

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 605**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.01.2008 E 08700451 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012 EP 2125877**

54 Título: **Péptido antibiótico derivado de plantas rico en glicina**

30 Prioridad:

29.12.2006 BR PI0605658

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2013

73 Titular/es:

**UNIÃO BRASILIENSE DE EDUCAÇÃO E CULTURA - UBEC ASSOCIAÇÃO CIVIL CONFSSIONAL MANTENEDORA DA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA (50.0%)
Campus I - Q.S. 07 Lote 01 EPCT Águas Claras
71966-700 Taguatinga - DF, BR y
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA -RIA-EMBRAPA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FRANCO, OCTÁVIO LUIZ;
PELEGRINI, PATRÍCIA BARBOSA;
JUNIOR, CARLOS BLOCH y
SILVA, LUCIANO PAULINO DA**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 410 605 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

Péptido antibiótico derivado de plantas rico en glicina

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo péptido extraído de las semillas de guayaba (*Psidium guajava*), que posee actividad bactericida, especialmente contra bacterias gram negativas que se sabe que provocan infecciones urinarias, hospitalarias y del tracto intestinal (*Proteus* sp. y *Klebsiella* sp.). El péptido posee la secuencia de aminoácidos RESPSRMEC YEQAERYGYG GYGGGRYGGG YGSGRGQPVG QGVERSHDDN RNQPR, y pertenece a la clase de proteínas ricas en glicina con un peso molecular aproximado de 5 kDa.

Antecedentes de la invención

15 En las últimas dos décadas ha habido un aumento significativo de la resistencia bacteriana a antibióticos sintéticos disponibles en el mercado. Las bacterias gram negativas de la familia *Enterobacteriaceae*, tales como *Klebsiella* sp. y *Proteus* sp., que eran anteriormente susceptibles a medicinas son en la actualidad la principal causa de infecciones hospitalarias en varios países en desarrollo (Mendes, 2000). En consecuencia, se ha presentado un aumento de la tasa de mortalidad de pacientes inmunodeprimidos infectados con estas bacterias. En respuesta a este problema, se han aislado varios compuestos de origen proteico que tienen actividad antimicrobiana de diferentes especies de plantas, mamíferos y microorganismos (Campos *et al.*, 2006; Bevins, 2006).

25 Varias proteínas vegetales han demostrado actividad contra bacterias y hongos (Selitrennikoff, 2001). Normalmente tienen un papel preponderante en la defensa de la planta, protegiéndola de patógenos ambientales. Estas proteínas se han clasificado dentro de diversos grupos y familias de acuerdo con sus similitudes estructurales y funcionales. Estas incluyen ciclótidos, defensinas, γ -tiorinas, Proteínas Transportadoras de Lípidos (LTP), lectinas, inhibidores de enzimas digestivas y diversas otras (Selitrennikoff, 2001, Pelegrini y Franco, 2005; Franco *et al.*, 2002; Pelegrini *et al.*, 2006).

30 Las proteínas ricas en glicina (o GRP) consisten en un nuevo grupo de moléculas de defensa vegetal que se ha descrito que tienen actividad antimicrobiana. Se caracterizaron inicialmente como proteínas de almacenamiento, usándose como fuentes esenciales de aminoácidos (Mousavi, 2005). Estudios anteriores han indicado la actividad de proteínas ricas en glicina en la adaptación al frío y en tolerancia creciente a temperaturas bajas, que actúan como factores de unión a ARN (Shinozuka, 2006). Además, se ha demostrado que la expresión de su ARNm correspondiente aumenta en plantas expuestas a temperaturas bajas (Shinozuka, 2006). Además, se ha observado que las proteínas ricas en glicina pueden alterar la germinación y el crecimiento de plantas en condiciones de tensión, tales como altas concentraciones salinas o deshidratación (Kwak, 2005). Estudios anteriores indicaron que ocho proteínas ricas en glicina aisladas de semillas de *Triticum kiharae* no demostraron actividad antimicrobiana contra bacterias pero mostraron, sin embargo, actividad contra hongos filamentosos, tales como *Helminthosporium sativum* y *Fusarium culmorum* (Egorov, 2005). Las GRP pueden caracterizarse por su alto porcentaje de restos de glicina y su secuencia primaria pero, sin embargo, esta varía con cada planta y organismo (Mousavi, 2005). Las proteínas ricas en glicina pueden clasificarse dentro de tres grupos diferentes de acuerdo con su contenido de glicina. El primer grupo contiene proteínas que presentan más del 70% de restos de glicina en la secuencia de aminoácidos, tales como GRP de tomate y plantas de sal (Ringli, 2001). También hay un tercer grupo que incluye proteínas de alto contenido en glicina pero que no tienen dominios específicos (Ringli, 2001). Las proteínas de este grupo son normalmente hidrófobas en lugar de hidrófilas provocándose posiblemente este rasgo por la presencia de tirosina y fenilalanina (Ringli, 2001). La estructura secundaria de las GRP no se ha estudiado completamente pero las investigaciones preliminares indican que puede ser predominantemente rica en láminas β (Matsui, 1995).

50 Investigaciones previas indican que se encuentran genes de proteínas ricas en glicina principalmente en tejidos vasculares, más específicamente en el xilema (Ryser, 1992; Keller, 1988; Keller, 1989), a pesar de que también se han encontrado en hipocótilos y pistilos (Ye, 1991). La expresión de genes de GRP parece estar ligada a la inducción por tensión e influida por cambios ambientales, tales como heridas, tratamiento hormonal, temperaturas bajas y deshidratación (Keller, 1988; de Oliveira, 1990; Bergeron, 1994; Keister, 1995; Laberge, 1993; Condit, 1987).

55 Este trabajo tiene el objetivo de purificar y caracterizar una proteína antimicrobiana de semillas de guayaba (*PgAMP1*) similar a proteínas ricas en glicina. Se demostró que esta proteína era capaz de inhibir el crecimiento de dos bacterias gram negativas, ambas reconocidas como causantes de infecciones hospitalarias, así como infecciones urinarias y gastrointestinales. Este es el primer informe de una proteína del grupo de proteínas ricas en glicina que demuestra actividad contra bacterias patógenas humanas.

60 La proteína *PgAMP1* identificada de la presente investigación y objeto de la presente invención demostró ser capaz de inhibir el crecimiento de dos bacterias gram negativas (*Proteus* sp. y *Klebsiella* sp.) y la secuencia de 55 aminoácidos permitió su clasificación como un miembro de las proteínas ricas en glicina.

65

La búsqueda de referencias anteriores desveló documentos que describían la actividad antibacteriana de aceites esenciales o extractos (acuosos, hidroalcohólicos, etanólicos, metabólicos y/o clorofórmicos) de *Psidium guajava* contra diferentes especies bacterianas (véase Tabla 1, posterior). Se usaron diferentes partes de la planta para obtener los extractos, principalmente las hojas y la corteza del tallo. No hay informes del uso de semillas de *P. guajava* para obtener compuestos que tengan actividad antibacteriana.

