

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 206**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2004 E 04734024 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **15.02.2006 EP 1625155**

54 Título: **Uso de péptidos antimicrobianos con actividad de unión a heparina**

30 Prioridad:

19.05.2003 SE 0301431
19.05.2003 US 320204 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2013

73 Titular/es:

PERGAMUM AB (100.0%)
Banvaktsvägen 12
171 48 Solna, SE

72 Inventor/es:

SCHMIDTCHEN, ARTUR y
MALMSTEN, MARTIN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 395 206 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de péptidos antimicrobianos con actividad de unión a heparina

5 Campo de la invención

La invención se refiere al uso de péptidos antimicrobianos con actividad de unión a heparina, que se derivan de la proteína de mamífero endógena que está sustancialmente libre de actividad antimicrobiana en los que dicha proteína de mamífero es cininógeno y que tiene de desde 10 hasta 36 residuos de aminoácidos, en los que los péptidos antimicrobianos consisten en al menos cuatro residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en K, R y H.

Antecedentes de la invención

15 Varias infecciones se combaten con éxito por el sistema inmunitario de un mamífero, tal como un ser humano. Sin embargo, en algunos casos, las bacterias, los hongos o los virus no siempre se eliminan, lo que puede provoca infecciones agudas localizadas o generalizadas. Este es un problema serio en las unidades de perinatal, quemados o de cuidados intensivos y en individuos inmunocomprometidos. En otros casos, una persistencia bacteriana continua en las superficies epiteliales puede provocar o agravar una enfermedad crónica. En seres humanos, esto se ejemplifica con úlceras cutáneas crónicas, dermatitis atópica y otros tipos de eccema, acné o infecciones genitourinarias.

25 Las infecciones sintomáticas se pueden tratar con varios medicamentos. Algunas enfermedades también se pueden combatir, por ejemplo, con vacunas. Sin embargo, las vacunas no son siempre la mejor opción de tratamiento y para determinados microorganismos no está disponible una vacuna. Cuando no está disponible una protección, se busca el tratamiento de la enfermedad. A menudo, el tratamiento se realiza por el uso de un agente antibiótico, que mata el microbio. Sin embargo, durante los últimos años varios microbios se han vuelto resistentes contra los agentes antibióticos. Muy probablemente, los problemas de resistencia se incrementarán en un futuro próximo. Adicionalmente, varios individuos han desarrollado alergia contra el agente antibiótico, reduciendo de este modo la posibilidad de usar eficazmente determinados agentes antibióticos.

35 Las superficies epiteliales de varios organismos están continuamente expuestas a bacterias. Durante los últimos años, al sistema inmunitario innato, basado en péptidos antibacterianos, se le han atribuido importantes funciones en la eliminación inicial de bacterias en límites biológicos susceptibles de infección (Lehrer, R. I. y Ganz, T. (1999) *Curr Opin Immunol* 11: 23-27, Boman, H. G. (2000) *Immunol. Rev.* 173, 5-16). Los péptidos antimicrobianos matan las bacterias permeando sus membranas, y por tanto la ausencia de un objetivo microbiano molecular específico minimiza el desarrollo de resistencia.

40 En la técnica se conocen varios péptidos y proteínas antimicrobianos, no relacionados con los péptidos descritos en el presente documento.

El documento US 6.503.881 divulga péptidos catiónicos que son un análogo de indolicidina para usarse como péptido antimicrobiano. Los péptidos catiónicos se derivan de diferentes especies, incluidas animales y plantas.

45 El documento US 5.912.230 divulga péptidos basados en histatina antifúngicos y antibacterianos. Los péptidos se basan en porciones definidas de las secuencias de aminoácidos de histatinas humanas naturales y procedimientos para el tratamiento de infecciones fúngicas y bacterianas.

50 El documento US 5.717.064 divulga péptidos líticos ricos en lisina. Los péptidos líticos son resistentes a la digestión por tripsina y no naturales. Los péptidos líticos son adecuados para la administración in vivo.

55 El documento US 5.646.014 divulga un péptido antimicrobiano. El péptido se aisló de una fracción antimicrobiana de hemolinfa de gusano de seda. El péptido presenta una actividad antimicrobiana excelente contra varias cepas bacterianas, tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

McCabe et al., *J. Biol. Chem.*, vol. 277: 27477-27488, 2002, describe una proteína antimicrobiana y quimiotáctica de 37 kDa, azurocidina, que contiene los motivos de consenso de unión a heparina XBBXBX y XBBBXXBX.

60 El documento WO 2004016653 divulga un péptido basado en la secuencia 20-44 de azurocidina. Este péptido contiene una estructura de bucle unida por puentes disulfuro.

65 El documento US 6.495.516 y las patentes relacionadas divulgan péptidos basados en la proteína de 55 kDa bactericida, proteína que incrementa la permeabilidad bactericida (BPI). Los péptidos ejercieron efectos antimicrobianos además de tener capacidad neutralizadora de heparina y LPS.

El documento WO 01/81578 divulga numerosas secuencias que codifican polipéptidos relacionados con receptores

acoplados a proteína G, que se pueden usar para numerosas enfermedades.

El documento WO 00/27415 divulga péptidos que son adecuados para la inhibición de la angiogénesis. Los péptidos son análogos a cininógeno 5 de alto peso molecular. La búsqueda de BLASTp muestra secuencias que están conservadas o que tienen similitudes entre diferentes especies tales como cininógeno sin ningún indicio de la función de dichas regiones conservadas o de si tienen alguna función como péptidos pequeños.

Yingzhang et al., Biochem., vol. 39:5104-5110, 2000 divulga la interacción del dominio 5 de cininógeno de alto peso molecular (HK) con heparina. Adicionalmente, se identificaron sitios de unión para heparina y se concluyó que el HK tiene el potencial para ser un modulador importante del tratamiento con heparina.

En la actualidad, se conocen más de 700 secuencias de péptidos antimicrobianos diferentes (www.bbcm.univ.tri.este.it/~tossilsearch.htm), incluidas cecropinas, defensinas, magaininas y catelicidinas.

Aunque existe una gran cantidad de péptidos antimicrobianos hoy en día, todavía hay una necesidad creciente de obtener nuevos péptidos antimicrobianos mejorados. Péptidos antimicrobianos que se pueden usar para combatir microbios y que son resistentes o tolerantes contra agentes antibióticos y/u otros agentes antimicrobianos. Adicionalmente, existe una necesidad de obtener péptidos antimicrobianos que no sean alergénicos cuando se introducen en mamíferos tales como seres humanos. Se ha encontrado que las bacterias producen de forma endógena péptidos antimicrobianos durante su evolución sin inducción de resistencia significativa.

Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto, la invención se refiere a péptidos antimicrobianos con actividad de unión a heparina, que se derivan de la proteína de mamífero endógena liminógeno que está sustancialmente libre de actividad antimicrobiana seleccionada del grupo que consiste en isoformas de laminina, factor C3 del complemento. Los péptidos antimicrobianos se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:3.

Proporcionando dichos péptidos antimicrobianos, se pueden reducir los riesgos de reacciones alérgicas a péptidos antimicrobianos debido al hecho de que los péptidos se derivan de proteínas y/o péptidos endógenos. Con el uso de péptidos cortos, se puede incrementar la estabilidad del péptido y reducir los costes de producción, en comparación con péptidos y proteínas más grandes, por lo que la invención puede ser económicamente ventajosa. La invención se origina del hallazgo de que los péptidos con motivos de unión a heparina derivados de proteínas endógenas no antimicrobianas presentan actividades antimicrobianas, como se describe por Andersson et al., Eur J Biochem, 2004, 271:1219-1226, publicado después de la fecha de prioridad de la presente solicitud. El prerrequisito estructural para la unión a heparina y la presencia de motivos de unión a heparina en varias proteínas están, en general, bien documentados. Este grupo de moléculas incluye varias isoformas de laminina, fibronectina, factores de coagulación, factores de crecimiento, quimiocinas, glucoproteína rica en histidina, cininógeno y muchas otras (véase Andersson et al., (2004) Eur J Biochem 271; 271:1219-26 y referencias citadas en el mismo), de las que ninguna es inherentemente antimicrobiana.

El uso de los péptidos antimicrobianos mostrados en SEQ ID NO:1 y/o SEQ ID NO:3 de acuerdo con la invención facilita la prevención, reducción o eliminación eficaz de microorganismos. Por tanto, se puede incrementar la posibilidad de combatir microorganismos, que son resistentes o tolerantes contra los agentes antibióticos. Además, se pueden tratar mamíferos que sean alérgicos contra agentes antimicrobianos disponibles comercialmente. Proporcionando el uso de péptidos antimicrobianos, que se derivan de proteínas endógenas, se puede reducir o incluso eliminar la probabilidad de que un mamífero desarrolle alergia contra estos péptidos particulares. Esto hace útil el uso de péptidos antimicrobianos para varias aplicaciones en las que los péptidos antimicrobianos están en contacto con un mamífero como un medicamento o bien como un aditivo para evitar infecciones.

