfermedades infecciosas en plantas causadas por bacterias **caracterizado** porque comprende poner en contacto la planta con una composición antimicrobiana según la reivindicación 19.

ES 2 332 258 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> university of Girona

5 <120> Linear peptides containing D-amino acids

<130> P09032310

10 <160> 24

<170> PatentIn version 3.3

15 <210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

20 <220>
<223> Linear peptide containing D-amino acids

25 <220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(11)
<223> Residue 10 = D-Tyr

30 <400> 1
Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10

35 <210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Linear peptide containing D-amino acids

45 <220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(11)
<223> Residue 11 = D-Leu

50 <400> 2
Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10

55 <210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

60 <220>
<223> Linear peptide containing D-amino acids

65 <220>
<223> Linear peptide containing D-amino acids

ES 2 332 258 A1

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(11)
5 <223> Residue 9 = D-Lys

<400> 3
10 Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
 1 5 10

<210> 4
<211> 11
15 <212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
20 <223> Linear peptide containing D-amino acids

<220>
<221> PEPTIDE
25 <222> (1)..(11)
<223> Residue 8 = D-Leu

<400> 4
30 Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
 1 5 10

<210> 5
35 <211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

40 <220>
<223> Linear peptide containing D-amino acids

<220>
45 <221> PEPTIDE
<222> (1)..(11)
<223> Residue 5 = D-Lys

50 <400> 5
 Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
 1 5 10

55 <210> 6
<211> 11
<212> PRT
60 <213> Artificial sequence

<220>
<223> Linear peptide containing D-amino acids

65 <220>
<221> PEPTIDE

ES 2 332 258 A1

<222> (1)..(11)

<223> Residue 4 = D-Phe

5 <400> 6

Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10

10 <210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

15

<220>

<223> Linear peptide containing D-amino acids

20 <220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(11)

<223> Residue 3 = D-Leu

25

<400> 7

Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10

30

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

35

<213> Artificial sequence

<220>

40

<223> Linear peptide containing D-amino acids

<220>

<221> PEPTIDE

45

<222> (1)..(11)

<223> Residue 2 = D-Lys

<400> 8

50

Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10

<210> 9

55

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

60 <220>

<223> Linear peptide containing D-amino acids

<220>

65

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(11)

<223> Residue 6 = D-Lys

ES 2 332 258 A1

<400> 9
Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10

5
<210> 10
<211> 11
<212> PRT
10 <213> Artificial sequence

<220>
15 <223> Linear peptide containing D-amino acids

<220>
<221> PEPTIDE
20 <222> (1)..(11)
<223> Residue 1 = D-Lys

<400> 10
25 Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10

<210> 11
30 <211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

35 <220>
<223> Linear peptide containing D-amino acids

<220>
40 <221> PEPTIDE
<222> (1)..(11)
<223> Residue 7 = D-Ile

45 <400> 11
Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10

50 <210> 12
<211> 11
<212> PRT
55 <213> Artificial sequence

<220>
60 <223> Linear peptide containing D-amino acids

<220>
<221> PEPTIDE
65 <222> (1)..(11)
<223> Residue 3 = D-Leu; Residue 9 = D-Lys

ES 2 332 258 A1

<400> 12

Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10

5

<210> 13

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

15 <223> Linear peptide containing D-amino acids

<220>

<221> PEPTIDE

20 <222> (1)..(11)

<223> Residue 8 = D-Leu; Residue 9 = D-Lys

<400> 13

25

Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10

30 <210> 14

<211> 11

<212> PRT

35 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Linear peptide containing D-amino acids

40 <220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(11)

45 <223> Residue 3 = D-Leu; Residue 6 = D-Lys; Residue 9 = D-Lys

<400> 14

50

Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10

<210> 15

<211> 11

55 <212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

60 <223> Linear peptide containing D-amino acids

<220>

<221> PEPTIDE

65 <222> (1)..(11)

<223> Residue 7 = D-Ile; Residue 8 = D-Leu; Residue 9 = D-Lys

ES 2 332 258 A1

<400> 15

Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10

5

<210> 16

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

15 <223> Linear peptide containing D-amino acids

<220>

<221> PEPTIDE

20 <222> (1)..(11)

<223> All residues in the sequence are D-amino acids

<400> 16

25

Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10

30 <210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

35

<220>

<223> Linear peptide containing D-amino acids

40 <220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(11)

45 <223> Residue 1 = D-Lys; Residue 2 = D-Lys; Residue 4 = D-Phe

<400> 17

50

Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10

<210> 18

55 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

60 <220>

<223> Linear peptide containing D-amino acids

<220>

65 <221> PEPTIDE

<222> (1)..(11)