Tabla 1: Microorganismos e informes respectivos de actividad antibacteriana en extractos o aceites esenciales de *Psidium guajava*.

Especie	Referencias
<i>Actinomyces sp.</i>	Razak <i>et al.</i> (2006).
<i>Bacillus anthracis</i>	Akinpelu y Onakoya (2006).
<i>Bacillus cereus</i>	Akinpelu y Onakoya (2006); Arima y Danno (2002).
<i>Bacillus subtilis</i>	Akinpelu y Onakoya (2006); Karawya <i>et al.</i> (2001); Martínez <i>et al.</i> (1997); Rabe y van Staden (1997); Sanches <i>et al.</i> (2005).
<i>Clostridium sporogenes</i>	Akinpelu y Onakoya (2006).
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	Akinpelu y Onakoya (2006).
<i>Escherichia coli</i>	Abdelrahim <i>et al.</i> (2002); Akinpelu y Onakoya (2006); Carvalho (2002); Chah <i>et al.</i> (2006); Martínez <i>et al.</i> (1997); Rivera de León <i>et al.</i> (2001); Vieira <i>et al.</i> (2001); Voravuthikunchai <i>et al.</i> (2004).
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Abdelrahim <i>et al.</i> (2002); Akinpelu y Onakoya (2006); Rivera de León <i>et al.</i> (2001).
<i>Mycobacterium phlei</i>	Karawya <i>et al.</i> (2001).
<i>Propionibacterium acnes</i>	Qadan <i>et al.</i> (2005).
<i>Proteus mirabilis</i>	Gonçalves <i>et al.</i> (2005); Karawya <i>et al.</i> (2001).
<i>Proteus morgani</i>	Karawya <i>et al.</i> (2001).
<i>Proteus spp.</i>	Carvalho (2002); Chah <i>et al.</i> (2006).
<i>Proteus vulgaris</i>	Abdelrahim <i>et al.</i> (2002); Karawya <i>et al.</i> (2001).
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Abdelrahim <i>et al.</i> (2002); Akinpelu y Onakoya (2006); Carvalho (2002); Chah <i>et al.</i> (2006); Gnan y Demello (1999); Martínez <i>et al.</i> (1997); Rivera de León <i>et al.</i> (2001).
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Akinpelu y Onakoya (2006).
<i>Salmonella enteritidis</i>	Arima y Danno (2002).
<i>Salmonella paratyphi</i>	Lutterodt <i>et al.</i> (1999).
<i>Salmonella spp.</i>	Carvalho (2002).
<i>Salmonella typhi</i>	Lutterodt <i>et al.</i> (1999).
<i>Salmonella typhimurium</i>	Gnan y Demello (1999); Lutterodt <i>et al.</i> (1999)
<i>Shigella dysenteriae</i>	Akinpelu y Onakoya (2006); Ali <i>et al.</i> (1997); Ali <i>et al.</i> (1996); Lutterodt <i>et al.</i> (1999)
<i>Shigella flexneri</i>	Lutterodt <i>et al.</i> (1999).
<i>Shigella sonnei</i>	Lutterodt <i>et al.</i> (1999).
<i>Shigella spp</i>	Carvalho (2002); Chah <i>et al.</i> (2006).
<i>Staphylococcus aureus</i>	Abdelrahim <i>et al.</i> (2002); Akinpelu y Onakoya (2006); Betoni <i>et al.</i> (2006); Chah <i>et al.</i> (2006); Gnan y Demello (1999); Gonçalves <i>et al.</i> (2005); Jaiarj <i>et al.</i> (1999); Lutterodt <i>et al.</i> (1999); Martínez <i>et al.</i> (1997); Nascimento <i>et al.</i> (2000); Qadan <i>et al.</i> (2005); Rabe y van Staden (1997); Rivera de León <i>et al.</i> (2001); Sanches <i>et al.</i> (2005); Vieira <i>et al.</i> (2001).
<i>Streptococcus epidermidis</i>	Gnan y Demello (1999); Qadan <i>et al.</i> (2005); Rabe y van Staden (1997).
<i>Streptococcus faecalis</i>	Akinpelu y Onakoya (2006).
<i>Streptococcus mitis</i>	Razak <i>et al.</i> (2006).
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Gnan y Demello (1999); Gonçalves <i>et al.</i> (2005)
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Razak <i>et al.</i> (2006).
<i>Vibrio cholerae</i>	Lutterodt <i>et al.</i> (1999).

Los documentos encontrados cuando se investigan antecedentes también confirmaron que no hay consenso con respecto a la especie para la que los extractos de *P. guajava* mostraron actividad inhibidora. Algunos estudios indicaron, por ejemplo, actividad antimicrobiana de *P. guajava* en bacterias de los géneros **Proteus** (Abdelrahim *et al.*, 2002; Carvalho, 2002; Chah *et al.*, 2006; Gonçalves *et al.*, 2005; Karawya *et al.*, 2001) y **Klebsiella** (Abdelrahim *et al.*, 2002; Akinpelu y Onakoya, 2006; Rivera de León *et al.*, 2001), mientras que otros (Rabe y van Staden, 1997; Gnan y Demello, 1999; Nascimento *et al.*, 2000) no identificaron ninguna actividad en estas bacterias. Por lo tanto, la determinación de la composición de los extractos (de acuerdo con el origen del material vegetal o los disolventes usados en la extracción, por ejemplo) demostró ser un factor importante al verificar la actividad antibacteriana de *P. guajava*.

10

Algunos de los compuestos de los extractos que se ha identificado que tienen actividad antimicrobiana incluyeron **flavonoides**, tales como guajaverina, quercetina (Arima y Danno, 2002 y Rabe y van Staden, 1997), morin-3-O- α -L-lixo-piranósido y morin-3-O- α -L-arabo-piranósido (Arima y Danno, 2002; documento JP2004250406); **triterpenos**, tales como α y β -amirina (Sanches *et al.*, 2005); **sesquiterpenos** tales como cariofileno, aromadendreno, α y β -selineno o β -bisaboleno (Karawya *et al.*, 2001); **esteroles** tales como β -sitosterol (Sanches *et al.*, 2005) y **taninos** (Akinpelu y Onakoya, 2006). Ninguno de estos trabajos, sin embargo, describe el péptido PgAMP1 o ninguna otra proteína rica en glicina derivada de *P. guajava*.

15

Las proteínas ricas en glicina son conocidas por su actividad antimicrobiana (Egorov *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2000; van Kan *et al.*, 2001; documentos CN1699409; CN1699416; EP1693381), pero hay, no obstante, pocos estudios que se refieran a una acción específica contra bacterias (Park *et al.*, 2000; van Kan *et al.*, 2001; documento EP1693381).

