

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 590**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)  
**A61K 38/04** (2006.01)  
**A61K 38/10** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)  
**C07K 7/08** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**C07K 5/08** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)  
**C07K 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2007 E 07748141 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014 EP 2021364**

54 Título: **Péptidos antimicrobianos mejorados**

30 Prioridad:

**16.05.2006 SE 0601088**  
**16.05.2006 US 800644 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.07.2014**

73 Titular/es:

**PERGAMUM AB (100.0%)**  
**Karolinska Institutet Science Park (KISP),**  
**Fogdevreten 2**  
**171 65 Solna, SE**

72 Inventor/es:

**SCHMIDTCHEN, ARTUR y**  
**MALMSTEN, MARTIN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 476 590 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

Péptidos antimicrobianos mejorados

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a un péptido antimicrobiano con actividad antimicrobiana incrementada que comprende a una primera secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NOs 10 y 12, y un segundo conjunto de residuos de aminoácidos que consiste en de 3 a 8 residuos de aminoácido hidrofóbicos seleccionados del grupo que consiste en V, L, I, F, Y y W, y donde dicho segundo conjunto de residuos de aminoácidos está unido al extremo aminoterminal o carboxiterminal de dicho primer conjunto de residuos de aminoácidos, obteniéndose de este modo dicho péptido antimicrobiano con actividad antimicrobiana incrementada en comparación con el primer conjunto de  
10 residuos por sí solo.

**Antecedentes de la invención**

Varias infecciones son combatidas con éxito por el sistema inmune de un mamífero tal como un ser humano. Sin embargo, en algunos casos, las bacterias, los hongos o los virus no son siempre eliminados, lo que puede provocar infecciones agudas localizadas o generalizadas. Esto supone una serie preocupación en las unidades perinatales, de descanso o de cuidados intensivos, y en individuos inmunocomprometidos. Las infecciones agudas localizadas dan lugar a una mortalidad extensiva. Por ejemplo, la *Pseudomonas aeruginosa* es una causa principal de queratitis bacteriana severa y la infección es difícil de tratar con éxito con los agentes antimicrobianos actuales. En otros casos, una persistencia bacteriana continua en las superficies epiteliales puede provocar o agravar una enfermedad crónica. En humanos, los ejemplos de esto son úlceras cutáneas crónicas, dermatitis atópica y otros tipos de eczema, acné o infecciones genitourinarias. Por ejemplo, ahora se dispone de evidencias considerables de que la colonización o la infección con la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* es un factor de activación o de exacerbación en la dermatitis atópica. Aproximadamente el 90 % de todas los pacientes de dermatitis atópica están colonizados o infectados con *S. aureus* mientras que solo el 5 % de los individuos sanos albergan dicha bacteria. Las úlceras crónicas están colonizadas o infectadas por bacterias diversas, tal como *P. aeruginosa* y *S. aureus*, lo que conduce a un retraso en la curación de dichas úlceras.  
15  
20  
25

Las infecciones sintomáticas pueden ser tratadas con diversos medicamentos. Algunas enfermedades también pueden combatirse, por ejemplo, con vacunas. Sin embargo, las vacunas no son siempre la mejor opción de tratamiento y para determinados microorganismos no se dispone de vacuna. Cuando no se dispone de protección, se afronta el tratamiento de la enfermedad. A menudo el tratamiento se lleva a cabo mediante el uso de un agente antibiótico, que mata a los microbios. Sin embargo, durante los últimos años varios microbios se han vuelto resistentes a los agentes antibióticos. Con toda probabilidad, los problemas de resistencia se agravarán en el futuro próximo. Adicionalmente, varios individuos han desarrollado alergia contra el agente antibiótico, reduciendo con ello la posibilidad de usar de forma efectiva determinados agentes antibióticos.  
30

Las superficies epiteliales de varios organismos están continuamente expuestas a bacterias. Durante los últimos años se han atribuido funciones importantes al sistema inmune innato, basado en péptidos antibacterianos, para la eliminación inicial de bacterias en las fronteras biológicas 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). De forma general, se cree que los péptidos antimicrobianos matan bacterias permeando a través de sus membranas, y por tanto la falta de diana microbiana molecular específica minimiza el desarrollo de resistencia.  
35

40 En la técnica se conocen varios péptidos y proteínas antimicrobianos descritos, no relacionados con la presente invención.

La patente US 6.503.881 describe péptidos catiónicos que son un análogo de la indolicidina para su uso como péptido antimicrobiano. Los péptidos catiónicos se derivan de varias especies, que incluyen animales y vegetales.

45 La patente US 5.912.230 describe péptidos antifúngicos y antibacterianos basados en histatina. Los péptidos se basan en porciones definidas de las secuencias de aminoácidos de las histatinas humanas naturales y en métodos para el tratamiento de infecciones fúngicas y bacterianas.

La patente US 5.717.064 describe péptidos líticos ricos en lisina metilada. Los péptidos líticos son resistentes a digestión triptica y no son naturales. Los péptidos líticos son adecuados para administración *in vivo*.

50 La patente US 5.646.014 describe un péptido antimicrobiano. El péptido se aisló de una fracción antimicrobiana de hemolinfa de gusano de seda. El péptido presenta una excelente actividad antimicrobiana frente a varias cepas bacterianas, tal como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

La patente WO 2004016653 describe un péptido basado en la secuencia 20-44 de azurocidina. Este péptido contiene una estructura de lazo ligada por puentes de disulfuro.

La patente US 6495516 y patentes relacionadas describen péptidos basados en la proteína bactericida de 55 kDa denominada proteína bactericida/de incremento de permeabilidad (BPI, del inglés "bactericidal/permeability increasing protein"). Los péptidos ejercían efectos antimicrobianos y presentaban capacidad neutralizante de LPS.

5 La patente WO 01/81578 describe numerosas secuencias que codifican polipéptidos relacionados con receptor-proteína acoplada-G, que pueden usarse para numerosas enfermedades.

Nordahl et al., J. Biol. Chem. 280: 24832-34839 describen una nueva actividad antimicrobiana del dominio 5 de quinínogeno de unión a heparina y de unión a célula.

La patente WO 00/01427 describe material óseo para la prevención y el tratamiento de la osteomielitis, material que se proporciona como péptidos antimicrobianos.