<223> Residues 8 to 11 are D-amino acids

ES 2 332 258 A1

<400> 18

Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10

5

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

10

<213> Artificial sequence

<220>

15

<223> Linear peptide containing D-amino acids

<220>

<221> PEPTIDE

20

<222> (1)..(11)

<223> Residues 7 to 11 are D-amino acids

<400> 19

25

Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10

30

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

35

<220>

<223> Linear peptide containing D-amino acids

40

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(11)

<223> Residues 6 to 11 are D-amino acids

45

<400> 20

Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10

50

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

55

<213> Artificial sequence

<220>

60

<223> Linear peptide containing D-amino acids

<220>

<221> PEPTIDE

65

<222> (1)..(11)

<223> Residues 5 to 11 are D-amino acids

ES 2 332 258 A1

<400> 21
Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10
5
<210> 22
<211> 11
<212> PRT
10 <213> Artificial sequence

<220>
15 <223> Linear peptide containing D-amino acids

<220>
<221> PEPTIDE
20 <222> (1)..(11)
<223> Residues 4 to 11 are D-amino acids

<400> 22
25 Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10

30 <210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

35 <220>
<223> Linear peptide containing D-amino acids

40 <220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(11)
<223> Residues 3 to 11 are D-amino acids

45 <400> 23
Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10
50

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
55 <213> Artificial sequence

<220>
60 <223> Linear peptide containing D-amino acids

<220>
<221> PEPTIDE
65 <222> (1)..(11)
<223> Residues 2 to 11 are D-amino acids

ES 2 332 258 A1

<400> 24

Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Leu Lys Tyr Leu
1 5 10

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 332 258

② Nº de solicitud: 200930538

③ Fecha de presentación de la solicitud: 30.07.2009

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	FERRE, R., MELO, M. N., CORREIRA, A. D. et al. Synergistic effects of the membrane actions of cecropin-melittin antimicrobial hybrid peptide BP100. Biophysical Journal. Marzo 2009, Vol. 96, Nº 5, páginas 1815-1827. ISSN 0006-3495.	1,2,5,8, 11-13,15, 18-20
A		3,4,6,7,9, 10,14,16, 17
Y	HONG, S. Y., OH, J. E., LEE, K.-H. Effect of D-amino acid substitution on the stability, the secondary structure, and the activity of membrane active peptide. Biochemical Pharmacology. Diciembre 1999, Vol. 58, Nº 11, páginas 1775-1780. ISSN 0006-2952.	1,2,5,8, 11-13,15, 18-20
A		3,4,6,7,9, 10
Y	BADOSA, E., FERRE, R., PLANAS, M. et al. A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria. Peptides. Noviembre 2007, Vol. 28, Nº 12, páginas 2276-2285. ISSN 0196-9781. <DOI:10.1016/j.peptides.2007.09.010>.	1,2,5,8, 11-13,15, 18-20
A		3,4,6,7,9, 10,14,16, 17
Y	PAPO, N., OREN, Z., PAG, U. et al. The consequence of sequence alteration of an amphipathic a-helical antimicrobial peptide and its diastereomers. The Journal of Biological Chemistry. Septiembre 2002, Vol. 277, Nº 37, páginas 33913-33921. ISSN 0021-9258. <DOI:10.1074/jbc.M204928200>.	1,2,5,8, 11-13,15, 18-20
A		3,4,6,7,9, 10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

13.01.2010

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

1/7



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 332 258

② Nº de solicitud: 200930538

③ Fecha de presentación de la solicitud: 30.07.2009

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y A	WO 2007125142 A1 (UNIVERSITAT DE GIRONA) 08.11.2007, página 2, línea 31 - página 3, línea 2; página 6, líneas 15-17; página 9, líneas 24-28; página 10, línea 34 - página 11, línea 10; página 13, líneas 13-22; ejemplos 7,8,9, SEQ. ID. NO. 6.	1,2,5,8, 11-13,15, 18-20 3,4,6,7,9, 10,14,16, 17
Y A	US 5585353 A (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY) 17.12.1996, columnas 2-3; columna 8, líneas 31-34.	1,2,5,8, 11-13,15, 18-20 3,4,6,7,9, 10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 13.01.2010</p>	<p>Examinador E. Relaño Reyes</p>	<p>Página 2/7</p>
---	--	-----------------------