20

Park *et al.* (2000) describen dos nuevos péptidos aislados de *Capsella bursa-pastoris* que presentan actividad inhibidora contra bacterias gram negativas. Van Kan *et al.* (2001) describe la acción de clavantina A en la bacteria *Micrococcus flavus*.

25

La solicitud de patente europea EP1693381 describe varias secuencias de proteínas ricas en glicina que muestran actividad antibacteriana. Los péptidos descritos en este trabajo tienen pesos moleculares por debajo de 10 kDa y derivan de diversos organismos que varían del hombre a (*Saccharomyces cerevisiae*). Debido a su actividad antibiótica, los inventores proponen el uso de estos péptidos en la prevención y/o tratamiento de enfermedades infecciosas provocadas por bacterias y, más específicamente, en los casos en los que los organismos patógenos han desarrollado resistencia a los antibióticos habitualmente prescritos. Para confirmar la actividad antibacteriana de estas secuencias, los inventores adelantaron experimentos que implicaban a los péptidos descritos y las especies *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

30

Debería observarse que la presente invención representa un avance tecnológico considerando que a pesar de la existencia de informes acerca de la actividad antibacteriana de proteínas ricas en glicina, ninguno de estos documentos describe un péptido que derive de *P. guajava* o que muestre acción contra las bacterias de los géneros *Proteus* sp. y *Klebsiella* sp.

35

40

Descripción resumida de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo péptido extraído de semillas de guayaba (*Psidium guajava*), que posee actividad bactericida, especialmente contra bacterias gram negativas que se sabe que provocan infecciones urinarias, hospitalarias y del tracto intestinal, (*Proteus* sp. y *Klebsiella* sp.).

45

El péptido posee la secuencia de aminoácidos RESPSSRMEC YEQAERYGYG GYGGGRYGGG YGSGRGQPVG QGVERSHDDN RNQPR y pertenece a la clase de proteínas ricas en glicina con un peso molecular de aproximadamente 5 kDa.

50

En consecuencia, la presente invención se refiere a un péptido rico de glicina antibiótico con actividad antimicrobiana que comprende la secuencia de aminoácidos idéntica expuesta a continuación: RESPSSRMECYEQAERYGGYGGGRYGGGYGSGRGQPVGQGVERSHDDNRNQPR.

La cadena peptídica de longitud completa o partes de la misma del péptido antibiótico de la presente invención puede comprender los aminoácidos α -D y/o α -L.

55

La presente invención también se refiere a composiciones antibióticas para tratamiento humano, veterinario y vegetal. Las composiciones deberían incluir al menos un péptido objeto de la presente invención, así como un excipiente farmacéuticamente adecuado o vehículo agrícola aceptable. Como alternativa, el péptido puede usarse en la transformación de organismos con la intención de aportar resistencia a ciertos patógenos, así como otras ventajas adaptativas, así como características fenotípicas de múltiple interés.

60

En consecuencia, la presente invención se refiere a una composición para inhibir el desarrollo de una célula de *Proteus* sp. o una célula de *Klebsiella* sp., que comprende:

- 5 (a) al menos un péptido antibiótico de acuerdo con la presente invención,
 (b) opcionalmente uno o más péptidos antibióticos que tienen actividad antimicrobiana; y
 (c) un excipiente farmacéutico adecuado.

La composición puede ser adecuada para usos humanos, veterinarios o farmacéuticos.

- 10 La presente invención se refiere además a una composición para detener fitopatógenos y para proteger plantas contra patógenos, que comprende:

- (a) al menos un péptido antibiótico de acuerdo con la presente invención, y
 (b) un vehículo agrícolamente aceptable.

15

Breve descripción de los dibujos

- Figura 1:** A) Cromatografía en Red-Sepharose Cl-6B del extracto en bruto de semilla de guayaba (*P. guajava*). La flecha negra indica la elección inicial de las proteínas conservadas usando Tris-HCl que contiene NaCl 3,0 M. B) Perfil de la cromatografía de fase inversa de HPLC (Vydac C18-TP) de las fracciones retenidas en la Red-Sepharose generadas a partir de la semilla de guayaba (*P. guajava*). La línea diagonal indica el gradiente de acetonitrilo lineal. Además, la gráfica en la esquina derecha representa la nueva cromatografía de la fracción proteica en la misma columna.
- 20 **Figura 2:** SDS-PAGE de *Pg*-AMP1 (línea 2, flecha). La línea 1 corresponde a un marcador molecular.

Figura 3: A) Secuencia de aminoácidos de *Pg*-AMP1. N indica el extremo N terminal y C indica el extremo C terminal. B) Alineamiento de *Pg*-AMP1 con otras proteínas ricas en glicina de plantas.

- 30 **Figura 4:** Bioensayo bacteriano usando *Pg*-AMP1 purificada contra A) *Proteus* sp. y B) *Klebsiella* sp. (■) indica control negativo, (▲) indica control positivo y (◆) indica ensayo usando *Pg*-AMP1.

Figura 5: Representación en forma de dibujo de AMP-*Pg*GRP. La capa electroestática está representada en azul para cargas positivas, en rojo para cargas negativas y blanco para no polares. Las espirales rojas representan hélices α y los tubos verdes representan bucles. La cadena lateral está representada por líneas verdes.

35

Figura 6: Representación de AMP-*Pg*GRP por dimerismo. La capa electroestática está representada en azul para cargas positivas, en rojo para cargas negativas y blanco para no polares. Las espirales rojas representan hélices α y los tubos verdes representan bucles.

40

Descripción detallada de la invención

Uno de los problemas actuales a los que se enfrenta la salud humana consiste en el aumento de la resistencia de las bacterias patógenas a los antibióticos sintéticos comercializados en la actualidad. Esto hace difícil el tratamiento de varias enfermedades, tales como infecciones de los tractos urinario y gastrointestinal. Con la intención de reducir el número de casos de estas enfermedades así como reducir la tasa de resistencia bacteriana, se han realizado diversos estudios en relación con la acción de péptidos de defensa que tienen actividad antibacteriana. En el presente proyecto, se purificó una proteína de las semillas de la planta de guayaba, *Pg*-AMP1, y se caracterizó bioquímica y estructuralmente con el fin de desarrollar una nueva estrategia contra bacterias que provocan infecciones de los tractos urinario y gastrointestinal. Además, se realizaron bioensayos en esta proteína contra las dos bacterias gram negativas que son las principales causas de las enfermedades diana: *Klebsiella* sp. y *Proteus* sp. La estructura tridimensional de *Pg*-AMP1 se obtuvo por medio de estudios por ordenador que revelaron la formación estructural dimerica para actividad antibacteriana. Estos resultados permiten el desarrollo de nuevos antibióticos capaces de retardar el proceso de resistencia bacteriana y también ayudar en el tratamiento de enfermedades.