10 Actualmente, se conocen más de 700 secuencias de péptidos antimicrobianos diferentes ([www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/search.htm](http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/search.htm)), que incluyen cecropinas, defensinas, magaininas y catelicidinas.

Incluso aunque existe un número relativamente grande de péptidos antimicrobianos disponibles hoy día, todavía sigue existiendo una necesidad creciente de nuevos péptidos antimicrobianos mejorados, que puedan usarse para combatir microbios, microbios que sean resistentes o tolerantes a agentes antibióticos y/u otros agentes antimicrobianos. De forma más importante, existe una necesidad de nuevos péptidos antimicrobianos, que no sean alérgicos cuando se introducen en mamíferos, tal como seres humanos.

Debido al potencial lítico y a otras propiedades de los péptidos antimicrobianos (AMPs) contra bacterias y membranas de mamífero, uno de los retos a la hora de diseñar nuevos péptidos recae en el desarrollo de AMPs con una elevada especificidad contra microorganismos tales como células bacterianas o fúngicas, es decir, un índice terapéutico elevado (concentración hemolítica mínima/actividad antimicrobiana mínima; MHC/MEC).

Varias bacterias, tal como *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes* y *S. aureus* secretan todas proteasas que degradan varios péptidos antimicrobianos, tal como la catelicidina LL-37. Por tanto, los péptidos antimicrobianos resistentes a proteasa presentan ventajas de un punto de vista terapéutico. Adicionalmente, muchos de los péptidos antimicrobianos no son muy eficientes con microorganismos tales como bacterias, p.ej., *S. aureus* y *P. aeruginosa*, que frecuentemente desempeñan funciones clave en patogénesis problemáticas, y necesitan ser optimizados para mostrar un efecto incrementado.

### Sumario de la invención

La invención se refiere a nuevos péptidos antimicrobianos mejorados que presentan una actividad antimicrobiana incrementada en comparación con el péptido correspondiente. Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que existe un número específico de aminoácidos requeridos para aumentar la actividad antimicrobiana, es decir, si hay menos de 3 o más de 8 residuos de aminoácido, la actividad antimicrobiana disminuye. La estrategia es particularmente adecuada para péptidos hidrofílicos, con elevada carga positiva, ya que éstos son altamente disruptivos de membrana. Podría ser que modificando el péptido con uno o varios aminoácidos hidrofóbicos, su capacidad de unión a la(s) membrana(s) lipídica(s) de bacterias se viera potenciada, y la mayor unión de péptido resultante da como resultado un incremento de la formación de defectos de la membrana del microorganismo, y una mayor mortalidad del microorganismo. Sin embargo, esto solo es una teoría y el modo de acción puede ser diferente o ser una combinación de diferentes modos de acción.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un péptido antimicrobiano con actividad antimicrobiana incrementada que comprende una primera secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NOs 10 y 12, y un segundo conjunto de residuos de aminoácido que consiste en de 3 a 8 residuos de aminoácido hidrofóbicos seleccionados del grupo que consiste en V, L, I, F, Y y W, y donde dicho segundo conjunto de residuos de aminoácido está ligado al extremo aminoterminal o carboxiterminal de dicho primer conjunto de residuos de aminoácido, obteniéndose de este modo dicho péptido antimicrobiano con actividad antimicrobiana incrementada en comparación con el primer conjunto de residuos por sí solo.

45 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición antimicrobiana/farmacéutica que comprende el péptido antimicrobiano y un tampón, diluyente, vehículo, adyuvante o excipiente aceptable.

En un aspecto adicional, la invención también se refiere a un producto que comprende dicho péptido antimicrobiano, siendo seleccionado dicho péptido del grupo que consiste en vendas, yesos, suturas, jabón, tampones, pañales, champús, pasta de dientes, compuestos anti-acné, cremas solares, textiles, recubrimiento de catéteres y agujas, lentes de contacto, adhesivos, incorporados en vendas para heridas, disolución de lavado o implantes.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso del péptido antimicrobiano o a la composición antimicrobiana/farmacéutica o al producto en terapia o diagnóstico.

En un aspecto final, la invención se refiere al uso del péptido antimicrobiano, a la composición antimicrobiana/farmacéutica o a un producto que comprende dicho péptido antimicrobiano para la fabricación de un

medicamento para el tratamiento de una enfermedad o infección antimicrobiana, provocada por un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en bacterias, virus, parásitos, hongos y levadura.

5 Proporcionando dichos péptidos antimicrobianos, los riesgos de reacciones alérgicas frente a péptidos antimicrobianos pueden reducirse debido al hecho de que los péptidos se pueden derivar de la secuencia de polipéptidos de proteínas y/o péptidos endógenos o que tengan una composición de residuos de aminoácidos similar. Usando péptidos cortos, la estabilidad del péptido aumenta y los costes de producción se reducen, en comparación con péptidos y proteínas de mayor tamaño, por lo que la invención puede ser ventajosa desde el punto de vista económico.

10 Los péptidos de la invención proporcionan composiciones, que facilitan una prevención, reducción o eliminación eficiente de microorganismos. Con ello, se puede incrementar la posibilidad de combatir microorganismos que sean resistentes o tolerantes a agentes antibióticos. Además, se puede tratar a mamíferos que sean alérgicos frente a los agentes antimicrobianos disponibles comercialmente. Proporcionando composiciones antimicrobianas/farmacéuticas, que se derivan de proteínas endógenas mejoradas, se puede reducir o incluso eliminar la probabilidad de que un mamífero desarrolle alergia frente a dichos péptidos en particular. Esto hace que las  
15 composiciones antimicrobianas/farmacéuticas sean útiles para varias aplicaciones en las que las composiciones antimicrobianas/farmacéuticas entran en contacto con un mamífero, como un medicamento o como un aditivo para prevenir infecciones.

20 Adicionalmente, el uso de péptidos cortos puede mejorar la biodisponibilidad. Además, el uso de péptidos estructuralmente distintos con acciones específicas o preferibles sobre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, o sobre hongos, permite el ataque específico a varios microorganismos, minimizando de este modo el desarrollo de resistencia y problemas ecológicos. Usando péptidos de suplemento, que son comparables a los péptidos ya existentes en el mamífero, el riesgo de presión ecológica adicional por nuevos antibióticos se reduce aún más. Finalmente, estas formulaciones también pueden potenciar el efecto de péptidos antimicrobianos endógenos, o de sus análogos.