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, EMBASE, NPL, BIOSIS, XPESP, XPOAC, UNIPROT, aaGENESEQ, EURO PATENTS, JAPAN PATENTS, KOREA PATENTS, US PATENTS, PDB, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.01.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-20	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	3, 4, 6, 7, 9, 10, 14, 16, 17	SÍ
	Reivindicaciones	1, 2, 5, 8, 11-13, 15, 18-20	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

Consideraciones:

La presente solicitud, tiene por objeto un péptido de secuencia KKLFFKILKYL que tiene al menos uno de sus aminoácidos en la forma D (reivindicaciones de la 1 a la 10 y la 12), pudiendo presentar el extremo carboxilo terminal un grupo carboximida (reivindicación 11). Así mismo también son objeto de la invención: el uso de los péptidos como agentes antimicrobianos (reivindicaciones 13, 15 y 16); su utilización en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas en animales y humanos (reivindicaciones 14 y 17), o en la producción de una composición antimicrobiana (reivindicación 18); la propia composición antimicrobiana (reivindicación 19); y el método para tratar enfermedades en plantas, que comprende poner en contacto la planta con dicha composición (reivindicación 20).

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	FERRE, R. et al. Biophysical Journal. Marzo 2009, Vol. 96, N° 5, páginas 1815-1827.	04-03-2009
D02	HONG, S. Y. et al. Biochemical Pharmacology. Diciembre 1999, Vol. 58, N° 11, páginas 1775-1780.	01-12-1999
D03	BADOSA, E. et al. Peptides. Noviembre 2007, Vol. 28, N° 12, páginas 2276-2285.	19-11-2007
D04	PAPO, N. et al. The Journal of Biological Chemistry. Septiembre 2002, Vol. 277, N° 37, páginas 33913-33921.	13-09-2002
D05	WO 2007/125142 A1	08-11-2007
D06	US 5585353 A	17-12-1996

Observaciones sobre documentos:

En D01 se investiga el mecanismo de acción del péptido BP100, de secuencia KKLFFKILKYL-NH₂, y que presenta actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas patógenas de plantas. BP100 es poco citotóxico y poco susceptible a la degradación por la proteasa K.

D02 estudia en un undecapéptido con actividad bactericida, el efecto de la sustitución de aminoácidos de la serie L por los de la D. Para ello, sintetizaron diferentes péptidos con D-aminoácidos en distintas posiciones. Las sustituciones de los residuos en el extremo amino y/o carboxilo terminal por los mismos residuos de la serie D, aumentan la estabilidad peptídica frente a la degradación por peptidasas, presentando la misma actividad antimicrobiana que el péptido con todos los residuos en la forma L. Concluye que la sustitución en péptidos antimicrobianos de ciertos residuos por su forma D, contribuye a la estabilidad del péptido manteniendo la actividad antimicrobiana. Por lo tanto, este método se puede utilizar en el desarrollo de agentes terapéuticos.

En D03 se divulgan una serie de análogos del péptido de secuencia KKLFFKILKFL-NH₂. Uno de los más destacados es BP100, de secuencia KKLFFKILKYL-NH₂, ya que es de los que presenta una mayor actividad bactericida frente a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* y *Erwinia amylovora* (todas patógenas en plantas), una menor susceptibilidad a la degradación por proteinasa K y una menor actividad hemolítica.

D04 describe el efecto de la introducción de D-aminoácidos en un péptido de 15 residuos con grupo carbamida en el extremo carboxilo terminal. Llega a la conclusión de que la sustitución de aminoácidos L por D, no tiene por qué alterar la actividad antimicrobiana del péptido, aumenta su estabilidad frente a proteasas y disminuye su capacidad hemolítica.

En D05 se anticipan diversos péptidos con actividad antimicrobiana. Uno de ellos, BP100, de SEC. ID. NO. 6, presenta un 100% de identidad con la secuencia de la presente invención, teniendo además un grupo carbamida en el extremo carboxilo terminal. Este péptido tiene actividad antimicrobiana frente a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* y *Erwinia amylovora* (todas patógenas en plantas), presenta poca susceptibilidad a la degradación por proteinasa K y poca actividad hemolítica.

D06 afirma que la sustitución de L-aminoácidos por D-aminoácidos en péptidos antimicrobianos, incrementa la resistencia a la degradación por proteasas. Por lo tanto, es una modificación útil en el diseño de péptidos con actividad antimicrobiana o antiparasitaria.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**1. NOVEDAD (Art. 6 Ley 11/1986)**

Las reivindicaciones de la 1 a la 20 cumplen con el requisito de novedad.