50

Extracción y aislamiento de las proteínas de semillas de guayaba (*P. guaba*):

Las proteínas de semillas de guayaba se extrajeron usando una solución de NaCl 0,6 M y HCl 0,1% (1:3 p/v). El extracto bruto se centrifugó y el sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio (0-100%). Después de la precipitación, las fracciones se centrifugaron de nuevo a 5.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El precipitado se resuspendió, se dializó contra agua destilada y se situó en una columna de afinidad de Red-Sepharose equilibrada con Tris-HCl 0,15 M pH 7,0 que contenía CaCl₂ 50 mM. Las fracciones descartadas se retiraron con tampón de equilibrio y las fracciones retenidas se eluyeron mediante la adición de tampón de equilibrio aumentado con NaCl 3,0 M. Después de diálisis y liofilización, se diluyeron 1,0 mg de la fracción retenida con ácido trifluoroacético 0,1% y se situó en una columna de cromatografía de fase inversa de HPLC (Vydac C-18TP), en la que las proteínas se

65

eluyeron con un gradiente lineal de acetonitrilo (0-100%).

Análisis de peso molecular:

5 La masa molecular de las proteínas obtenidas por HPLC se analizó mediante SDS-PAGE de acuerdo con el método de Laemmli *et al.* (1970) con modificaciones. El análisis de peso molecular se realizó con gel de poliacrilamida al 5%. Las muestras se sometieron a 200 voltios durante un periodo de 45 minutos y se tiñeron con nitrato de plata. Las muestras de HPLC se analizaron con MALDI-TOF (Voyager-DE STR Bioworstations), de acuerdo con el método de Franco *et al.* (2000). Las proteínas liofilizadas se diluyeron con ácido trifluoroacético 0,1% y se aplicaron a una
10 matriz compuesta de ácido sinápico (acetonitrilo / ácido trifluoroacético 0,1% 1:1 v/v). Esta solución se homogenizó y se situó en equipamiento MALDI-TOF. Los iones se eliminaron por radiación láser a 337 nm, y se aceleraron a una potencia de 23 kV. Las muestras se ionizaron después con 100-200 ráfagas por un pulso de láser de 3-ns. La señal se evaluó en una fracción de 500 MHz y los datos se mostraron por un sistema convencional Voyager.

15 Secuenciación de aminoácidos:

Las muestras obtenidas del HPLC se liofilizaron con el fin de retirar el acetonitrilo y el ácido trifluoroacético. La secuencia proteica se determinó usando análisis de MS como se describe por Wang *et al.* (2000) con modificaciones. Las muestras proteicas se incubaron con tripsina 10 µg/ml en Tris-HCl 2,5 mM durante 24 horas a
20 37 °C. Los fragmentos tripticos se eluyeron después en acetonitrilo 50% y ácido trifluoroacético 0,5% por difusión facilitada por ultrasonificación. Las fracciones liofilizadas se disolvieron en agua nanopura, se mezclaron en una solución saturada de una matriz compuesta de alfa-ciano-4-hidroxicinámico (1:3), se depositaron en una placa de tipo Anchorchip de 600 mm y se dejó secar a temperatura ambiente. Se determinaron las masas moleculares exactas de los componentes moleculares usando un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF UltraFlex II (Bruker
25 Daltonics, Alemania). Los espectros se obtuvieron en un modo de extracción de reflexión retardada con una masa que variaba entre 1.000-20.000 Da. Los espectros de 64 ráfagas en 20 posiciones diferentes fueron continuos para proporcionar una “huella” de la masa proteica para la muestra. Los iones de las proteínas generados por autólisis de la tripsina se usaron como modelos de patrón interno para calibrar la masa del espectro. Las masas de las proteínas se analizaron por el software Ms-Fit, basándose en los siguientes parámetros: tolerancia de masas de 0,5 Da,
30 mínimo de cuatro combinaciones peptídicas y sin errores de escisión. Se usó calibración externa en modo de funcionamiento reflejo y positivo. Los iones que presentaban una relación de señal-sonido apropiada se sometieron a fragmentación (MS/MS) en modo de funcionamiento LIFT. Las isoformas halladas para cualquier proteína se analizaron por el FindMod y Peptide Mass en ExPaSy para predecir sus posibles modificaciones. Se realizó homología de secuencia usando los programas informáticos BioEdit y FASTA3.

35

Análisis “por ordenador”:

La secuencia de aminoácidos obtenida se comparó con otras proteínas en el Banco de Datos de Proteínas del NCBI (www.ncbi.nih.gov). Se usó un alineamiento usando software ClustalW (Thompson, 1994) y BioEdit (Page, 1996)
40 para la proteína con el fin de analizar similitudes de secuencia primaria dentro del grupo de proteínas ricas en glicina. También se preparó un árbol filogenético usando la proteína de guayaba con otras proteínas que mostraron mayor identidad por medio del software TreeView (Hall, 1999).

Modelado molecular:

45

Se realizó un alineamiento comparativo con la base de datos de estructura proteica para dilucidar la estructura tridimensional de AMP-PgGRP. Para esto se usó el Bionfo Meta Server (Ginalski *et al.*, 2003) pero este no desveló ninguna estructura similar. Por lo tanto, se llevaron a cabo técnicas de predicción de estructura proteica desde el principio. Para esto se usó el paquete de dinámica molecular Gromacs (Lindahl *et al.*, 2001). Se construyó
50 inicialmente una estructura primaria usando el software View Swiss PDB Viewer (Guex *et al.*, 1997). Esta estructura se situó después en una caja cúbica, se centralizó y se cargó con moléculas de agua. Se ejecutó una simulación de minimización de energía parcial usando 2000 etapas del mayor desnivel con la intención de retirar posibles impedimentos esteroquímicos. Esto siguió de una simulación completa usando una temperatura de acoplamiento y presión de 300 k y 1 atm., respectivamente, y ecuaciones del movimiento de Newton (MD) como método dinámico a
55 60.000 picosegundos. La simulación completa se ejecutó en una estación de trabajo Sun AMD Opteron biprocesada. La trayectoria y el modelo final se visualizaron usando el software Pymol (Delano, 2002).

Bioensayos contra bacterias:

60 Los bioensayos contra bacterias se realizaron usando 1,0 ml de medio Luria Bertani (NaCl 10 g.l⁻¹, extracto de levadura 5 g.l⁻¹ y bactopectona 45 g.l⁻¹). Se usaron dos especies, concretamente *Klebsiella* sp. y *Proteus* sp., con la proteína que se ensayaba restringida a concentraciones micromolares. Las bacterias se cultivaron en el medio LB durante 16-18 horas a 37 °C antes de evaluarse con las proteínas. Se usó agua destilada como control negativo y cloranfenicol 40 µg.ml⁻¹ como control positivo. Se incubó proteína de semillas de guayaba contra las bacterias a 37
65 °C durante 4 horas. El crecimiento bacteriano se evaluó por una lectura de absorbancia a 600 nm en cada hora del

experimento. Cada experimento se realizó por triplicado.