Adicionalmente, el uso de péptidos cortos mejora la biodisponibilidad. Además, el uso de péptidos antimicrobianos de unión a heparina estructuralmente distintos con acciones específicas o preferentes sobre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, u hongos, permite seleccionar como objetivo específico varios microorganismos, minimizando así el desarrollo de resistencia y problemas ecológicos. Complementando los péptidos que ya existen en el mamífero, se disminuye adicionalmente el riesgo de presión ecológica adicional por antibióticos novedosos. Finalmente, estas formulaciones también pueden potenciar el efecto de péptidos antimicrobianos endógenos.

El uso según la invención de los péptidos antimicrobianos incrementa la lista de agentes antimicrobianos, lo que ayuda en la elección para prevenir, reducir o eliminar microorganismos en todo tipo de aplicaciones, incluidas, pero sin limitarse a las que invaden o infectan mamíferos tales como el ser humano.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1 A-C son diagramas que demuestran los efectos antibacterianos de péptidos en *Enterococcus faecalis*.

Las figuras 2 A y B son placas de Petri que ilustran ensayos de difusión radial usando un conjunto de péptidos

altamente activos.

Las figuras 3 A-C son diagramas y una tabla que describen efectos antibacterianos de péptidos ricos en histidina.

- 5 Las figuras 4 A-H son imágenes de microscopía electrónica que muestran el análisis de *Pseudomonas aeruginosa* sometida a péptidos antimicrobianos.

Las figuras 5 A-C son fotografías que muestran la actividad de unión a heparina de péptidos derivados del complemento C3, glucoproteína rica en histidina y cininógeno.

- 10 La figura 6 es una fotografía que ilustra la purificación de un fragmento antimicrobiano que contiene histidina en níquel-sefarsa.

Descripción detallada de la invención

15 Definiciones

En el contexto de la presente solicitud e invención, se aplican las siguientes definiciones:

- 20 El término "secuencia de nucleótidos" se pretende que signifique una secuencia de dos o más nucleótidos. Los nucleótidos pueden ser de origen sintético o semisintético, ADN, ADNc, ARN genómico, o una mezcla de los mismos. El término incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN o ARN.

- 25 El término "péptido antimicrobiano" se pretende que signifique un péptido que comprende desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 36 residuos de aminoácidos, que tenga actividad de unión a heparina y antimicrobiana y que se derive de un mamífero endógeno que no tenga inherentemente efecto antimicrobiano. El "péptido antimicrobiano" evita, inhibe, reduce o destruye un microorganismo. La actividad antimicrobiana se puede determinar, por ejemplo, por el procedimiento en el ejemplo 2, 4 ó 5.

- 30 El término "afinidad de unión a heparina" se pretende que signifique un péptido que se una a una heparina directa o bien indirectamente. La actividad de unión a heparina se puede determinar, por ejemplo, por el procedimiento en el ejemplo 7. Los péptidos antimicrobianos inventados, que presentan afinidad por heparina, también se unen a sulfato de dermatán. Por tanto, los péptidos antimicrobianos de unión a heparina también interactúan con el glucosaminoglucano endógeno sulfato de dermatán.

- 35 El término "anfipático" se pretende que signifique la distribución de residuos de aminoácidos hidrófilos e hidrófobos a lo largo de caras opuestas de una estructura de hélice α , cadena β , lineal, circular u otra conformación secundaria, lo que da como resultado una cara de la molécula predominantemente cargada y la otra cara predominantemente hidrófila. El grado de anfipaticidad de un péptido se puede evaluar representando la secuencia de residuos de aminoácidos por varios algoritmos basados en la web, por ejemplo, los encontrados en <http://us.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>. La distribución de residuos hidrófobos se puede visualizar por diagramas de rueda helicoidal. Los algoritmos de predicción de estructuras secundarias, tales como GORIV se pueden encontrar en www.expasy.com.

- 40 El término "catiónico" se pretende que signifique una molécula que tenga una carga positiva neta dentro del intervalo de pH de desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 12.

El término "microorganismo" se pretende que signifique cualquier microorganismo vivo. Ejemplos de microorganismos son bacterias, hongos, virus, parásitos y levaduras.

- 50 El término "agente antimicrobiano" se pretende que signifique cualquier agente que evite, inhiba o destruya la vida de los microbios. Ejemplos de agentes antimicrobianos se pueden encontrar en The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy (32ª edición, Antimicrobial Therapy, Inc, EE.UU.).

- 55 En el presente contexto, los nombres de aminoácidos y los nombres de átomos se usan tal como se definen por Protein DataBank (PNB) (www.pdb.org), que se basa en la nomenclatura IUPAC (IUPAC Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides (residue names, atom names etc.), Eur J Biochem., 138, 9-37 (1984) junto con sus correcciones en Eur J Biochem., 152, 1 (1985). El término "aminoácido" se pretende que signifique un aminoácido del grupo que consiste en alanina (Ala o A), cisteína (Cys o C), ácido aspártico (Asp o D), ácido glutámico (Glu o E), fenilalanina (Phe o F), glicina (Gly o G), histidina (His o H), isoleucina (Ile o I), lisina (Lys o K), leucina (Leu o L), metionina (Met o M), asparagina (Asn o N), prolina (Pro o P), glutamina (Gln o Q), arginina (Arg o R), serina (Ser o S), treonina (Thr o T), valina (Val o V), triptófano (Trp o W) y tirosina (Tyr o Y), o derivados de los mismos.

65 Descripción

Usos de péptidos antimicrobianos

La presente invención se refiere al uso de péptidos antimicrobianos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:3 con actividad de unión a heparina, que se derivan de la proteína de mamífero endógena liminógeno que está sustancialmente libre de actividad antimicrobiana. Una distancia de ~ 20 Å entre los residuos de aminoácidos B constituye un prerrequisito para la unión a heparina con independencia de la conformación del péptido, como se informa por Margalit et al., 1993 J Biol Chem 268, 19228-31. El uso de péptidos cortos incrementa la biodisponibilidad de péptidos más cortos en comparación con péptidos o proteínas más grandes, por ejemplo, a través de un incremento en la piel la capacidad de penetración, así como reduce los costes de producción y purificación. Los presentes péptidos antimicrobianos son complementos para los péptidos antimicrobianos que están disponibles comercialmente hoy en día e incrementan la posibilidad de combatir microorganismos, siendo tolerantes y/o resistentes contra agentes antimicrobianos disponibles. Derivando los péptidos antimicrobianos nuevos de proteínas no antimicrobianas endógenas, es posible identificar nuevos péptidos que no sean alergénicos para el mamífero a partir del que se ha basado el péptido.

Además, un mayor conocimiento de la acción de los péptidos y de la dependencia de varias sales y entornos iónicos permite el diseño de composiciones específicas, lo que potencia y controla los efectos de los péptidos. Los péptidos cortados para actuar sobre hongos también serán ventajosos en la selección de enfermedades específicas, tales como la infección por levaduras en membranas mucosas sin que afecte significativamente a la ecología bacteriana en estas zonas. El hecho de que los péptidos antimicrobianos actúen sobre las membranas bacterianas sugiere que pueden actuar de forma sinérgica junto con antibióticos. Por lo tanto, la combinación de antibióticos y péptidos puede tener ventajas terapéuticas. Finalmente, también existe una necesidad de obtener agentes antimicrobianos, que sean de bajo coste y no alergénicos para usarse en diferentes tipos de productos en los que sea necesario evitar el crecimiento de microorganismos.

Adicionalmente, el uso de péptidos antimicrobianos cortos de unión a heparina estructuralmente distintos con acciones específicas o preferentes sobre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, u hongos, permite seleccionar como objetivo específico varios microorganismos, minimizando así la resistencia y los problemas ecológicos. Complementando los péptidos que ya se encuentran en el organismo, se disminuye adicionalmente el riesgo de presión ecológica adicional por antibióticos novedosos. La introducción de formulaciones específicas que potencien los efectos de los péptidos localiza y potencia los péptidos suministrados de forma endógena lo que minimiza además el riesgo de efectos secundarios de los péptidos, tales como la inducción de la resistencia, fuera del área tratada. Finalmente, estas formulaciones también pueden potenciar el efecto de péptidos antimicrobianos endógenos. Si los péptidos antimicrobianos se desarrollan para usarse para combatir microorganismos en seres humanos, los péptidos antimicrobianos endógenos se derivan de proteínas endógenas humanas. Lo mismo se aplica para otros animales, tales como caballos, vacas, cerdos o aves de corral. Los péptidos antimicrobianos se derivan de cininógeno.

Los péptidos antimicrobianos de la invención tienen una afinidad de unión (Kd) a heparina de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 20 µM.

La invención se refiere al uso de péptidos antimicrobianos que se basan en proteínas cininógenas. El péptido antimicrobiano se puede seleccionar del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y 3. Estos péptidos se derivan de dominios de unión a heparina de las proteínas no antimicrobianas cininógeno y son ricos en residuos H.

Incluso aunque los péptidos se deriven de proteínas endógenas, se pueden producir como péptidos semisintéticos o sintéticos así como en microorganismos.

Ejemplos de microorganismos que se inhiben, se evitan o se destruyen por el péptido antimicrobiano son bacterias, tanto bacterias Gram positivas como Gram-negativas tales como *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, virus, parásitos, hongos y levaduras, tales como *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*.

Los péptidos antimicrobianos se pueden obtener de una fuente natural, tal como de una célula humana, un ADNc, clon genómico, sintetizarse químicamente u obtenerse por técnicas de ADN recombinante como productos expresión de fuentes celulares.