25 Los péptidos antimicrobianos de la invención incrementan la lista de agentes antimicrobianos, lo que ayuda en la elección para prevenir, reducir o eliminar microorganismos en todos los tipos de aplicaciones que incluyen, aunque sin limitación, las que invaden o infectan mamíferos, tal como seres humanos.

### **Descripción detallada de la invención**

#### *Definiciones*

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

El término "secuencia de nucleótidos" pretende indicar una secuencia de dos o más nucleótidos. Los nucleótidos pueden ser ADN genómico, ADNc, ARN, de origen semisintético o sintético o una mezcla de los mismos. El término incluye las formas de cadena sencilla y de cadena doble de ADN o ARN.

35 El término "composición antimicrobiana" pretende indicar cualquier composición que contenga los péptidos inventados según la invención, tal como composiciones antimicrobianas o farmacéuticas útiles para combatir microorganismos, que atacan mamíferos, así como composiciones que comprenden uno o más agentes antimicrobianos adicionales tales como antibióticos y otros agentes.

El término "sustituido" pretende indicar que un residuo de aminoácido es reemplazado por otro residuo de aminoácido.

40 El término "análogos del mismo" pretende indicar que dicha parte del péptido, o el péptido entero, se basa en residuos de aminoácido no proteínicos (sintéticos o semisintéticos), tal como ácido aminoisobutírico (Aib), ácido gamma-aminobutírico (Abu) de norvalina u onitina. Ejemplos de otros residuos de aminoácido no proteínicos se pueden encontrar en <http://www.hort.purdue.edu/rhodcv/hort640c/polyam/po00008.htm>.

45 El término "eliminado" pretende indicar que al menos un residuo de aminoácido ha sido eliminado, es decir, liberado del polipéptido sin ser reemplazado por otro residuo de aminoácido.

El término "homología" pretende indicar la homología global del polipéptido, que no debe confundirse con la palabra "similitudes" que significa que residuos de aminoácido específicos pertenecen al mismo grupo (es decir, hidrofóbicos, hidrofílicos), o "identidad", que significa que los residuos de aminoácido son idénticos.

El término "unido" pretende indicar "unido" mediante enlaces covalentes o químicos.

50 El término "péptido antimicrobiano" pretende indicar un péptido que previene, inhibe, reduce o destruye un microorganismo. La actividad antimicrobiana se puede determinar mediante cualquier método, tal como el método del EJEMPLO 1.

El término “anfipático” pretende indicar la distribución de residuos de aminoácido hidrofílicos e hidrofóbicos junto a las caras opuestas de una estructura de hélice  $\alpha$ , de cadena  $\beta$ , lineal, circular, o de otra conformación secundaria, así como junto a la estructura primaria del péptido, que da como resultado que uno o varios dominios de la molécula sean predominantemente cargados e hidrofílicos y otros sean predominantemente hidrofóbicos.

- 5 El término “catiónico” pretende indicar una molécula que tenga una carga neta positiva en el rango de pH de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 12, tal como en el rango entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10.

El término “microorganismo” pretende indicar cualquier organismo vivo. Los ejemplos de microorganismos son bacterias, hongos, virus, parásitos y levaduras.

- 10 El término “agente antimicrobiano” pretende indicar cualquier agente que prevenga, inhiba o destruya la vida de microbios.

Los ejemplos de agentes antimicrobianos se pueden encontrar en “The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy” (32ª edición, Antimicrobial Therapy, Inc, EE.UU.).

- 15 En el presente contexto, los nombres de aminoácidos y los nombres de átomos se usan como se define en el Protein DataBank (PDB) ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)), que se basan 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” pretende indicar 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 sus derivados.
- 20

Descripción

#### *Péptido antimicrobiano*

- 25 En la presente memoria se describe un péptido antimicrobiano que comprende un primer conjunto de residuos de aminoácido que tiene una longitud de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 36 residuos de aminoácido o análogos de los mismos unidos a un segundo conjunto que comprende al menos un residuo de aminoácido hidrofóbico o un análogo del mismo, donde dicho péptido obtiene una actividad antimicrobiana o una actividad antimicrobiana incrementada. Ligando un segundo conjunto de residuos de aminoácido, donde los residuos de aminoácido son hidrofóbicos, la actividad antimicrobiana del péptido se ve mejorada/incrementada o se obtiene. Mediante el uso de una combinación de un primer y un segundo conjuntos de residuos de aminoácido, en los que el segundo conjunto comprende residuos de aminoácido hidrofóbicos, es posible incluso hacer que un primer conjunto de residuos de aminoácido inactivo se vuelva activo contra microorganismos. El primer conjunto de residuos de aminoácido solamente presenta afinidad por el microorganismo o puede poseer actividad antimicrobiana.
- 30

- 35 En el péptido antimicrobiano de la invención, el segundo conjunto de residuos de aminoácido hidrofóbicos consta de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 residuos de aminoácido y los residuos de aminoácido hidrofóbicos se seleccionan del grupo que consiste en V, L, I, F, Y y W. El segundo conjunto de residuos de aminoácido hidrofóbicos puede comprender uno y los mismos residuos de aminoácido hidrofóbicos, tal como un conjunto de W o F o ser una mezcla de diferentes residuos de aminoácido hidrofóbicos, así como residuos de aminoácido D o residuos de aminoácido sintéticos, siempre que sean hidrofóbicos. El segundo conjunto de residuos de aminoácido puede estar ligado al primer conjunto de residuos de aminoácido en el extremo C-terminal o N-terminal o en ambos extremos de dicho primer conjunto de residuos de aminoácido. Los ejemplos de los segundos conjuntos de tres a ocho residuos de aminoácido son F<sub>(3-8)</sub>, W<sub>(3-8)</sub>, I<sub>(3-8)</sub>, Y<sub>(3-8)</sub>, V<sub>(3-8)</sub> y mezclas de dichos residuos de aminoácido o análogos de los mismos. F<sub>(3-8)</sub> pretende indicar que hay presentes entre 3 y 8 F en el segundo conjunto de residuos de aminoácido hidrofóbicos, es decir, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 residuos de aminoácido que son uno y el mismo o una mezcla de los mismos, así como sus análogos. Los ejemplos de mezclas de residuos de aminoácido son FWY, WWYYII, WYIV, YVVVFF, etc., es decir, el aspecto más importante es que el extremo sea un extremo hidrofóbico y que esté ligado a la otra parte y, por tanto, que le permita una actividad antimicrobiana incrementada. También se ha descubierto de forma sorprendente que hay un número específico de aminoácidos requerido para aumentar la actividad antimicrobiana, es decir, si hay menos de 3 o más de 8 residuos de aminoácido la actividad antimicrobiana disminuye. El primer conjunto puede ser una estructura lineal con residuos de aminoácido, tal como aminoácidos catiónicos u otros residuos de aminoácido que den lugar a una estructura lineal. El primer conjunto de residuos de aminoácido puede tener en total una carga neta positiva.
- 40
- 45
- 50