Resultados y análisis:

5 a) Purificación y caracterización molecular de PgAMP1

Se situó una fracción de semilla de guayaba (*Psidium guajava*) precipitada con sulfato de amonio (0-100%) en una columna de afinidad de Red-Sepharose CL-6B con el fin de aislar péptidos antimicrobianos, que dieron como resultado un pico conservado (Fig. 1A). Este pico conservado mostró varias proteínas cuando se analizó por SDS-PAGE, puesto que las masas moleculares observadas variaban entre 5,0 y 80,0 kDa (datos no mostrados). Las muestras del pico conservado se sometieron después a cromatografía de fase inversa (HPLC), que reveló un pico de mayoría de acetonitrilo al 42% (Fig. 1B). Las muestras de este pico se sometieron de nuevo a cromatografía usando un gradiente de acetonitrilo 20-50% que desveló un péptido purificado en acetonitrilo al 42% (datos no mostrados). Después de la cromatografía, las muestras del pico de la HPLC se sometieron a análisis de masas moleculares por SDS-PAGE y mostraron un péptido con una masa molecular por debajo de 10 kDa (Fig. 2).

b) Secuenciación y alineamiento de aminoácidos:

La secuenciación completa de la proteína de guayaba reveló un fragmento de 55 restos de aminoácidos (Fig. 3A). Un alineamiento usando el software FASTA3 mostró que la secuencia obtenida presentaba una similitud del 72% con proteínas ricas en glicina. Se realizó una comparación de la secuencia primaria de Pg-AMP1 con otras nueve proteínas ricas en glicina aisladas de plantas usando el software BioEdit (Hall, 1999). Puede verse que a pesar de que la secuencia primaria entre proteínas ricas en glicina generalmente es muy diversa, estas muestran una región conservada en la que predominan los restos de glicina (Fig. 3B). Sin embargo, Pg-AMP1 parece pertenecer al tercer grupo de GRP, puesto que muestra un alto contenido de restos de glicina, pero no contiene ningún dominio específico, como se ve en las proteínas de *P. pattens*, *B. napus*, *S. tuberosum*, *M. sativa*, *R. obtusifolius* y *E. esula* (Hovarth y Olson, 1998; Kevei *et al.*, 2002, Vermel *et al.*, 2002). Puede percibirse además que los restos cargados positivamente hallados en el medio de la región rica en glicina parecen estar conservados en este grupo de proteínas, tales como Arg35 y Arg45 (Fig. 3B). Resulta interesante que la presencia de restos de cisteína y la formación de enlaces disulfuro no están conservadas entre las proteínas ricas en glicina (Fujimura *et al.*, 2003).

La secuenciación de Pg-AMP1 reveló un fragmento de 55 restos de aminoácidos con similitudes con las proteínas ricas en glicina (Fig. 3A). Esta es una familia amplia y variada de proteínas que tienen diferentes secuencias de aminoácidos y funciones. Su principal característica consiste en poseer más del 60% de su secuencia primaria constituida de restos de glicina pero poder clasificarse en tres grupos distintos de acuerdo con la presencia/ausencia de otros dominios conservados (Mousavi, 2005; Ringli, 2001). No obstante, se han descrito diversas proteínas ricas en glicina en la bibliografía y muestran diversas funciones en plantas. Algunos autores informan de proteínas ricas en glicina que actúan como reguladores postranscripcionales en condiciones de tensión y, en consecuencia, en la expresión de genes en diversas especies vegetales (Kim, 2005). Las proteínas ricas en glicina que actúan como moléculas de enlace de ARN también se han descrito en plantas tales como arroz (Nomata, 2004; Lee, 1997). Además, ciertas de las proteínas de este grupo aisladas de trigo se describieron recientemente como proteínas antimicrobianas que actúan contra hongos filamentosos (Egorov, 2005).

Un alineamiento de Pg-AMP1 con otras nueve proteínas ricas en glicina demostró que a pesar de que la secuencia primaria difería ampliamente en este grupo, había, no obstante, similitud en el dominio rico en glicina (Fig. 3B). También puede percibirse un patrón de conservación con ciertos restos de tirosina que sugiere que este fragmento puede ser importante para su estructura y/o función. También puede observarse un resto cargado positivamente en el medio de la región rica en glicina con conservación en las otras proteínas presentes en el alineamiento. El papel de estos restos no se ha explicado aún completamente de forma experimental, pero hay indicios de que pueden ser importantes para la estabilidad de las proteínas de esta familia.

Además, el aumento significativo de las tasas de resistencia bacteriana a antibióticos sintéticos ha hecho el tratamiento de infecciones urinarias, hospitalarias y gastrointestinales mucho más difícil. Con esta intención, se ensayó en Pg-AMP1 contra bacterias gram negativas de los géneros *Klebsiella* sp. y *Proteus* sp., siendo ambas las causas principales de infección en pacientes inmunocomprometidos en países en desarrollo. Como tal, Pg-AMP1 demostró una actividad inhibitoria del 90% y 30%, respectivamente, para estas bacterias. No obstante, Pg-AMP1 parece ser la primera proteína rica en glicina de plantas en mostrar actividad antimicrobiana contra bacterias gram negativas patológicas para seres humanos.

60 c) Bioensayos contra bacterias gram negativas

Se usó Pg-AMP1 purificada para bioensayos *in vivo* contra bacterias gram negativas. Esta proteína demostró ser perjudicial contra *Klebsiella* sp. y *Proteus* sp, demostrando una actividad inhibitoria del 90% y 30%, respectivamente, para estas bacterias, en concentraciones micromolares (Figs. 4A y 4B). Pg-AMP1 también demostró ser específica contra bacterias gram negativas puesto que los bioensayos preliminares contra bacterias gram positivas, tales como

Staphylococcus aureus, no revelaron ninguna actividad inhibidora. Hay algunos informes en la bibliografía de proteínas ricas en glicina que tienen actividad antimicrobiana. De esta manera, se observó que una proteína que se une a ARN rica en glicina aislada de *Nicotiana glutinosa* puede estar relacionada con la relación planta-patógeno puesto que la expresión de su gen aumentó cuando la planta se infectó con el virus TMV (Naqvi *et al.*, 1998). Otra proteína rica en glicina, en este caso aislada de la calabaza y llamada “curcumosquina”, mostró actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Mycosphaerella oxysporum* (Wang *et al.*, 2003). Además, ciertas proteínas ricas en glicina presentaron un dominio de unión con quitina que la hizo incapaz de inhibir el crecimiento de hongos filamentosos, tal como en el caso de dos proteínas aisladas de avena (*Avena sativa*) y *Ginkgo biloba* (Huang *et al.*, 2000, Lii y Claeson, 2003). No obstante, no hay informes de una proteína rica en glicina aislada de plantas que presente actividad contra bacterias. Por lo tanto, esta es la primera vez que una proteína rica en glicina de una planta presenta actividad antimicrobiana contra bacterias gram negativas patógenas para seres humanos.