Los péptidos antimicrobianos se pueden sintetizar por procedimientos químicos estándar, incluida la síntesis por procedimiento automatizado. En general, los análogos de péptidos se sintetizan en base a la estrategia de protección Fmoc en fase sólida estándar con HATU (hexafluorofosfato de N-óxido de N-[dimetilamino-1H-1.2.3.-triazolo[4,5-B]piridin-1-ilmetileno]-N-metilmelanaminio) como agente de acoplamiento u otros agentes de acoplamiento tales como HOAt-1-hidroxi-7-azabenzotriazol. El péptido se escinde de la resina de fase sólida con ácido trifluoroacético que contiene neutralizadores apropiados, lo que también desprotege los grupos funcionales de cadena lateral. El péptido en bruto se purifica además usando cromatografía de fase inversa preparativa. Se pueden usar otros procedimientos de purificación, tales como cromatografía de partición, de filtración en gel, electroforesis en gel o cromatografía de intercambio iónico. Se pueden emplear otras técnicas de síntesis conocidas en la técnica, tales como la estrategia de protección tBoc o el uso de diferentes reactivos de acoplamiento o similares para

producir péptidos equivalentes.

Los péptidos se pueden sintetizar de forma alternativa por producción recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.593.866). Varios sistemas huésped son adecuados para la producción de análogos de péptidos, incluidos bacterias, tales como *E. coli*, levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae* o *pichia*, insectos, tales como Sf9, y células de mamífero, tales como CHO o COS-7. Existen muchos vectores de expresión disponibles para usarse para cada uno de los huéspedes y la invención no está limitada a ninguno de ellos siempre que el vector y el huésped puedan producir el péptido antimicrobiano. Se pueden encontrar vectores y procedimientos para la clonación y expresión en *E. coli*, por ejemplo, en Sambrook et al. (*Molecular Cloning.: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1987) y Ausubel et al. (*Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Co., 1995).

Finalmente, los péptidos se pueden purificar a partir de plasma, sangre, diversos tejidos o similares. Los péptidos pueden ser endógenos o generarse después de la digestión enzimática o química de la proteína purificada. Por ejemplo, una proteína de unión a heparina se puede digerir por tripsina y los péptidos antibacterianos resultantes se pueden aislar además a una escala mayor.

Una secuencia de ADN que codifica el péptido antimicrobiano se introduce en un vector de expresión adecuado, apropiado para el huésped. En realizaciones preferidas, el gen se clona en un vector para crear una proteína de fusión. Para facilitar el aislamiento de la secuencia peptídica, se usan aminoácidos susceptibles de escisión química (por ejemplo, CNBr) o de escisión enzimática (por ejemplo, V8 proteasa, tripsina) para unir con puente el péptido y el compañero de fusión. Para la expresión en *E. coli*, el compañero de fusión es preferentemente una proteína intracelular normal que dirige la expresión hacia la formación de cuerpos de inclusión. En este caso, después de la escisión para liberar el producto final, no existe ningún requisito para la renaturalización del péptido. En la presente invención, el casete de ADN, que comprende el compañero de fusión y el gen del péptido, se puede insertar en un vector de expresión. Preferentemente, el vector de expresión es un plásmido que contiene un promotor inducible o constitutivo para facilitar la transcripción eficaz de la secuencia de ADN insertada en el huésped.

El vector de expresión se puede introducir en el huésped por técnicas de transformación convencionales tales como por técnicas mediadas por calcio, electroporación u otros procedimientos bien conocidos para los expertos en la técnica.

La secuencia que codifica el péptido antimicrobiano se puede derivar de una fuente natural tal como una célula de mamífero, un ADNc existente o clon genómico, o sintetizarse. Un procedimiento que se pueden usar en la amplificación del péptido antimicrobiano con la ayuda de la PCR usando cebadores de amplificación que se derivan de los extremos 5' y 3' de la plantilla de ADN antimicrobiano y que incorporan normalmente sitios de restricción elegidos con respecto al sitio de clonación del vector. Si es necesario, los codones de iniciación y terminación traduccionales se pueden diseñar en las secuencias de los cebadores. La secuencia que codifica el péptido antimicrobiano se puede optimizar por codón para facilitar la expresión en el huésped particular siempre que la elección de los codones se realice considerando el mamífero final que se va a tratar. Por tanto, por ejemplo, si el péptido antimicrobiano se expresa en bacterias, los codones se optimizan para bacterias.

El vector de expresión debería contener una secuencia promotora, para facilitar la expresión del péptido antimicrobiano introducido. Si es necesario, también se pueden incluir secuencias reguladoras, tales como uno o más potenciadores, sitio de unión a ribosomas, secuencia señal de terminación de la transcripción, secuencia señal de secreción, origen de replicación, marcador seleccionable, y similares. Las secuencias reguladoras se unen de forma operable entre sí para permitir la transcripción y la posterior traducción. Si el péptido antimicrobiano se va a expresar en bacterias, las secuencias reguladoras son las que están diseñadas para usarse dentro de bacterias y estas son bien conocidas por un experto en la técnica. Los promotores adecuados, tales como promotores constitutivos e inducibles, están ampliamente disponibles e incluyen promotores de fagos T5, T7, T3, SP6, y los operones *trp*, *lpp* y *lac*.

Si el vector que contiene el péptido antimicrobiano se va a expresar dentro de bacterias, ejemplos de origen son los que dan lugar a un número de copias alto o bien los que dan lugar a un número de copias bajo, por ejemplo, *f1-ori* y *col E1-ori*.

Preferentemente, los plásmidos incluyen al menos un marcador seleccionable que sea funcional en el huésped, lo que permite que las células transformadas se identifiquen y/o crezcan selectivamente. Los genes de marcadores seleccionables adecuados para huéspedes bacterianos incluyen el gen de resistencia a ampicilina, el gen de resistencia a cloroamfenicol, el gen de resistencia a tetraciclina, el gen de resistencia a kanamicina y otros conocidos en la técnica.

Los ejemplos de plásmidos para la expresión en bacterias incluyen los vectores de expresión de pET pET3a, pET 11a, pET 12a-c y pET 15b (disponibles de Novagen, Madison, Wis.). Se pueden usar vectores de número de copias bajo (por ejemplo, pPD100) para la sobreproducción eficaz de péptidos nocivos para el huésped de *E. coli* (Dersch et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 123:19, 1994).

Ejemplos de huéspedes adecuados son bacterias, levaduras, insectos y células de mamífero. Sin embargo, a menudo se usan otras bacterias, tales como *E. coli*.

- 5 El péptido antimicrobiano se aísla por técnicas de aislamiento convencionales tales como cromatografía de afinidad, de exclusión por tamaño, o de intercambio iónico, HPLC y similares. Las diferentes técnicas de purificación se pueden encontrar en *A Biologist's Guide to Principles and Techniques of Practical Biochemistry* (eds. Wilson and Golding, Edward Arnold, Londres, o en *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc).

10 *Composición antimicrobiana/farmacéutica*

Adicionalmente, la invención se refiere a la fabricación de composiciones farmacéuticas/antimicrobianas que comprenden un péptido antimicrobiano como se describe anteriormente y un tampón, diluyente, vehículo, coadyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable. Se pueden incluir otros compuestos en las composiciones. Estos incluyen, por ejemplo, agentes quelantes tales como EDTA, EGTA o glutatión. Las composiciones farmacéuticas/antimicrobianas se pueden preparar de una manera conocida en la técnica que sea suficientemente estable en almacenamiento y adecuada para la administración a seres humanos y animales. Las composiciones farmacéuticas se pueden liofilizar, por ejemplo, a través de secado por congelación, secado por pulverización o enfriamiento por pulverización.

- 20 "Farmacéuticamente aceptable" quiere decir un material no tóxico que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica de los principios activos, es decir, el/los péptido(s) antimicrobiano(s). Estos tampones, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica (véase, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición, A.R Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990) y *handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3ª edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000).

- 30 El término "tampón" se pretende que signifique una solución acuosa que contiene una mezcla ácido-base con el fin de estabilizar el pH. Ejemplos de tampones son Trizma, Bicina, Tricina, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, fosfato, carbonato, acetato, citrato, glucolato, lactato, borato, ACES, ADA, tartrato, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, cacodilato, CHES, DIPSO, EPPS, etanolamina, glicina, HEPPSO, imidazol, imidazol ácido láctico, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO, TES, tricina.

- 35 El término "diluyente" se pretende que signifique una solución acuosa o no acuosa con el fin de diluir el péptido en la preparación farmacéutica. El diluyente puede ser uno o más de solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tales como aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo).

- 40 El término "coadyuvante" se pretende que signifique cualquier compuesto añadido a la formulación para incrementar el efecto biológico del péptido. El coadyuvante puede ser uno o más de sales de cinc, cobre o plata con diferentes aniones, por ejemplo, pero sin limitarse a fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, tiocianato, sulfito, hidróxido, fosfato, carbonato, lactato, glucolato, citrato, borato, tartrato y acetatos de diferente composición de acilo.