- 55 El primer conjunto de residuos de aminoácido puede obtenerse de cualquier fuente siempre que el primer conjunto de residuos de aminoácido muestre unión a microorganismos y presente actividad antimicrobiana, o puede ser antimicrobiano cuando se combine con el segundo conjunto de residuos de aminoácido. El primer conjunto de residuos de aminoácido puede ser sintético y semisintético, así como nativo. Los ejemplos de proteínas a partir de las cuales se puede derivar el primer conjunto de residuos de aminoácido son proteínas quinínogenas, proteínas de factor de crecimiento, glicoproteína rica en histidina, proteínas de factor de coagulación tal como trombina, factor IX

y X, factor complemento C3a, factor von Willebrand, vitronectina, inhibidor de proteína C, fibronectina, quemocinas, laminina, superóxido dismutasa, proteínas de prión o PRELP (proteína de repetición rica en leucina y rica en prolina arginina). Otro ejemplo es el primer conjunto de residuos de aminoácido derivado de la SEQ ID NO 1 o las secuencias presentadas en la tabla, así como las SEQ ID NO 2-12. El tamaño del primer conjunto de residuos de aminoácido puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ó 36 residuos de aminoácido o análogos de los mismos. En el péptido antimicrobiano de la invención, el primer conjunto de residuos de aminoácido se selecciona de las SEQ ID NOs 10 y 12.

Adicionalmente, el péptido puede estar sustituido en uno o más residuos de aminoácido, tal como entre 2 y 21 residuos de aminoácido. Por ejemplo, se puede eliminar y/o sustituir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 residuos de aminoácidos.

Los péptidos antimicrobianos pueden extenderse en uno o más residuos de aminoácido, tal como 1-100 residuos de aminoácido, 5-50 residuos de aminoácido ó 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 residuos de aminoácido. Dichos aminoácidos adicionales pueden duplicar una secuencia contigua a la secuencia del péptido antimicrobiano derivado de una proteína no antimicrobiana. El número a añadir depende de qué microorganismo se vaya a combatir e incluye la estabilidad del péptido, la toxicidad, el mamífero a tratar o en qué producto debería estar el péptido y en qué estructura de péptido se basa el péptido antimicrobiano. El número de residuos de aminoácido a añadir a los péptidos depende también de la elección de producción, p.ej., vector de expresión y hospedantes de expresión y la elección de fabricación para la composición antimicrobiana/farmacéutica. La extensión puede ser en la parte N-terminal o en la C-terminal o en ambas partes de los péptidos antimicrobianos, siempre que no se altere el efecto antimicrobiano del péptido. Los péptidos antimicrobianos también pueden ser una proteína de fusión, donde el péptido antimicrobiano está fusionado a otro péptido.

Adicionalmente, los péptidos antimicrobianos pueden ligarse operativamente a otros péptidos antimicrobianos conocidos o a otras sustancias, tal como péptidos, lípidos, proteínas, oligosacáridos, polisacáridos, otros compuestos orgánicos o sustancias inorgánicas. Por ejemplo, los péptidos antimicrobianos se pueden acoplar a una sustancia que proteja los péptidos antimicrobianos de ser degradados en el interior de un mamífero antes de que los péptidos antimicrobianos hayan inhibido, prevenido o destruido la vida del microorganismo.

Por consiguiente, los péptidos antimicrobianos pueden modificarse en la parte C-terminal mediante amidación o esterificación y en la parte N-terminal mediante acilación, acetilación, PEGilación, alquilación y similares.

Los ejemplos de microorganismos que son inhibidos, prevenidos o destruidos por el péptido antimicrobiano son bacterias, tanto bacterias Gram-positivas como bacterias Gram-negativas, tal como *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Finogoldia magna*, *Helicobacter pylori*, virus, parásitos, hongos y levaduras, tal como *Candida albicans* y *Candida parapsilosi*, así como la especie *Malassezia*. Otros microorganismos de interés incluyen, aunque sin limitación, *Citrobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Morganella*, *Providencia*, *Listeria sp.*, *Salmonella sp.*, *Serratia sp.*, *Shigella sp.*, *Yersinia sp.*, *Pasteurella sp.*, *Vibrio sp.*, *Campylobacter sp.*, *Haemophilus sp.*, *Bordetella sp.*, *Brucella sp.*, *Neisseria sp.*, *Legionella sp.*, *Mycoplasma sp.* y *Chlamydia sp.* Otros ejemplos son virus, tal como los virus de Herpes simple, Varicela zóster y Gripe. Los ejemplos de parásitos son endo- y ectoparásitos, incluyendo las formas plasmodium.

Los péptidos antimicrobianos pueden obtenerse a partir de una fuente natural, tal como una célula humana, un ADNc, un clon genómico, se pueden sintetizar químicamente o se pueden obtener mediante técnicas de ADN recombinante como productos de expresión a partir de fuentes celulares.