d) Modelado molecular

El modelo final está compuesto de dos hélices α , con una en el extremo n terminal y la otra en el c terminal, con un bucle en espiral entre ellas (Figura 1). Este es el bucle que contiene la mayoría de los restos de glicina que le confieren su flexibilidad. Las extremidades de hélices α tienen restos de arginina que confieren una carga positiva en estos sitios (Figura 1). Varios restos no polares se localizan a lo largo de la estructura y actúan para proporcionar hidrofobicidad molecular (Figura 5). El análisis de la capa electrostática muestra dos regiones cargadas grandes, una de forma positiva en el extremo n terminal y otra de forma negativa la longitud del extremo c terminal (Figura 5 y 6). Estas áreas permitieron que dos AMP-PgGRP se agregaran y formaran moléculas diméricas (Figura 6). Un posible mecanismo en la acción de estos péptidos puede ser el contacto de la arginina en los extremos “N” y “C” terminales dando como resultado las cabezas fosfolipídicas de las membranas plasmáticas la ruptura de la membrana permitiendo de este modo un desequilibrio osmótico y, en consecuencia, la aparición de lisis celular (Shai *et al.*, 2001). Otro mecanismo podría ser la aglomeración de diversos péptidos a través de fuerzas hidrófobas que formarían una alfombra que estira las membranas bacterianas impidiendo de este modo su flexibilidad necesaria y destruyendo su estructura (Shai *et al.*, 2001). Pueden tener lugar pronto experimentos con resonancia magnética nuclear y dinámica molecular para proporcionar un mejor entendimiento del método de acción.

La presente invención, concretamente una nueva proteína capaz de inhibir el crecimiento de bacterias gram negativas puede, en el futuro cercano, proporcionar nueva información con respecto a los mecanismos de acción de este grupo de proteínas. Además, las proteínas antibacterianas de semillas de la planta de guayaba pueden proporcionar las nuevas herramientas para el control de patógenos, a través de ingeniería genética, especialmente en el caso de plantas y animales.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> União Brasileira de Educação e Cultura - UBEC
- 40 Associação civil confessional mantenedora da Universidade Católica de Brasília - UCB
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA
- <120> Péptido antibiótico derivado de plantas rico en glicina
- 45 <130> P1324
- <150> PI 0605658-0
- <151> 29-12-2006
- 50 <160> 1
- <210> 1
- <211> 55
- 55 <212> Aminoácido lineal
- <213> Péptido
- <220>
- <223> Secuencia peptídica extraída de semillas de guayaba (*Psidium guajava*)
- 60 <400> 1

RESPSSRMEC YEQAERYGYG GYGGGRYGGG YGSGRGQPVG QGVERSHDDN RNQPR

REIVINDICACIONES

1. Un péptido antibiótico rico en glicina con actividad antimicrobiana que comprende la secuencia de aminoácidos idéntica expuesta a continuación:

5

RESPSSRMECYEQAERYGYGGYGGGRYGGGYGSGRGPVGGQGVESHDDNRNQPR.

2. Péptido antibiótico de la reivindicación 1, en el que la cadena peptídica de longitud completa o partes de la misma comprende los aminoácidos α -D- y/o α -L.

10

3. Composición para inhibir el desarrollo de una célula *Proteus* sp. o una célula *Klebsiella* sp., que comprende:

- (a) al menos un péptido antibiótico de acuerdo con la reivindicación 1,
- (b) opcionalmente uno o más péptidos antibióticos que tienen actividad antimicrobiana; y
- (c) un excipiente farmacéutico adecuado.

15

4. La composición de la reivindicación 3, en la que dicha composición es adecuada para usos humanos, veterinarios o farmacéuticos.

20 5. Composición para detener fitopatógenos y para proteger plantas contra patógenos, que comprende:

- (a) al menos un péptido antibiótico de acuerdo con la reivindicación 1, y
- (b) un vehículo agrícola aceptable.

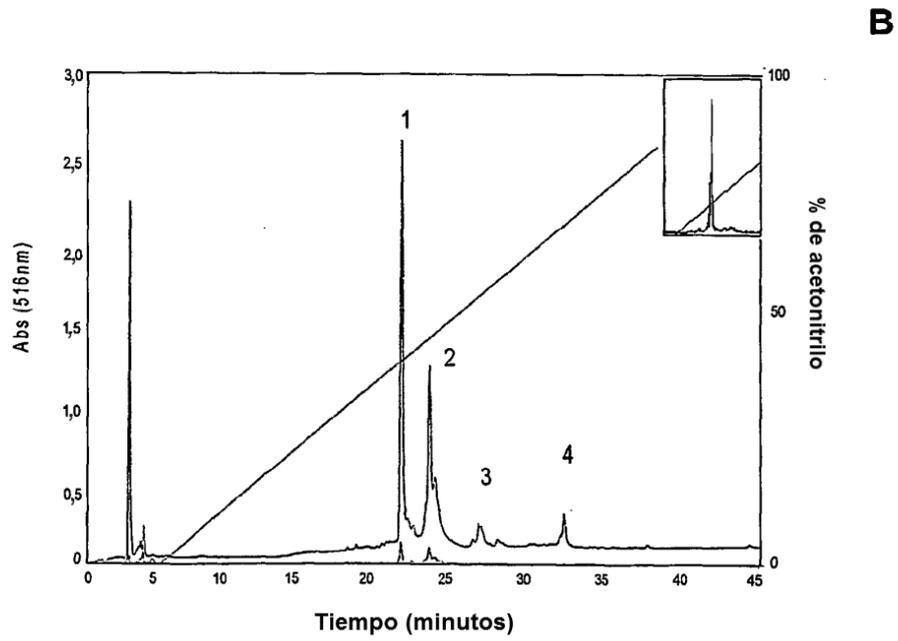
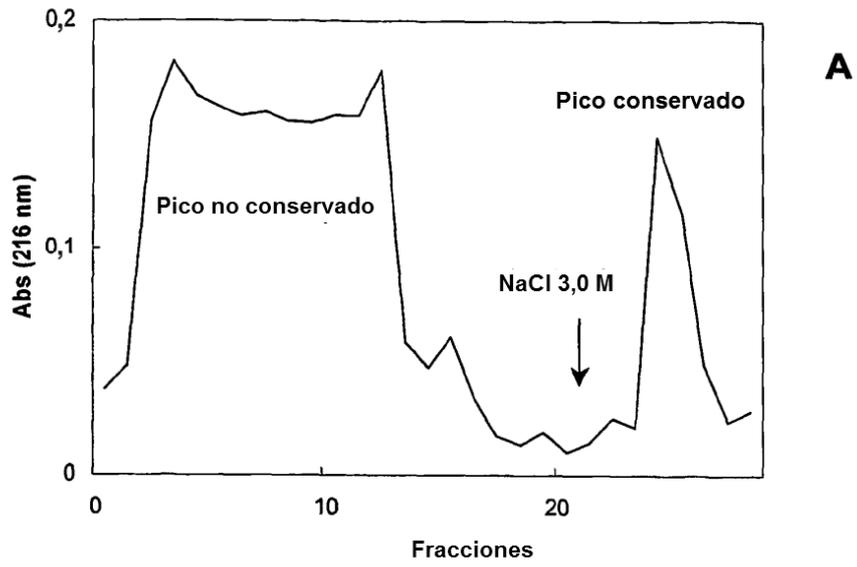