- 45 El excipiente puede ser uno o más de carbohidratos, polímeros, lípidos y minerales. Ejemplos de carbohidratos incluyen lactosa, sacarosa, manitol y ciclodextrinas, que se añaden a la composición, por ejemplo, para facilitar la liofilización. Ejemplos de polímeros son almidón, éteres de celulosa, celulosa, carboximetilcelulosa, alginatos, carrageninas, ácido hialurónico, ácido poliacrílico, polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno, poli(alcohol vinílico)/poli(acetato de vinilo) de diferente grado de hidrólisis y polivinilpirrolidona, todos de diferente peso molecular, que se añaden a la composición, por ejemplo, para el control de la viscosidad, para lograr la bioadhesión o para proteger el lípido de la degradación química y proteolítica. Ejemplos de lípidos son ácidos grasos, fosfolípidos, mono-, di-, y triglicéridos, ceramidas, esfingolípidos y glucolípidos, todos de diferente longitud y saturación de la cadena de acilo, lecitina de huevo, lecitina de soja, lecitina de huevo y de soja hidrogenada, que se añaden a la composición por motivos similares a los de los polímeros. Ejemplos de minerales son talco, óxido de magnesio, óxido de cinc y óxido de titanio, que se añaden a la composición para obtener beneficios tales como la reducción de la acumulación de líquido o propiedades de pigmentación ventajosas.

- 55 Las características del vehículo dependen de la ruta de administración. Una ruta de administración es la administración tópica. Por ejemplo, para las administraciones tópicas, un vehículo preferido es una crema emulsionada que comprende el péptido activo, pero se pueden usar otros vehículos comunes tales como determinadas pomadas a base de petrolato/mineral y a base de vegetales, así como geles de polímeros, fases cristalinas líquidas y microemulsiones.

- 65 Las composiciones farmacéuticas/antimicrobianas pueden comprender uno o más péptidos, tales como 1, 2, 3 ó 4 péptidos diferentes en las composiciones farmacéuticas/antimicrobianas. Con el uso de una combinación de diferentes péptidos, se puede incrementar el efecto antimicrobiano así como disminuir la posibilidad de que el microorganismo a combatir pueda ser resistente y/o tolerante contra el agente antimicrobiano.

Los péptidos ricos en histidina y/o a base de cininógeno, en particular como péptidos cortos, tienen una actividad antimicrobiana limitada. Sin embargo, si estos péptidos están en una composición que comprende una sal y/o un pH desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 7,0, los péptidos se vuelven activos, es decir, se obtiene un efecto potenciado por la adición de una sal y/o por una elección de un intervalo de pH específico.

5 El péptido como sal puede ser un aducto de ácido con ácidos inorgánicos, tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido perclórico, ácido tiocianico, ácido bórico, etc. o con ácido orgánico, tal como ácido fórmico, ácido acético, ácido haloacético, ácido propiónico, ácido glucólico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido malónico, ácido fumárico, ácido antranílico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido p-toluensulfónico, ácido naftalenosulfónico, ácido sulfanílico, etc. Se pueden añadir sales inorgánicas tales como sodio, potasio monovalente o cinc, magnesio, cobre, calcio divalente, todas con un anión correspondiente, para mejorar la actividad biológica de la composición antimicrobiana. Se pueden usar péptidos ricos en H antimicrobianos a base de glucoproteína rica en cininógeno e histidina en soluciones definidas, tales como gel, en las que el se define y se controla (por ejemplo, pH 5,5-6,0) para potenciar los efectos de los péptidos antimicrobianos añadidos. Por ejemplo, un gel, pomada o vendaje, con un pH definido de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0, tal como de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0, con o sin un entorno iónico potenciará, controlará y localizará la función de los péptidos antimicrobianos.

20 Las composiciones farmacéuticas/antimicrobianas de la invención también pueden estar en forma de un liposoma en el que se combina el péptido, además de otros vehículos farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos tales como lípidos, que existen en formas agregadas como micelas, monocapas insolubles y cristales líquidos. Los lípidos adecuados para formulación liposómica incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. Las preparaciones de estas formulaciones liposómicas se puede encontrar, por ejemplo, en el documento US 4.235.871.

25 Las composiciones farmacéuticas/antimicrobianas de la invención también pueden estar en forma de microesferas biodegradables. Se han usado ampliamente poliésteres alifáticos, tales como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glucólico) (PGA), copolímeros de PLA y PGA (PLGA) o poli(carprolactona) (PCL), y polianhídridos, como polímeros biodegradables en la producción de microesferas. Las preparaciones de estas microesferas se pueden encontrar en el documento US 5.851.451 y en el documento EP 0213303.

30 De forma alternativa, los péptidos antimicrobianos se pueden disolver en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tales como aceite de cárcamo, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo), goma tragacanto, y/o varios tampones. La composición farmacéutica también puede incluir iones y un pH definido para la potenciación de la acción de los péptidos antimicrobianos.

35 Las composiciones farmacéuticas/antimicrobianas se pueden someter a operaciones farmacéuticas convencionales tales como esterilización y/o pueden contener coadyuvantes convencionales, tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, tampones, cargas, etc., por ejemplo, como se divulga en otra parte en el presente documento.

40 Las composiciones farmacéuticas/antimicrobianas de acuerdo con la invención se pueden administrar local o sistémicamente. Las rutas de administración incluyen tópica, ocular, nasal, pulmonar, bucal, parenteral (intravenosa, subcutánea e intramuscular), oral, parenteral, vaginal y rectal. También es posible la administración desde implantes. Las formas de preparación antimicrobianas adecuadas son, por ejemplo, gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, microemulsiones, definidas como sistemas termodinámicamente estables ópticamente isotrópicos que consisten en agua, aceite y tensioactivo, fases cristalinas líquidas, definidas como sistemas caracterizados por orden de gran intervalo pero desorden de pequeño intervalo (ejemplos incluyen fases lamelar, hexagonal y cúbica, continua en agua o bien en aceite), o sus homólogos dispersos, geles, pomadas, dispersiones, suspensiones, cremas, aerosoles, gotas o solución inyectable en forma de ampolla y también preparaciones con liberación prolongada de compuestos activos, en los que los excipientes, diluyentes, coadyuvantes o vehículos de preparación se usan habitualmente como se describe anteriormente. La composición farmacéutica también se pueden proporcionar en vendajes o escayolas o similares.

55 Las composiciones farmacéuticas se administrarán a un paciente en una dosis farmacéuticamente eficaz. Por "dosis farmacéuticamente eficaz" se quiere decir una dosis que sea suficiente para producir los efectos deseados en relación con la afección para la que se administra. La dosis exacta es dependiente de la actividad del compuesto, la manera de administración, la naturaleza y la gravedad del trastorno, la edad y el peso corporal del paciente; se pueden necesitar diferentes dosis. La administración de la dosis se puede llevar a cabo tanto por una única administración en forma de una unidad de dosis individual o bien de varias unidades de dosis más pequeñas como también por administración múltiple de dosis subdivididas en intervalos específicos

60 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar solas o en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como agentes antibióticos o antisépticos, tales como agentes antibacterianos, antifúngicos, agentes antivíricos y agentes antiparasitarios. Ejemplos son penicilinas, cefalosporinas, carbacefemos, cefamicinas, carbapenemos, monobactamas, aminoglucósidos, glucopéptidos, quinolonas, tetraciclinas, macrólidos y

fluoroquinolonas. Los agentes antisépticos incluyen yoduro, plata, cobre, clorhexidina, polihexanida y otras biguanidas, quitosano, ácido acético y peróxido de hidrógeno. Estos agentes se pueden incorporar como parte de la misma composición farmacéutica o se pueden administrar por separado.

- 5 La presente invención se refiere tanto a seres humanos como a otros mamíferos, tales como caballos, perros, gatos, vacas, cerdos, camellos, entre otros. Por tanto, los procedimientos se pueden aplicar tanto al tratamiento en seres humanos como a aplicaciones veterinarias. Los objetivos adecuados para dicho tratamiento se pueden identificar por características distintivas bien establecidas de una infección, tales como fiebre, pus, cultivo de organismos, y similares. Las infecciones que se pueden tratar con los péptidos antimicrobianos incluyen las provocadas por o
10 debidas a microorganismos. Ejemplos de microorganismos incluyen bacterias (por ejemplo, Gram-positivas, Gram-negativas), hongos, (por ejemplo, levaduras y mohos), parásitos (por ejemplo, protozoos, nematodos, cestodos y trematodos), virus y priones. Los organismos específicos en estas clases son bien conocidos (véase, por ejemplo, Davis et al., Microbiology, 3ª edición, Harper y Row, 1980). Las infecciones incluyen, pero no se limitan a, úlceras cutáneas crónicas, heridas por quemadura y heridas graves infectadas, eccema cutáneo infectado, impétigo,
15 dermatitis atópica, acné, otitis externa, infecciones vaginales, dermatitis seborreica, infecciones orales y parodontitis, intertrigo por *Candida*, conjuntivitis y otras infecciones oculares, y neumonía.

Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas/antimicrobianas se pueden usar para el tratamiento profiláctico de heridas por quemadura, después de cirugía y después de traumatismo cutáneo. La composición farmacéutica también se puede incluir en soluciones destinadas a almacenamiento y al tratamiento de materiales externos en
20 contacto con el cuerpo humano, tales como lentes de contacto, implantes ortopédicos y catéteres.

Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas/antimicrobianas se pueden usar para el tratamiento de dermatitis atópica, impétigo, úlceras cutáneas crónicas, heridas por quemadura y heridas graves infectadas, acné, otitis externa, infecciones fúngicas, neumonía, dermatitis seborreica, intertrigo por *Candida*, vaginitis por *Candida*, candidiasis orofaríngea, infecciones oculares (conjuntivitis bacteriana) e infecciones nasales (incluido el transporte de MRSA).
25

Las composiciones farmacéuticas/antimicrobianas también se pueden usar en soluciones de limpieza, tales como desinfectantes de lentes y soluciones de almacenamiento o usarse para evitar la infección bacteriana junto con el uso de catéter urinario o uso de catéteres venosos centrales.
30

Adicionalmente, las composiciones antimicrobianas se pueden usar para la prevención de infección después de cirugía en escayolas, adhesivos, suturas, o incorporarse en apósitos para heridas.
35

Los péptidos antimicrobianos también se pueden usar en polímeros, textiles o similares para crear superficies antibacterianas o se pueden complementar productos cosméticos, y productos de cuidado personal (jabón, champús, pasta de dientes, anti-acné, protectores solares, tampones, pañales, etc.) con las composiciones farmacéuticas/antimicrobianas.
40

Procedimiento para identificar péptidos y/o proteínas humanos antimicrobianos

La invención también divulga un procedimiento para la identificación de uno o más péptidos antimicrobianos nuevos, que permite la posibilidad de proporcionar a los mamíferos, tales como seres humanos, un nuevo conjunto de péptidos antimicrobianos que tienen una alergenicidad baja y que son eficaces contra el microorganismo que ha invadido al mamífero. Con un procedimiento de este tipo estarán disponibles nuevos péptidos antimicrobianos mejorados, lo que proporciona una gran colección de agentes antimicrobianos que reducen o incluso eliminan los problemas de resistencia y/o tolerancia que son comunes hoy en día contra los agentes antibióticos disponibles en el mercado.
45
50

El procedimiento comprende las etapas de; proporcionar el péptido y/o proteína endógeno, proporcionar heparina, mezclar el péptido y/o proteína endógeno con heparina creando un complejo de péptido y/o proteína heparina, detectar el complejo de péptido y/o proteína heparina e identificar el péptido y/o proteína endógeno humano antimicrobiano. Adicionalmente, se puede usar níquel tal como níquel-sefarosa, en lugar de heparina. La heparina se puede presentar en solución o conectada a una matriz. En el último caso, esto es adecuado con fines de separación (h.p.1.c o f.p.1.c) o análisis Biocore. Con fines de separación, se puede usar heparina-sefarosa o medios similares. Puesto que los péptidos antimicrobianos también interactúan con otros glucosaminoglucanos, es posible el uso de estas moléculas, tales como sulfato de dermatán o heparán, para la purificación de péptidos antimicrobianos novedosos. La heparina, el sulfato de heparán y el sulfato de dermatán contienen grupos sulfo- o carboxilo intercalados y espacialmente definidos. En principio, se puede usar cualquier otro compuesto polimérico de capacidad de interacción similar a la de estos glucosaminoglucanos para la unión específica de péptidos antimicrobianos. Adicionalmente, los péptidos ricos en H se pueden purificar en níquel-sefarosa o medios similares, solos o bien en combinación con cromatografía con heparina.
55
60

Se pretende que los siguientes ejemplos sean ilustrativos pero que no limiten la invención de ninguna manera, conformación o forma, ya sea de forma explícita o bien implícita.
65

EjemplosMicroorganismos

5 En los experimentos, se usaron *Enterococcus faecalis* 2374, *Escherichia coli* 37.4, *Pseudomonas aeruginosa* 27.4, obtenidos originalmente de úlceras venosas crónicas, y el hongo *Candida albicans* BM 4435 obtenido de un paciente con eccema atópico.

10 Se presentan péptidos diferentes de SEQ ID NO. 1 ó 3 para su comparación.

Ejemplo 1Péptidos antimicrobianos

15 Los péptidos antimicrobianos mostrados en el listado de secuencias y en la tabla 1 a continuación se sintetizaron por Innovagen AB, Ideon, SE-22370, Lund, Suecia. La pureza y el peso molecular de estos péptidos se confirmaron por análisis de espectro de masas (MALDI.TOF Voyager).

20 Tabla 1

Origen	Péptido	Código
C3a	LRKCCEDGMR ENPMRFSCQR RTRFIS	LRK26
C3a	LGEACKKVFL DCCNYITELR RQHARAS	LGE27
C3a	CNYITELRRQHARASHLGLAR	CNY21
Laminina- α 11	SRNLSEIKLLISQARK	SRN16
Laminina- α 1	SRNLSEIKLL ISQARKQAAS IKVAVSADR	SRN29
Laminina- α 1	KDFLSIELFR GRVKV	KDF15
Laminina- α 1	SAVRKKLSVE LSIRT	SAV15
Laminina- α 5	LGTRLRAQSR QRSRPGRWHK VSVRW	LGT25
Laminina- α 5	PPPPLTSASK AIQVFLGGS RKRVL	PPP25
Laminina- α 5	RLRAQSRQRS RPGRWHKVS V RW	RLR22
Laminina- α 1	PGRWHKVS V W	PGR11
Laminina- β 1	RIQNLKITNLRIFVKL	RIQ18
Fibronectina	QPPRARITGY IIKYEKPG	QPP18
Factor Von Willebrand	YIGLKDRKRP SELRRIASQV KYA	YIG23
Vitronectina	AKKQFRFRHN RKG YR	AKK15
Inhibidor de proteína C	SEKTLRKWLK MFKKRQLELY	SEK20
Glucoproteína rica en histidina	GHHPHGHHPH GHHPHGHHPH	GHH20
Cininógeno	KHNLGHGHKH ERDQGHGHR	KHN20
Cininógeno	GGHVLDHKHGHGHGKHKNKG	GGH20
Cininógeno	HKHGHGHGKH KNKGKKNKGK	HKH20
Secuencia sintética	AKKARAACKA RAAKARAACK KARA	AKK24
Secuencia sintética	AKKARAACKA RAAKARA	AKK18
Secuencia sintética	AKKARAACKA RA	AKK12
Secuencia sintética	ARKKAACKAAR KKAACKAARKK AAKA	ARK24
Secuencia sintética	ARKKAACKAAR KKAACKA	ARK16
Secuencia K->H sintética	AHHAAHAAH HAAHAAHAAH HAHA	AHH24:1
Secuencia K->H sintética	AHHAAHAAH HAAHAAHAAH AAHA	AHH24:2

La SEQ ID NO:1 corresponde a KHN20; la SEQ ID NO:3 corresponde a HKH20.

Ejemplo 2

5 Efectos antibacterianos de péptidos ricos en arginina y lisina

La figura 1 describe efectos bactericidas de péptidos ricos en arginina y lisina (listado de secuencias) en *Enterococcus faecalis*. Se hicieron crecer bacterias hasta una fase medio logarítmica en medio Todd-Hewitt (TH). Las bacterias se lavaron y se diluyeron en Tris 10 mM, pH 7,4, que contenía glucosa 5 mM. Se incubaron las bacterias (50 μ l; 2×10^6 cfu/ml) a 37°C durante 2 horas, con el péptido sintético a concentraciones que variaban de 0,03 a 60 μ M. Para cuantificar la actividad bactericida, se colocaron diluciones en serie de la mezcla de incubación en agar TH, seguido de incubación a 37 °C durante la noche y se determinó el número de unidades formadoras de colonias.

- 15 Se incubaron 2×10^6 unidades formadoras de colonias (CFU) \times ml⁻¹ de *E. faecalis* (aislado 2374) en 50 μ l con péptidos e concentraciones que variaban de 0,03 a 60 μ M. (A) Péptidos sintéticos derivados de laminina. Se muestra el efecto de los péptidos del dominio LG de la cadena α 5 (PPP25: SEQ ID NO:13, LGT25: SEQ ID NO:12, RLR22: SEQ ID NO:14, PGR11: SEQ ID NO:15) y de la cadena α 1 (SRN16: SEQ ID NO:8, SRN29:SEQ ID NO:9, KDF15:SEQ ID NO:10, SAV15:SEQ ID NO:11). Un péptido (RIQ18:SEQ ID NO:16) se deriva de la cadena β 1. (B) Tres péptidos se derivan del factor C3 del complemento (LRK26:SEQ ID NO:5, LGE27:SEQ ID NO:6 y CNY21:SEQ ID NO:7), AKK15 de vitronectina, SEK20:SEQ ID NO:19 del inhibidor de proteína C, QPP18:SEQ ID NO:17 de fibronectina, y YIG23:SEQ ID NO:18 del factor von Willebrand. (C) Efectos antibacterianos de las secuencias consenso de unión a heparina (AKKARA)_n (n = 1-4), y (ARKKAAKA)_n (n = 1-3). Los péptidos de n=1 no ejercieron efectos antimicrobianos. Los péptidos que no interaccionaron con heparina; GHRPLDKKREEAPSLRPA, LVTSKGDKELRTGKEKVTSS, y KNNQKSEPLIGRKKKT (Andersson et al., Eur J Biochem, 2004, 271; 271:1219-1226) fueron no antimicrobianos.