Los péptidos antimicrobianos se pueden sintetizar mediante métodos químicos estándares, que incluyen la síntesis mediante un procedimiento automatizado. En general, los análogos de péptidos se sintetizan en base a la estrategia de protección Fmoc en fase sólida estándar con HATU (N-ÓXIDO DE N-[DIMETILAMINO-1H-1.2.3.-TRIAZOLO[4,5-B]PIRIDIN-1-ILMETILEN]-N-METILMETANAMINIO HEXAFLUOROFOSFATO) como agente de acoplamiento u otros agentes de acoplamiento tales como HOAt-1-HIDROXI-7-AZABENZOTRIAZOL. El péptido es separado de la resina de fase sólida con ácido trifluoroacético que contiene los captadores apropiados, lo que también desprotege los grupos funcionales de cadenas laterales. El péptido no purificado se purifica adicionalmente usando cromatografía preparativa de fase inversa. Se pueden usar otros métodos de purificación, tal como cromatografía de partición, filtración en gel, electroforesis en gel o cromatografía de intercambio iónico. Para producir péptidos equivalentes se pueden emplear otras técnicas de síntesis, conocidas en la técnica, tal como la estrategia de protección con tBOC, o el uso de diferentes reactivos de acoplamiento, o similares.

Alternativamente, los péptidos pueden sintetizarse mediante producción recombinante (véase, p.ej., la Patente de EE.UU. Nº 5.593.866). Para la producción de los análogos de péptidos son adecuados una variedad de sistemas hospedantes, que incluyen bacterias, tal como *E. coli*, levaduras, tal como *Saccharomyces cerevisiae* o *pichia*, insectos, tal como Sf9, y células de mamífero, tal como CHO ó COS-7. Se dispone de muchos vectores de expresión para su uso con cada uno de los hospedantes y la invención no se limita a ninguno de ellos, siempre que el vector y el hospedante sean capaces de producir el péptido antimicrobiano. Los vectores y los procedimientos para clonación

y expresión en *E. coli* se pueden encontrar, por ejemplo, en Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1987) y en Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Co., 1995).

5 Finalmente, los péptidos pueden purificarse a partir de plasma, sangre, tejidos diversos o similares. Los péptidos pueden ser endógenos o se pueden generar tras digestión enzimática o química de la proteína purificada. Por ejemplo, se puede digerir una proteína con tripsina y los péptidos antibacterianos resultantes se pueden aislar adicionalmente a una escala mayor.

10 Se introduce una secuencia de ADN que codifica el péptido antimicrobiano en un vector de expresión adecuado que sea apropiado para el hospedante. En las realizaciones preferidas, el gen se clona en un vector para crear una proteína de fusión. Para facilitar el aislamiento de la secuencia de péptido, se usan aminoácidos susceptibles a ruptura química (p.ej., CNBr) o ruptura enzimática (p.ej., proteasa V8, tripsina) como puente entre el péptido y la pareja de fusión. Para la expresión en *E. coli*, la pareja de fusión preferiblemente es una proteína intracelular normal que dirige la expresión hacia la formación de cuerpos de inclusión. En dicho caso, tras la ruptura para liberar el producto final, no existe el requisito de renaturalización del péptido. En la presente invención, la casete de ADN, que comprende la pareja de fusión y el gen de péptido, se puede insertar en un vector de expresión. Preferiblemente, el vector de expresión es un plásmido que contiene un promotor inducible o constitutivo para facilitar la transcripción eficiente de la secuencia de ADN insertada en el hospedante.

20 El vector de expresión se puede introducir en el hospedante mediante técnicas convencionales de transformación tales como a través de técnicas mediadas por calcio, electroporación u otros métodos bien conocidos por los especialistas en la técnica. La secuencia que codifica el péptido antimicrobiano puede derivarse de una fuente natural tal como una célula de mamífero, un ADNc existente o un clon genómico o se puede sintetizar. Un método, que puede usarse, es la amplificación del péptido antimicrobiano mediante la ayuda de PCR usando cebadores de amplificación que se derivan de los extremos 5' y 3' de la plantilla de ADN antimicrobiana y que típicamente incorporan sitios de restricción elegidos con respecto al sitio de clonación del vector. Si es necesario, se pueden diseñar codones de inicio y terminación traduccional en las secuencias de cebador. La secuencia que codifica el péptido antimicrobiano puede optimizarse respecto a codón para facilitar la expresión en el hospedante particular, siempre que la elección de los codones se haga considerando el mamífero final que va a ser tratado. Así, por ejemplo, si el péptido antimicrobiano se expresa en bacterias, los codones se optimizan para bacterias.

30 El vector de expresión puede contener una secuencia promotora, para facilitar la expresión del péptido antimicrobiano introducido. Si es necesario, también se pueden incluir secuencias reguladoras, tal como uno o más potenciadores, sitio de unión a ribosoma, secuencia señal de terminación de la transcripción, secuencia señal de secreción, origen de replicación, marcador seleccionable, y similares. Las secuencias reguladoras están ligadas operativamente unas a otras para permitir la transcripción y la posterior traducción. Si el péptido antimicrobiano va a expresarse en bacterias, las secuencias reguladoras son aquellas diseñadas para ser usadas dentro de bacterias, y como tal son conocidas por el especialista en la técnica. Los promotores adecuados, tal como promotores constitutivos e inducibles, se encuentran disponibles ampliamente e incluyen promotores de fagos T5, T7, T3, SP6, y los operones *trp*, *lpp* y *lac*.

40 Si el vector que contiene el péptido antimicrobiano va a ser expresado dentro de bacterias los ejemplos de origen son aquellos que dan lugar a un elevado número de copias o aquellos que dan lugar a un bajo número de copias, por ejemplo *f1-ori* y *col E1 ori*.

45 Preferiblemente, los plásmidos incluyen al menos un marcador seleccionable que sea funcional en el hospedante, que permita que las células transformadas sean identificadas y/o cultivadas selectivamente. Los genes marcadores seleccionables adecuados para hospedantes bacterianos incluyen el gen de resistencia a ampicilina, el gen de resistencia a cloranfenicol, el gen de resistencia a tetraciclina, el gen de resistencia a canamicina y otros conocidos en la técnica.

Los ejemplos de plásmidos para expresión en bacterias incluyen los vectores pET de expresión pET3a, pET 11a, pET 12a-c y pET 15 b (disponibles en Novagen, Madison, Wis.). Los vectores de bajo número de copias (p.ej., pPD100) pueden usarse para una sobreproducción eficiente de péptidos nocivos para el hospedante de *E. coli* (Dersch et al., FEMS Microbiol. Lett. 123:19, 1994).