Figura 1

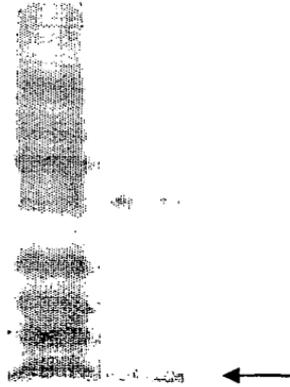


Figura 2

N- RESPSRRMECYEQAERYGYGGYGGGRYGGGYGSGRGQPVGQGVERSHDDNRNQR- C

A

B

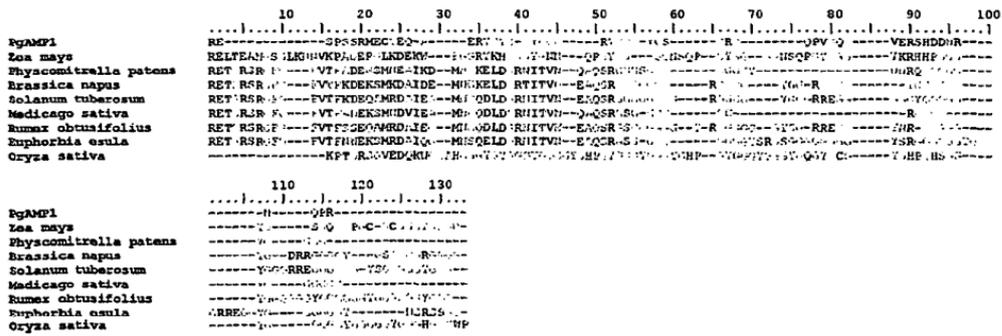


Figura 3

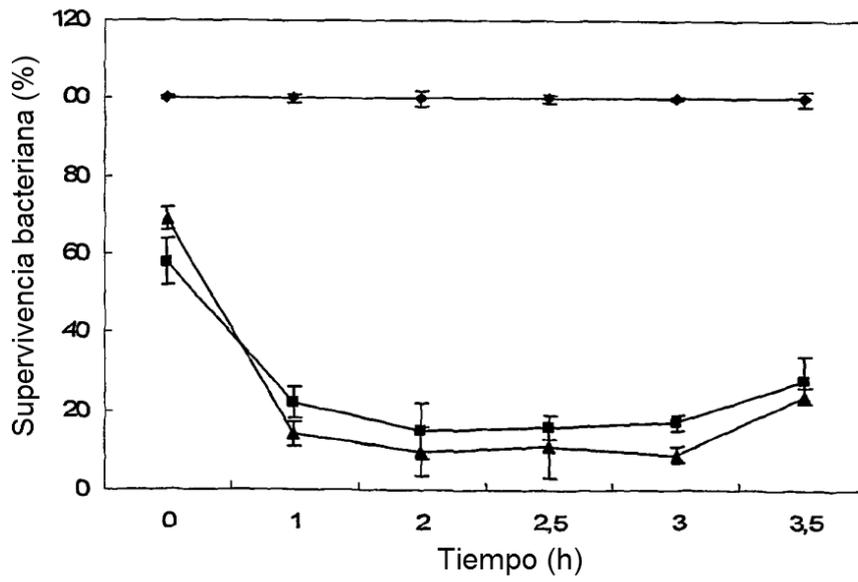
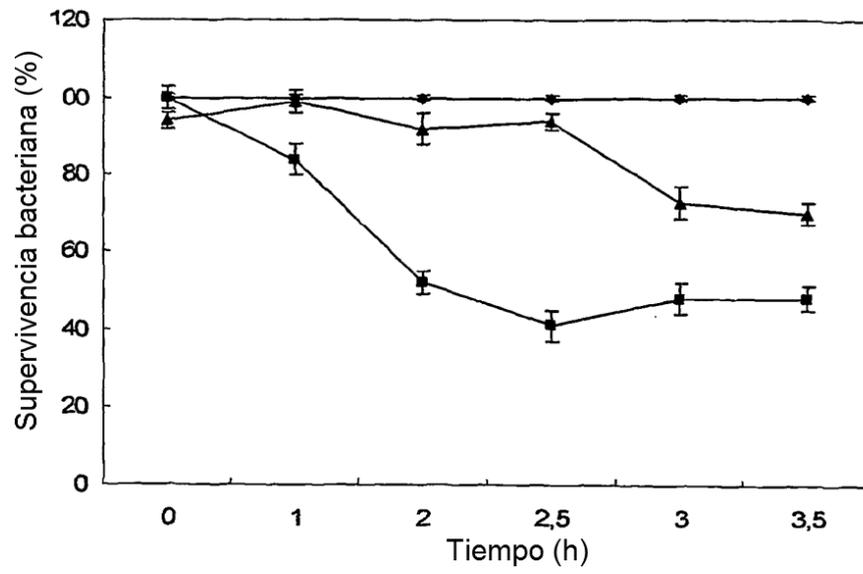