Ejemplo 3

30 Análisis del ensayo de difusión radial de péptidos antimicrobianos (tabla 2)

- Se realizaron ensayos de difusión radial (RDA) esencialmente como se describió anteriormente (Andersson et al., Eur J Biochem, 2004, 271:1219-1226). En resumen, se hicieron crecer bacterias (*E. coli*) u hongos (*C. albicans*) hasta fase medio logarítmica en 10 ml de caldo de soja tripticasa (TSB) de fuerza completa (3% p/v) (Becton-Dickinson, Cockeysville, MD). Los microorganismos se lavaron una vez con Tris 10 mM, pH 7,4. Se añadieron 4×10^6 cfu bacterianas o 1×10^5 cfu fúngicas a 5 ml del gel de agarosa subyacente, que consistía en TSB al 0,03% (p/v), agarosa de tipo electroendosmosis baja (baja-EEO) al 1% (p/v) (Sigma, St Louise MO) y una concentración final de Tween 20 al 0,02% (v/v) (Sigma). Se vertió el gel subyacente en una placa de Petri de \varnothing 85 mm. Después de que solidificara la agarosa, se perforaron pocillos de 4 mm de diámetro y se añadieron 6 μ l de muestra de prueba a cada pocillo. Se incubaron las placas a 37 °C durante 3 horas para permitir la difusión de los péptidos. Después, se cubrió el gel subyacente con 5 ml de revestimiento fundido (TBS al 6% y agarosa de bajo-EEO al 1% en dH₂O). La actividad antimicrobiana de un péptido se visualiza como una zona transparente alrededor de cada pocillo después de 18-24 horas de incubación a 37 °C. Se sometieron a prueba péptidos sintéticos en concentraciones de 100 μ M para determinar el efecto antibacteriano relativo al péptido conocido LL-37. Para minimizar la variación entre experimentos, se incluyó un patrón de LL-37 (100 μ M) en cada placa. Las actividades de los péptidos se presentar en unidades de difusión radial ((diámetro de zona transparente en milímetros - diámetro de pocillo) \times 10). Los resultados se muestran en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Origen	Código	Unidades de difusión radial
hCAP-18	LL-37	50
C3a	LRK26	70
C3a	LGE27	40
C3a	CNY21	32
Laminina- α 1	SRN16	77
Laminina- α 1	SRN29	71
Laminina- α 1	KDF15	65
Laminina- α 1	SAV15	75
Laminina- α 5	LGT25	85

Laminina- α 5	PPP25	81
Laminina- α 5	RLR22	92
Laminina- α 1	PGR11	86
Laminina- β 1	RIQ18	93
Fibronectina	QPP18	59
Factor Von Willebrand	YIG23	80
Vitronectina	AKK15	101
Inhibidor de proteína C	SEK20	92
Secuencia sintética	AKK24	67
Secuencia sintética	ARK24	74

Ejemplo 4

Ensayo de difusión radial de péptidos contra *E. coli* y *C. albicans* (Fig 2)

5 La figura 2 ilustra ensayos de difusión radial usando un conjunto de péptidos antimicrobianos. Los ensayos se realizaron como antes. La actividad antimicrobiana de un péptido se visualizó como una zona transparente alrededor de cada pocillo después de 18-24 horas de incubación a 37 °C para bacterias *E. faecalis* (panel A) y 28 °C para *Candida albicans* (panel B).

10

Ejemplo 5

Efectos antibacterianos de péptidos ricos en histidina

15 La figura 3 describe efectos bactericidas de péptidos ricos en histidina. Se hicieron crecer bacterias *E. faecalis* hasta una fase medio logarítmica en medio Todd-Hewitt (TH). Las bacterias se lavaron y se diluyeron en Tris 10 mM, pH 7,4, que contenía glucosa 5 mM con o sin ZnCl 50 μ M o bien tampón-MES 10 mM, glucosa 5 mM, pH 5,5. Se incubaron las bacterias (50 μ l; 2×10^6 cfu/ml) a 37 °C durante 2 horas, variando el péptido sintético en concentraciones de 0,03 a 60 μ M (tampón Tris con o sin cinc), o 30 y 60 μ M (tampón Tris y MES). Para cuantificar la actividad bactericida, se colocaron diluciones en serie de la mezcla de incubación en agar TH, seguido de incubación a 37 °C durante la noche y se determinó el número de unidades formadoras de colonias. (A): Se muestran los efectos de péptidos del dominio de unión a heparina de glucoproteína rica en histidina (GHH20: SEQ ID NO:4) y cininógeno (KHN20: SEQ ID NO:3, GGH20: SEQ ID NO:2 y HKH20: SEQ ID NO:1) en presencia o ausencia de ZnCl 50 μ M. (B): Efectos de péptidos (30 y 60 μ M) en Tris 10 mM, pH 7,4, que contenía glucosa 5 mM o tampón-MES 10 mM, glucosa 5 mM, pH 5,5. Los números indican el % de supervivencia, donde 100% es el control (sin péptido). (C): Efectos de péptidos AHH24:1 y AHH24:2 sobre *E. faecalis* en presencia de una proporción molar de péptido/cinc fija (1:100). Los péptidos sin cinc no ejercieron ninguna actividad antimicrobiana.

20

25

Ejemplo 6

Análisis por microscopía electrónica de los efectos de los péptidos

La figura 4 muestra el análisis de microscopía electrónica de bacterias *Pseudomonas aeruginosa* sometidas a péptidos antimicrobianos. (A) Control. (B-H) Análisis de bacterias tratadas con péptidos a un ~50% de la concentración bactericida requerida. HKH20 también se analizó al 200%. (B) LL-37, (C) ARK24, (D) SEK20, (E) AKK24, (F) LGT25 (G) HKH20, (H) HKH20 al 200% de concentración bactericida. La barra representa 1 μ m excepto para G H (0,5 μ m). El análisis por microscopía electrónica de bacterias tratadas con péptidos demostró diferencias claras en la morfología de las bacterias tratadas en comparación con el control. La catelicidina LL-37 provocó perturbaciones locales y roturas a lo largo de membranas celulares de bacterias *P. aeruginosa*, y ocasionalmente, se encontró material intracelular extracelularmente y se obtuvieron hallazgos similares con los péptidos antimicrobianos endógenos divulgados en el presente documento.

35

40

Ejemplo 7

Unión a heparina de péptidos antimicrobianos endógenos (figura 5)

Se sometieron a prueba péptidos para determinar las actividades de unión a heparina. Se aplicaron los péptidos en membranas de nitrocelulosa (Hybond, Amersham Biosciences). Se bloquearon las membranas (PBS, pH 7,4, Tween 20 al 0,25%, seroalbúmina bovina al 3%) durante una hora y se incubó con heparina radiomarcada durante una hora

45

5 en el mismo tampón. Se sometieron a prueba los péptidos ricos en histidina para determinar la unión a heparina en presencia o ausencia de ZnCl 50 µM. se realizó la radioyodación de heparina como se describe anteriormente (Andersson et al., Eur J Biochem, 2004, 271; 271:1219-1226). Se añadieron polisacáridos no marcados (2 mg/ml) para competición de unión. Se lavaron las membranas (3 x 10 min en PBS, pH 7,4, Tween 20 al 0,25%). Se usó un sistema de radioimagen Bas 2000 (Fuji) para la visualización de la radioactividad.

La heparina no marcada (6 mg/ml) inhibió la unión de ¹²⁵I-heparina a los péptidos derivados de C3 LRK26 y LGE27 y LL-37 (parte superior).

10 Ejemplo 8

Purificación de fragmento antimicrobiano que contiene histidina en níquel-sefarosa (figura 6)

15 Se expresó el dominio D5 de cininógeno humano, que contiene epítomos de péptidos KHN20, GGH20 y HKH20, en una cepa de *Eschericia coli* (BL21DE3). Se indujo la producción de proteínas por la adición de isopropil-tio-β-D-galactósido 1 mM a bacterias con crecimiento exponencial. Después de 3 h de incubación, se recogieron las bacterias por centrifugación. Se resuspendió la suspensión en fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0 (tampón A) y se lisaron las bacterias por ciclos repetidos de congelación-descongelación. Después, se centrifugó el lisado a 29000 g durante 30 min. Se mezcló el sobrenadante con 2 ml de NiNTA-sefarosa cargada con níquel y equilibrada con tampón A. Se cargó la sefarosa en una columna y se lavó con 10 ml de tampón A con Triton X-100 al 0,1%, 10 ml de tampón A, 5 ml de tampón A con NaCl 1 M, 5 ml de tampón A, 10 ml de etanol al 20%, 10 ml de tampón A con imidazol 5 mM, y tampón A con imidazol 30 mM. Se eluyó la proteína (flecha) en imidazol 500 mM. Este dominio ejerció efectos antibacterianos contra E. coli en ensayos de difusión radial.