50 Los ejemplos de hospedantes adecuados son bacterias, levaduras, insectos y células de mamífero. Sin embargo, a menudo se usan bacterias como *E. coli*.

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

Por consiguiente, los péptidos pueden unirse y desactivar lipopolisacáridos de diversas bacterias Gram-negativas, actuando de este modo como inhibidores de la inflamación inducida por lipopolisacáridos. Los péptidos también pueden modular el crecimiento de células eucarióticas. El péptido antimicrobiano de la invención puede colocarse/integrarse en un producto tal como vendas, escayolas, suturas, jabón, tampones, pañales, champús, pasta de dientes, compuestos anti-acné, cremas solares, textiles, adhesivos, incorporados en recubrimientos de heridas, disoluciones de lavado, lentes de contacto o implantes.

Adicionalmente, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un péptido antimicrobiano como el descrito anteriormente y un tampón, diluyente, vehículo, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable. Se pueden incluir compuestos adicionales en las composiciones, tal como otros péptidos antimicrobianos, agentes inmunomodulantes, agentes antipruritus. Los ejemplos de otros péptidos antimicrobianos se describen en las patentes WO 2005/0611535 y WO 2005/001737. Otros ejemplos incluyen, agentes quelantes como EDTA, citrato, EGTA o glutatona. Las composiciones antimicrobianas/farmacéuticas pueden prepararse de un modo conocido en la técnica que sea suficientemente estable durante el almacenamiento y adecuado para administración a humanos y animales. Las composiciones farmacéuticas pueden liofilizarse, p.ej., mediante secado por congelación, secado por pulverización y enfriamiento por pulverización.

“Farmacéuticamente aceptable” significa un material no tóxico que no pierde eficacia de actividad biológica de los ingredientes activos, es decir, el(los) péptido(s) antimicrobiano(s). Dichos 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).

El término “tampón” pretende indicar una disolución acuosa que contiene una mezcla ácido-base con el propósito de establecer un pH. Los ejemplos de tampones son Trizma, Bicina, Tricina, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, fosfato, carbonato, acetato, citrato, glicolato, lactato, borato, ACES, ADA, tartrato, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, cacodilato, CHES, DIPSO, EPPS, etanolamina, glicina, HEPPSO, imidazol, ácido imidazoléctico, PIPES, SSC, SSPE, POSO, TAPS, TABS, TAPSO y TES.

El término “diluyente” pretende indicar una disolución acuosa o no acuosa con el propósito de diluir el péptido en la preparación farmacéutica. El diluyente puede ser uno o más de salino, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tal como aceite de alazor, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de algodón o aceite de sésamo).

El término “adyuvante” pretende indicar cualquier compuesto añadido a la formulación para aumentar el efecto biológico del péptido. El adyuvante puede ser uno o más de sal de cinc, cobre o plata con diferentes aniones, por ejemplo, aunque sin limitación, fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, tiocianato, sulfito, hidróxido, fosfato, carbonato, lactato, glicolato, citrato, borato, tartrato y acetatos de diferente composición de acilo.

El excipiente puede ser uno o más de carbohidratos, polímeros, lípidos y minerales. Los ejemplos de carbohidratos incluyen lactosa, sacarosa, manitol y ciclodextrinas, que se añaden a la composición, p.ej., para facilitar la liofilización. Los ejemplos de polímeros son almidón, éteres de celulosa, celulosa carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetil celulosa, hidroxietil celulosa, etilhidroxietil celulosa, alginatos, carragenos, ácido hialurónico y derivados del mismo, ácido poliacrílico, polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno, copolímeros de óxido de polietileno/óxido de polipropileno, polivinilalcohol/polivinilacetato de diferente grado de hidrólisis y polivinilpirrolidona, todos de peso molecular diferente, que se añaden a la composición, p.ej., para controlar la viscosidad, para alcanzar bioadhesión o para proteger el lípido frente a degradación química y proteolítica. Los ejemplos de lípidos son ácidos grasos, fosfolípidos, mono-, di- y tri-glicéridos, ceramidas, esfingolípidos y glicolípidos, todos con diferente longitud de cadena de acilo y saturación, lecitina de huevo, lecitina de soja, huevo hidrogenado y lecitina de soja, que se añaden a la composición por razones similares a las de los polímeros. Los ejemplos de minerales son talco, óxido de magnesio y óxido de titanio, que se añaden a la composición para obtener beneficios tales como reducción de acumulación de líquidos o propiedades de pigmento ventajosas.

La formulación de la invención también puede contener uno o más mono- o disacáridos tal como xilitol, sorbitol, manitol, lactitol, isomalta, maltitol o xilósidos y/o monoacilgliceroles, tal como monolaurina. Las características del vehículo dependen de la ruta de administración. Una ruta de administración es la administración tópica. Por ejemplo, para administración tópica, un vehículo preferido es una crema emulsificada que comprende el péptido activo, pero se pueden usar otros vehículos comunes tal como determinados ungüentos de base vaselina/mineral y de base vegetal, así como geles poliméricos, fases líquidas cristalinas y microemulsiones.

Las composiciones pueden comprender uno o más péptidos, tal como 1, 2, 3 ó 4 péptidos diferentes. Usando una combinación de diferentes péptidos se puede aumentar el efecto antimicrobiano y/o la posibilidad de que el microorganismo podría ser resistente y/o tolerante frente al agente antimicrobiano.

El péptido en forma de sal es un aducto 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 ácidos orgánicos tal como ácido fórmico, ácido acético, ácido haloacético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido malónico, ácido fumárico, ácido antranílico,

ácido benzoico, ácido cinnámico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenosulfónico, ácido sulfanílico, etc. Sales inorgánicas tales como las monovalentes de sodio y potasio, o las divalentes de zinc, magnesio, cobre, calcio, todas con el correspondiente anión, se pueden añadir para mejorar la actividad biológica de la composición antimicrobiana.

5 Las composiciones antimicrobianas/farmacéuticas de la invención también pueden presentarse en la forma de un liposoma, en el que el péptido se combina, además de con 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 la formulación liposomal incluyen, aunque sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lisolectina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y otros similares. La preparación de dichas formulaciones liposomales se puede encontrar, por ejemplo, en la patente US 4.235.871.