Figura 4

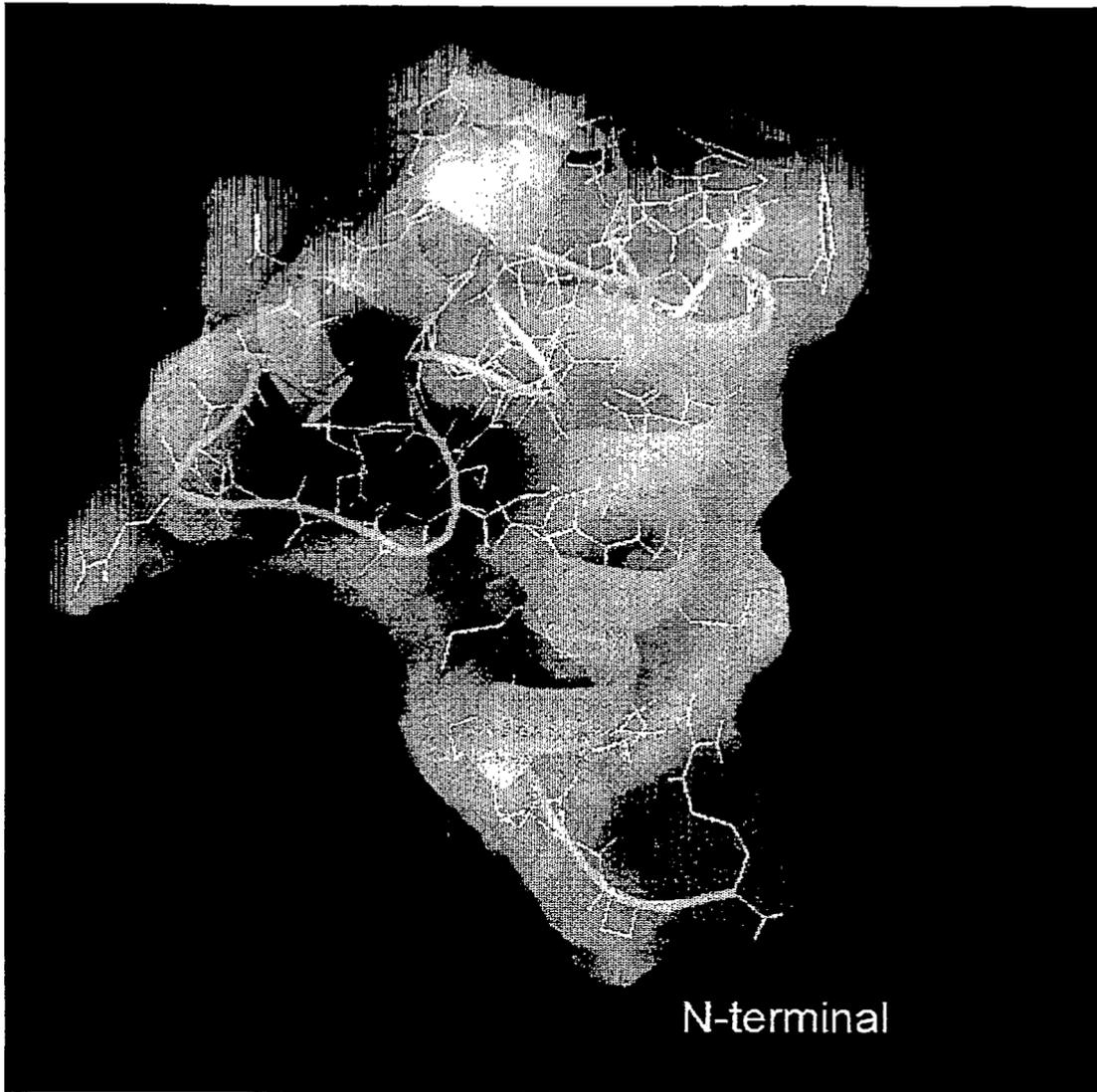


Figura 5

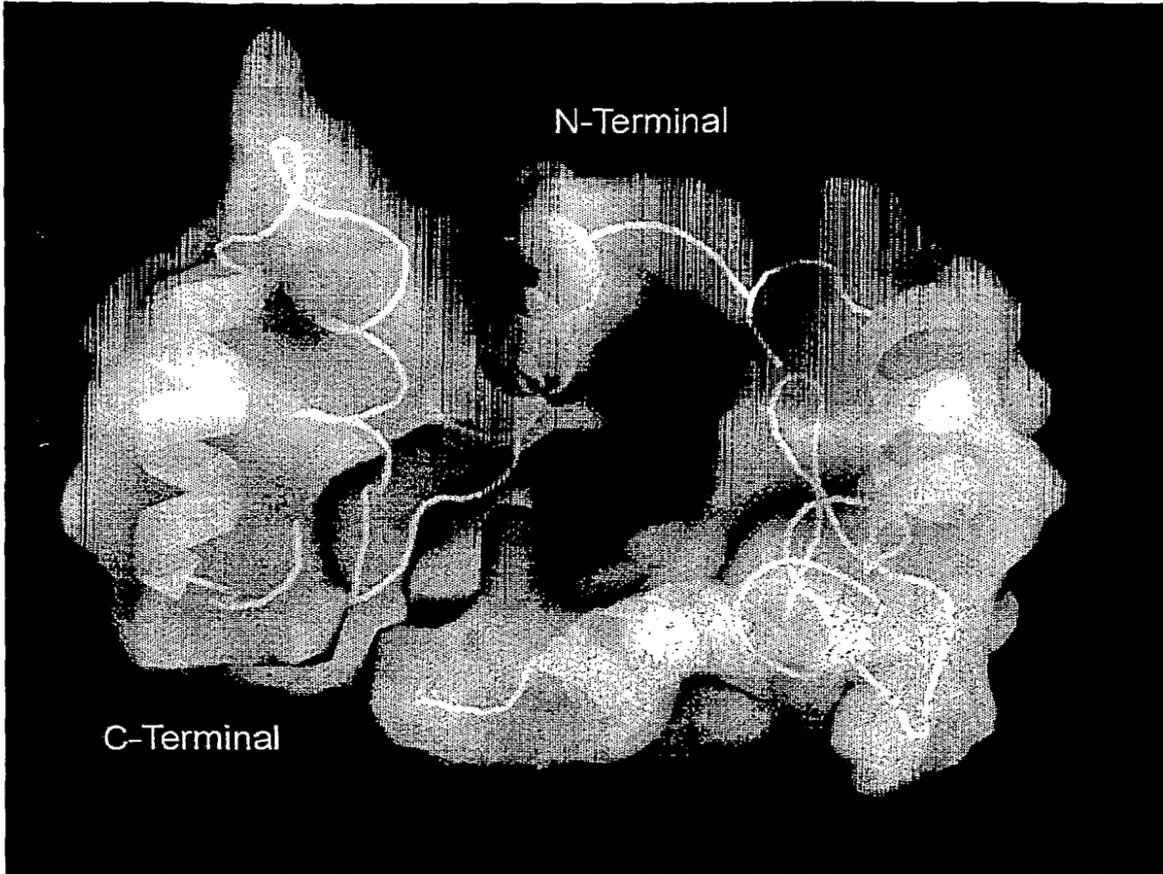


Figura 6

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden 5 excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- JP 2004250406 B [0010]
- CN 1699409 [0011]
- CN 1699416 [0011]
- EP 1693381 A [0011] [0013]
- BR PI06056580 [0039]

10