25 **Listado de secuencias**

<110> Dermagen AB
<120> Péptidos antimicrobianos novedosos
<130> xxxxx

30 <160> 22
<170> PatentIn versión 3.1
<210> 1
<211> 20
<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> derivado de cininógeno
<400> 1

His Lys His Gly His Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys Lys
1 5 10 15

Asn Gly Lys His
20

40 <210> 2
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>

45 <223> derivado de cininógeno
<400> 2

Gly Gly His Val Leu Asp His Lys His Gly His Gly His Gly His Lys
1 5 10 15

Asn Lys Gly
<210> 3

50 <211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> derivado de cininógeno
<400> 3

Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys His Glu Arg Asp Gln Gly His
 1 5 10 15

Gly His Gln Arg
 20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> derivado de glucoproteína rica en histidina

<400> 4

Gly His His Pro His Gly His His Pro His Gly His His Pro His Gly
 1 5 10 15

His His Pro His
 20

10 <210> 5

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> derivado del factor C3 del complemento

<400> 5

Leu Arg Lys Cys Cys Glu Asp Gly Met Arg Glu Asn Pro Met Arg Phe
 1 5 10 15

Ser Cys Gln Arg Arg Thr Arg Phe Ile Ser
 20 25

<210> 6

20 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> derivado del factor C3 del complemento

25 <400> 6

Leu Gly Glu Ala Cys Lys Lys Val Phe Leu Asp Cys Cys Asn Tyr Ile
 1 5 10 15

Thr Glu Leu Arg Arg Gln His Ala Arg Ala Ser
 20 25

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> derivado del factor C3 del complemento

<400> 7

Cys Asn Tyr Ile Thr Glu Leu Arg Arg Gln His Ala Arg Ala Ser His
 1 5 10 15

Leu Gly Leu Ala Arg
 20

35 <210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> derivado de laminina

<400> 8

Ser Arg Asn Leu Ser Glu Ile Lys Leu Leu Ile Ser Gln Ala Arg Lys
 1 5 10 15

<210> 9

<211> 29

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 395 206 T3

<220>

<223> derivado de laminina

<400> 9

Ser Arg Asn Leu Ser Glu Ile Lys Leu Leu Ile Ser Gln Ala Arg Lys
1 5 10 15

Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Asp Arg
20 25

5 <210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> derivado de laminina

<400> 10

Lys Asp Phe Leu Ser Ile Glu Leu Phe Arg Gly Arg Val Lys Val
1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> derivado de laminina

<400> 11

20 Ser Ala Val Arg Lys Lys Leu Ser Val Glu Leu Ser Ile Arg Thr
1 5 10 15

<210> 12

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> derivado de laminina

<400> 12

Leu Gly Thr Arg Leu Arg Ala Gln Ser Arg Gln Arg Ser Arg Pro Gly
1 5 10 15

Arg Trp His Lys Val Ser Val Arg Trp
20 25

<210> 13

30 <211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> derivado de laminina

35 <400> 13

Pro Pro Pro Pro Leu Thr Ser Ala Ser Lys Ala Ile Gln Val Phe Leu
1 5 10 15

Leu Gly Gly Ser Arg Lys Arg Val Leu
20 25

<210> 14

<211> 22

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> derivado de laminina

<400> 14

Arg Leu Arg Ala Gln Ser Arg Gln Arg Ser Arg Pro Gly Arg Trp His
1 5 10 15

Lys Val Ser Val Arg Trp
20

45 <210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> derivado de laminina
 <400> 15
Pro Gly Arg Trp His Lys Val Ser Val Arg Trp
 5 **1 5 10**
 <210> 16
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> derivado de laminina
 <400> 16
Arg Ile Gln Asn Leu Leu Lys Ile Thr Asn Leu Arg Ile Lys Phe Val
1 5 10 15

Lys Leu
 15 <210> 17
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> derivado de fibronectina
 20 <400> 17
Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys
1 5 10 15

Pro Gly
 25 <210> 18
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> derivado del factor Von Willebrand
 <400> 18
Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu Leu Arg Arg Ile
1 5 10 15

Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala
 30 **20**
 <210> 19
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> derivado de proteína C
 <400> 19
Ser Glu Lys Thr Leu Arg Lys Trp Leu Lys Met Phe Lys Lys Arg Gln
1 5 10 15

Leu Glu Leu Tyr
 40 **20**
 <210> 20
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial
 <400> 20
Ala Arg Lys Lys Ala Ala Lys Ala Ala Arg Lys Lys Ala Ala Lys Ala
1 5 10 15

Ala Arg Lys Lys Ala Ala Lys Ala
 45 **20**
 <210> 21

ES 2 395 206 T3

<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
5 <223> Secuencia artificial
<400> 21

Ala Lys Lys Ala Arg Ala Ala Lys Lys Ala Arg Ala Ala Lys Lys Ala
1 5 10 15

Arg Ala Ala Lys Lys Ala Arg Ala
20

<210> 22
<211> 15
10 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> derivado de vitronectina
<400> 22

Ala Lys Lys Gln Arg Phe Arg His Arg Asn Arg Lys Gly Tyr Arg
1 5 10 15

15

REIVINDICACIONES

1. Uso de un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y 3 en una solución de limpieza para evitar, inhibir, reducir o destruir el crecimiento bacteriano.
- 5
2. Uso de un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y 3 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección antimicrobiana o tratamiento profiláctico de una infección bacteriana.
- 10
3. Uso del péptido de acuerdo con la reivindicación 2, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de úlceras cutáneas crónicas, heridas por quemadura y heridas graves infectadas, eccema cutáneo infectado, impétigo, dermatitis atópica, acné, otitis externa, infecciones vaginales, dermatitis seborreica, infecciones orales, paradontitis, conjuntivitis y neumonía.
- 15
4. Uso del péptido de acuerdo con la reivindicación 2, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico de heridas por quemadura, después de cirugía y traumatismo cutáneo.
5. Uso del péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-4, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección antimicrobiana o tratamiento profiláctico de una infección bacteriana, en el que dicha bacteria se selecciona del grupo que consiste en *Enterococcus faecalis*, *Eschericia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus neumonía*, *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*.
- 20
6. Uso del péptido de acuerdo con la reivindicación 5, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección antimicrobiana o tratamiento profiláctico de una infección bacteriana, en el que dicha bacteria se selecciona de *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Eschericia coli*.
- 25