Hoja adicional

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8 Ley 11/1986)

2.1. REIVINDICACIONES 1, 2, 5, 8, 11 y 12

El objeto de la presente solicitud según las reivindicaciones 1 y 12, es un péptido antimicrobiano de fórmula KKLFFKKILKYL que presenta al menos un aminoácido de la serie D, siendo el extremo C-terminal un grupo carboxamida (reivindicación 11). La reivindicación 2, especifica que el péptido incluye un residuo de la serie D en cualquiera de las posiciones de la 1 a la 8; la reivindicación 5, que incluye de cinco a once aminoácidos de la serie D consecutivos; y la 8 que incluye dos o tres D-aminoácidos.

D01, D03 y D05 anticipan un péptido denominado BP100 con actividad antimicrobiana, cuya secuencia presenta un 100% de identidad con la divulgada en la presente solicitud, y con un grupo carboxamida en el extremo carboxilo terminal.

La diferencia entre la presente solicitud y D01, D03 ó D05 es que en estos documentos, todos los aminoácidos del péptido son de la serie L, no habiendo ninguno de la serie D.

El efecto técnico, es la obtención de péptidos con mayor resistencia a la degradación de las proteasas y menor actividad hemolítica.

Por lo tanto, el problema a resolver es el desarrollo de péptidos antimicrobianos más estables frente a las proteasas y menos hemolíticos.

D02, D04 y D06 divulgan el hecho de que en un péptido antimicrobiano, la sustitución de ciertos residuos por los correspondientes de la serie D, produce un incremento en la resistencia a la degradación a las proteasas, manteniéndose la actividad antimicrobiana. Además, en D04 se destaca que estos péptidos suelen ser menos hemolíticos.

Por lo tanto, un experto en la materia intentaría la introducción de algún aminoácido de la serie D (D02, D04 ó D06) en el péptido de fórmula KKLFFKKILKYL-NH₂ (D01, D03 ó D05) con una expectativa razonable de éxito.

En consecuencia, en vista de la combinación de D01 con D02, D03 con D04 y D05 con D06, las reivindicaciones 1, 11 y 12 no tienen actividad inventiva.

Cabe destacar, que D02 presenta péptidos con un solo aminoácido de la serie D en las posiciones de la 1 a la 8 (reivindicación 2), con 11 D-aminoácidos (reivindicación 5) y con un D-aminoácido en la posición 1 y otro en la posición 11 (reivindicación 8). Además, aunque en D04 y D06 la posición de los residuos de la forma D no se corresponde con la especificada en las reivindicaciones 2, 5 y 8, dado que de la solicitud no se deduce que la elección de estos sitios produzca un efecto técnico sorprendente, se considera, que la elección de un lugar u otro es una de las posibles alternativas que probaría el experto en la materia, y por lo tanto no es relevante.

En consecuencia, dadas las combinaciones de documentos anteriormente señaladas, las reivindicaciones 2, 5 y 8 tampoco presentan actividad inventiva.

2.2. REIVINDICACIONES 13, 15, 18, 19 y 20.

La solicitud tiene por objeto, el uso de los péptidos divulgados como agentes antimicrobianos frente a bacterias patógenas de las plantas (reivindicaciones 13 y 15); en la preparación del compuesto bactericida (reivindicación 18); la composición antimicrobiana que lo comprende (reivindicación 19); y el método para tratar enfermedades infecciosas en plantas causadas por bacterias, que comprende poner en contacto dicha planta con la composición antimicrobiana (reivindicación 20).

Tanto en D01, como en D03 o D05, se divulga la actividad antimicrobiana del péptido BP-100 frente a bacterias patógenas en plantas.

En consecuencia, un experto en la materia intentaría el uso del péptido de fórmula KKLFFKKILKYL-NH₂ que presenta algún aminoácido de la serie D (D02, D04, D06) como agente antimicrobiano en plantas, la obtención de una composición antimicrobiana que comprenda dicho péptido, o el tratamiento de plantas mediante el contacto con dicha composición (D01, D03 o D05), con una expectativa razonable de éxito.

En consecuencia, dada la combinación de D01 con D02, D03 con D04 y D05 con D06, las reivindicaciones 13, 15, y de la 18 a la 20, no tienen actividad inventiva.

Hoja adicional

2.3. REIVINDICACIONES 3, 4, 6, 7, 9, 10, 14, 16 y 17

Las reivindicaciones 3, 4, 6, 7, 9, 10, 14, 16 y 17 cumplen con el requisito de actividad inventiva.