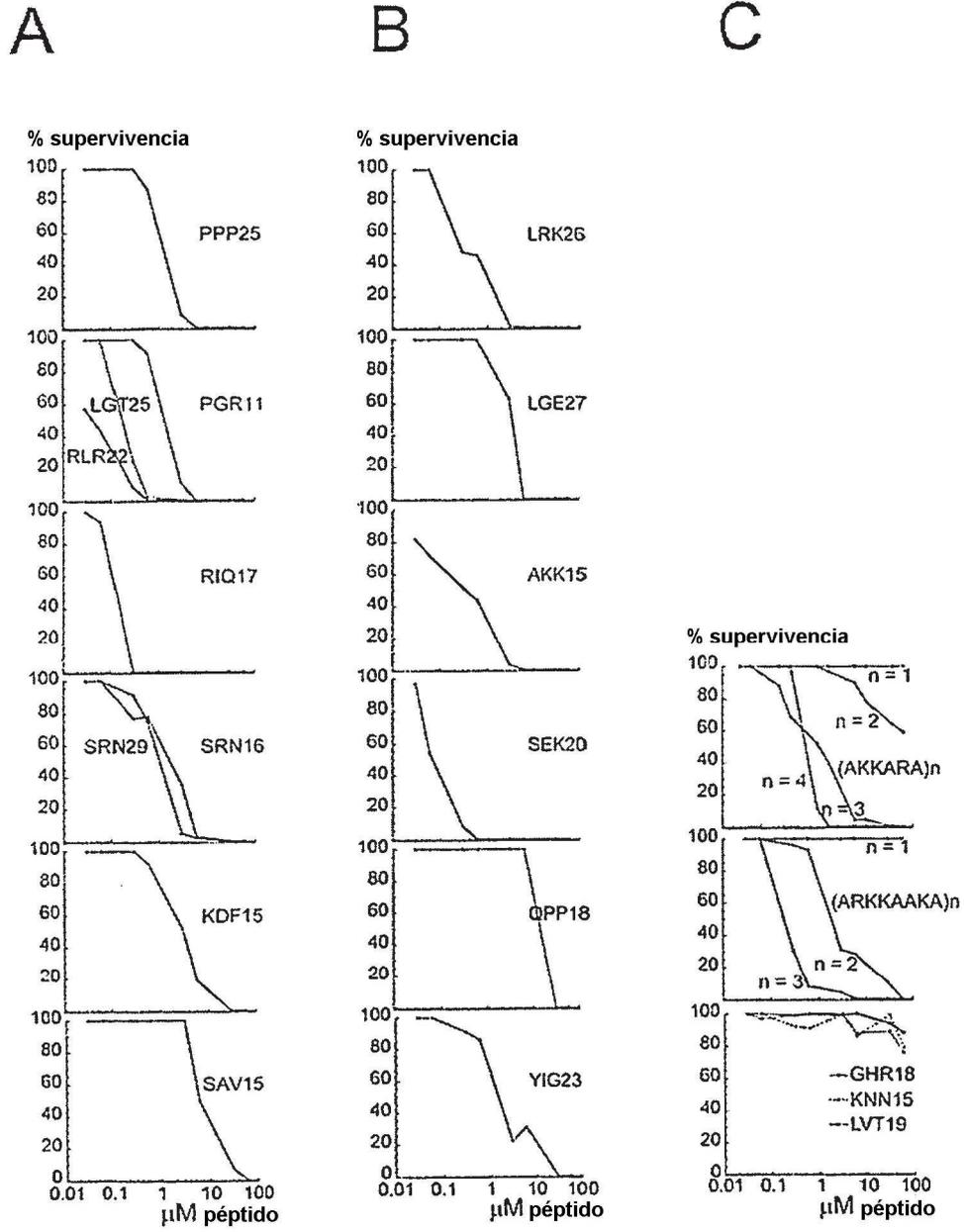


Figura 1

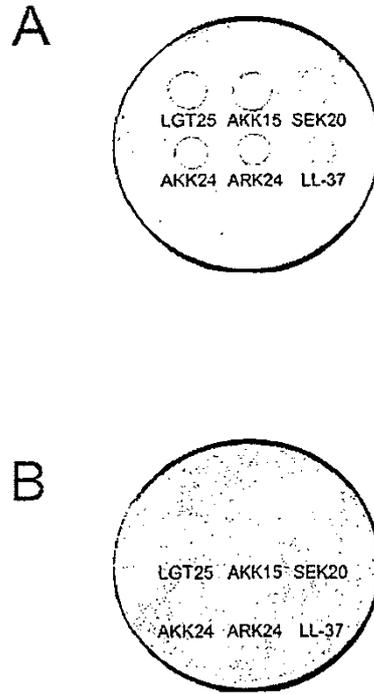


Figura 2

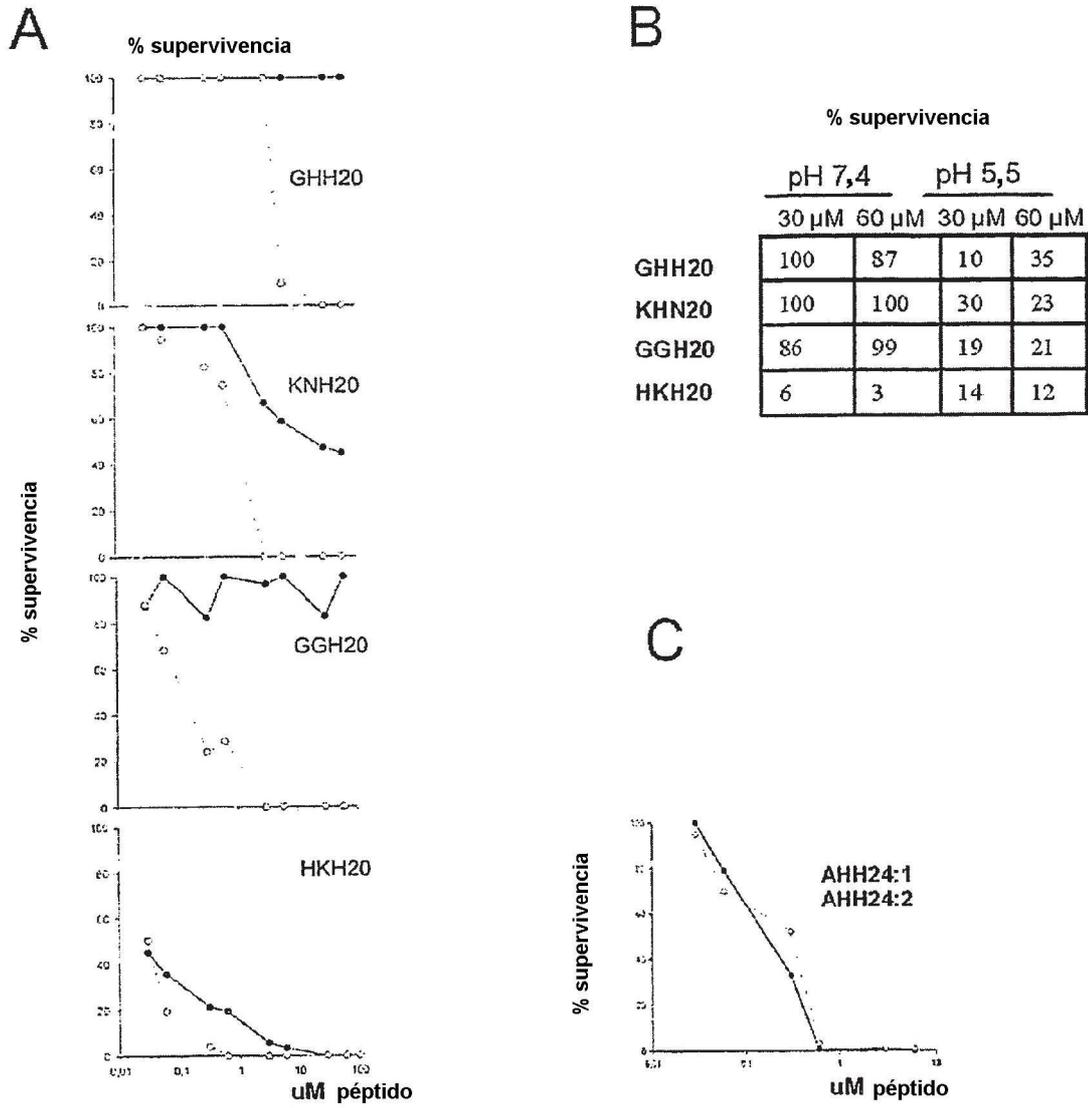


Figura 3



Figura 4

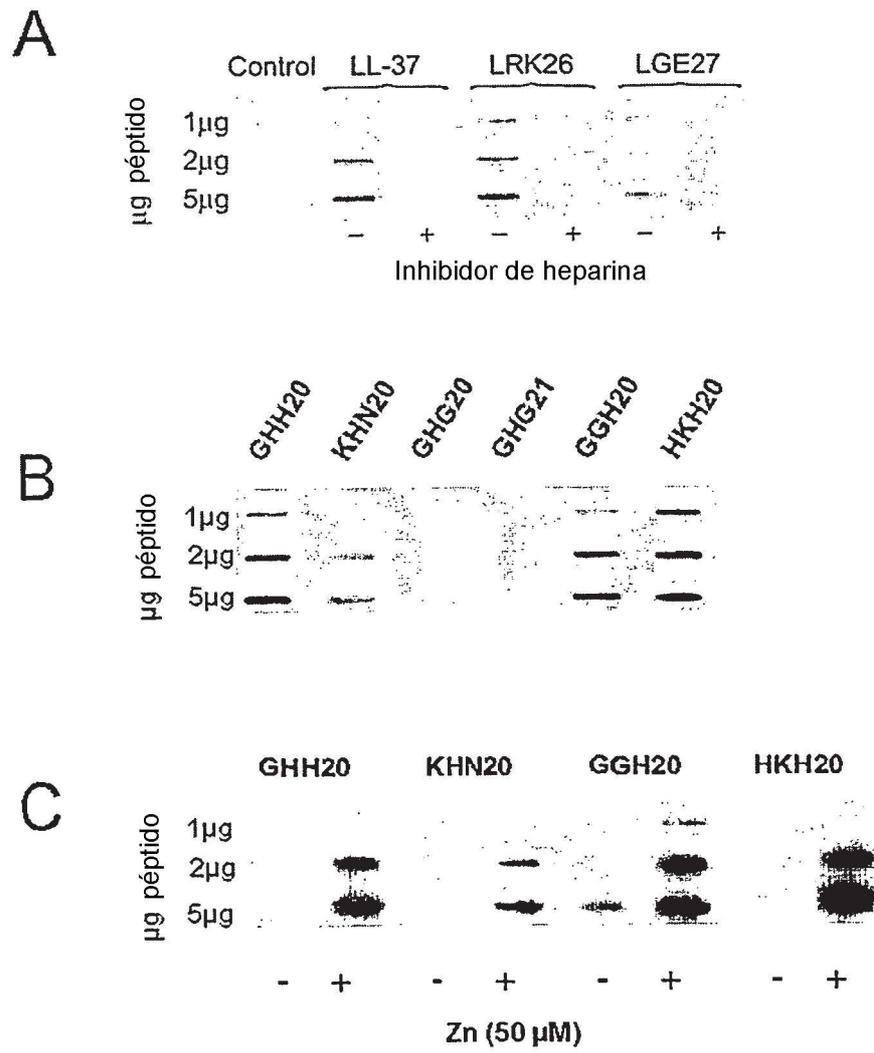


Figura 5

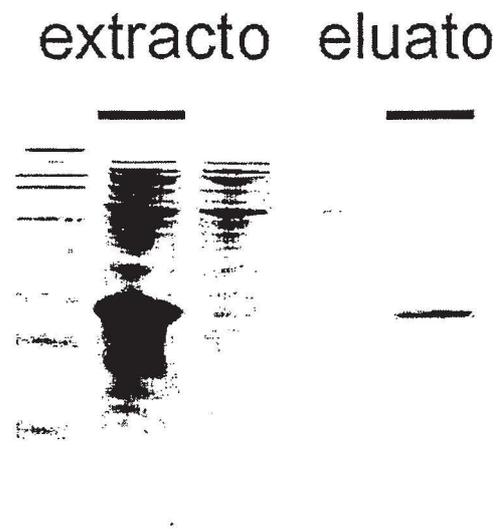


Figura 6