10 Las composiciones antimicrobianas/farmacéuticas de la invención también pueden encontrarse en la forma de microesferas biodegradables. Para la producción de microesferas, se han usado ampliamente como polímeros biodegradables poliésteres alifáticos, tal como el poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), copolímeros de PLA y PGA (PLGA) o poli(caprolactona) (PCL), y polianhídridos. Las preparaciones de dichas microesferas se pueden encontrar en las patentes US 5.851.451 y EP 0213303.

15 Las composiciones antimicrobianas/farmacéuticas de la invención también pueden encontrarse en la forma de geles poliméricos, donde se usan polímeros tales como almidón, éteres de celulosa, celulosa carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetil celulosa, hidroxietil celulosa, etilhidroxietil celulosa, alginatos, carragenos, ácido hialurónico y derivados del mismo, ácido poliacrílico, polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno, copolímeros de óxido de polietileno/óxido de polipropileno, polivinilalcohol/polivinilacetato de diferente grado de hidrólisis, y polivinilpirrolidona, para el espesamiento de la disolución que contiene el péptido. Los polímeros también pueden comprender gelatina o colágeno.

20 Alternativamente, los péptidos antimicrobianos se pueden disolver en salino, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tal como aceite de alazor, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de algodón o aceite de sésamo), goma arábica y/o diversos tampones. La composición farmacéutica también puede incluir iones y un pH definido para potenciar la acción de los péptidos antimicrobianos.

25 Las composiciones antimicrobianas/farmacéuticas se pueden someter a operaciones farmacéuticas convencionales tales como esterilización y/o pueden contener adyuvantes convencionales tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsificantes, rellenos, etc., p.ej., como se describe en cualquier otra parte de la presente memoria.

30 Las composiciones farmacéuticas según la invención se pueden administrar local o sistémicamente. Las rutas para administración incluyen la 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 adecuadas son, por ejemplo, gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, (micro) cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, microemulsiones, definidas como sistemas ópticamente isotrópicos y termodinámicamente estables de agua, aceite y un tensioactivo, fases líquidas cristalinas, definidas como sistemas que se caracterizan por ordenamiento de largo alcance pero falta de orden a corto alcance (los ejemplos incluyen fases lamelares, hexagonales y cúbicas, tanto continuas en agua como en aceite), o sus contrapartidas dispersas, geles, ungüentos, dispersiones, suspensiones, cremas, aerosoles, gotas o disolución inyectable en forma de ampollas, y también preparaciones con liberación retardada de compuestos activos, en cuya preparación se usan de forma habitual excipientes, diluyentes, adyuvantes o vehículos como los descritos anteriormente. La composición farmacéutica también puede proporcionarse en vendas, escayolas o en suturas o similar.

35 Las composiciones farmacéuticas se administrarán a un paciente en una dosis farmacéuticamente efectiva. Por "dosis farmacéuticamente efectiva" se entiende una dosis que sea suficiente para producir los efectos deseados en relación a la afección para la cual se administran. La dosis exacta depende de la actividad del compuesto, del modo de administración, de la naturaleza y la gravedad del trastorno, de la edad y peso corporal del paciente, se pueden necesitar diferentes dosis. La administración de la dosis se puede llevar a cabo mediante administración individual en la forma de una dosis unitaria individual o como varias dosis unitarias más pequeñas, y también mediante administración múltiple de dosis subdivididas a intervalos específicos.

40 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar solas o en combinación con otros agentes terapéuticos, tal como agentes antibióticos, antiinflamatorios o antisépticos, tal como agentes antibacterianos, antifúngicos, antivirales, y antiparasitarios. Alternativamente, la composición farmacéutica comprende uno o más agente(s) antibiótico(s) o antiséptico(s). Los ejemplos son penicilinas, cefalosporinas, carbacefenos, cefamicinas, carbapenemos, monobactanos, aminoglicósidos, glicopéptidos, quinolonas, tetraciclinas, macrólidos y fluoroquinolonas. Los agentes antisépticos incluyen yodo, plata, cobre, clorhexidina, polihexanuro y otras biguanidas, quitosán, ácido acético y peróxido de hidrógeno. Estos agentes pueden incorporarse como parte de la misma composición farmacéutica o pueden administrarse de forma separada. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener fármacos antiinflamatorios tales como esteroides y derivados de macrolactama.

La presente invención afecta tanto a humanos como a otros mamíferos, tal como caballos, perros, gatos, vacas, cerdos, camellos, entre otros. Por tanto, los métodos son aplicables tanto a terapia de humanos como a aplicaciones veterinarias. Los objetivos adecuados para dicho tratamiento pueden identificarse a través de síntomas claros de una infección, tal como fiebre, pus, cultivo de organismos, y similares. Las infecciones que pueden ser tratadas con los péptidos antimicrobianos incluyen aquellas provocadas o debidas a microorganismos. Los ejemplos de microorganismos incluyen bacterias (p.ej., Gram-positivas, Gram-negativas), hongos (p.ej., levaduras y mohos), parásitos (p.ej., protozoos, nematodos, cestodos y trematodos), virus y priones. Los organismos específicos de estas clases son bien conocidos (véase, por ejemplo, Davis et al., Microbiology, 3ª edición, Harper & Row, 1980). Las infecciones incluyen, aunque sin limitación, úlceras cutáneas crónicas, heridas infectadas agudas y crónicas y quemaduras, eczema cutáneo infectado, impétigo, dermatitis atópica, acné, otitis externa, infecciones vaginales, dermatitis seborreica, infecciones orales y periodontitis, intertrigo candidal, conjuntivitis y otras infecciones oculares tales como queratitis de *P aeruginosa*, y neumonía.

Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas pueden usarse para tratamiento profiláctico de quemaduras, tras cirugía y tras un trauma cutáneo. La composición farmacéutica también se puede incluir en disoluciones destinadas a almacenamiento y tratamiento de materiales externos en contacto con el cuerpo humano, tal como lentes de contacto, implantes ortopédicos y catéteres.

Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas pueden usarse para tratamiento de dermatitis atópica, impétigo, úlceras cutáneas crónicas, heridas infectadas agudas y quemaduras, acné, otitis externa, infecciones fúngicas, neumonía, dermatitis seborreica, intertrigo candidal, vaginitis candidal, candidiasis orofaríngea, infecciones oculares (conjuntivitis bacteriana) e infecciones nasales (que incluyen carruaje MRSA).

Las composiciones farmacéuticas también se pueden usar en disoluciones de limpieza, tal como desinfectantes de lentes y disoluciones de almacenamiento de lentes, o se pueden usar para prevenir infecciones bacterianas asociadas al uso de catéteres urinarios o al uso de catéteres venosos centrales.

Adicionalmente, las composiciones se puede usar para la prevención de infecciones post-cirugía en escayolas, adhesivos, suturas, o se pueden incorporar en recubrimientos de heridas.

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

También se describe un método para tratar a un mamífero que tenga una infección microbiana o que padezca una alergia, que comprende la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica definida anteriormente.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, aunque sin limitar, la invención en cualquier modo o forma, tanto explícita como implícitamente.

### Ejemplos

35 Péptidos antimicrobianos

Péptidos. Los péptidos procedían de Sigma-Genosys, generados mediante una plataforma de síntesis de péptidos (PEPscreen®, Custom Peptide Libraries, SigmaGenosys). El rendimiento fue de ~1-6 mg, y la longitud de péptido de 20 aminoácidos. Se llevó a cabo una Espectrometría de Masas MALDI-ToF de estos péptidos. La Pureza Sin Purificar media de 20meros fue de ~60%. Los péptidos fueron suministrados liofilizados y una gradilla de tubos de 96 pocillos. Antes de la evaluación biológica, los péptidos PEPscreen fueron diluidos en dH<sub>2</sub>O (reserva 5 mM), y se almacenaron a -20°C. Esta disolución de reserva se usó para los experimentos posteriores.

Microorganismos

*Eschericia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, y el elemento fúngico aislado *Candida albicans* ATCC90028 fueron obtenidos del Departamento de Bacteriología, Hospital Universitario de Lund.

45 Ejemplo 1

Ensayo de difusión radial

Los ensayos de difusión radial (RDA) se llevaron a cabo esencialmente como se ha descrito anteriormente (Lehrer, R. I., Rosenman, M., Harwig, S. S., Jackson, R. & Eisenhauer, P. (1991) "Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides", J Immunol Methods. 137, 167-73). Los resultados se muestran en la Tabla 1 a-e.

50 Resumidamente, se cultivaron bacterias (*E. coli*, *S. aureus*) u hongos (*C. albicans*) hasta la fase medio-logarítmica en 10 mL de caldo de soja de tripticasa (TBS) de fuerza completa (3% p/v) (Becton-Dickinson, Cockeysville, MD). Los microorganismos fueron lavados una vez con Tris 10 mM, pH 7,4. Se añadieron 4 x 10<sup>6</sup> bacterias/cm o 1x10<sup>5</sup> cfu fúngicas a 5 mL de gel de agarosa subyacente, que consistía en 0,03% (p/v) de TSB, 1% (p/v) de agarosa de

bajo-electroendoosmosistipo (Bajo-EEO) (Sigma, St. Louise, MO) y una concentración final de 0,02% (v/v) de Tween 20 (Sigma). La capa subyacente fue vertida en una placa petri de 85 mm de diámetro. Una vez que la agarosa solidificó, se perforaron pocillos de 4 mm de diámetro y se añadieron 6 µL de muestra de ensayo a cada pocillo. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 3 horas para permitir la difusión de los péptidos. El gel subyacente se cubrió entonces con 5 mL de capa subyacente fundida (6% de TSB y 1% de agarosa Bajo-EEO en dH<sub>2</sub>O). La actividad antimicrobiana de un péptido se visualiza como una zona clara alrededor de cada pocillo tras 18-24 horas de incubación a 37°C para bacterias y 28°C para *Candida albicans*. A continuación se muestran otros ejemplos de péptidos que fueron escrutados y que se observó que mostraban un efecto incrementado contra los microorganismos mencionados anteriormente. Algunos de los resultados se muestran en la tabla 1c, que presenta los efectos contra *C. albicans*, la tabla 1d *E. coli* y la tabla 1e *S. aureus*.

Complemento

CNY1

CNY1WWW CNYITELRRQHARASHLGLAWWW

CNY187

CNY187WWW CKYILLRRQHARAWRRGLRWWW

Factores de crecimiento

GKR22

GKR22WWW GKRKKKGKGLGKKRDPCLRKYKWWW

PKR21

PKR21WWW PKRKKKGKNGKNRRNRKKKNWWW

Factor de coagulación II

VFR17

VFR17WWW VFRLKKWIQKVIDQFGEWWW

Inhibidor de proteína C

SEK20

SEK20WWW SEKTLRKWLKMFKKRQLELYWWW

PRELP

QPT22

QPT22WWW QPTRRPRPGTGPGRRPRPRPWWW

LL-37

LL-37

LL-37WWW

LLGDFFRKSKEKI

KEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTESWWW

Omiganan

PRELP

OmigananWWW

ILRWPWWPWRRKWWW

Ejemplo 2

Ensayo de hemólisis

5 Se centrifugó EDTA-sangre a 800 g durante 10 minutos, tras lo cual se eliminó el plasma y el recubrimiento. Los eritrocitos fueron lavados tres veces y resuspendidos en 5% de PBS, pH 7,4. A continuación las células fueron incubadas con rotación extremo-sobre-extremo durante 1 h a 37°C en presencia de péptidos (3-60  $\mu$ M). Se usó Triton X-100 (Sigma-Aldrich) como control positivo. Después las muestras fueron centrifugadas a 800 g durante 10 minutos. Se midió la absorbancia de la hemoglobina liberada a  $\lambda$  540 nm y en el gráfico se expresa como % de hemólisis inducida por Triton X-100 (Tabla 1a).

Tabla 1a

Péptido N° Secuencia	E. coli ATCC 25922		E. coli ATCC 25922		S. aureus ATCC 29213		Candida albicans ATCC 90028		Hemólisis (%)	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
	24/04/2006		24/04/2006		21/04/2006		22/04/2006		20/04/2006	
	Crecimiento interno* contabilizado		Crecimiento interno no contabilizado							
1. HKHGHGHGKHKNKGKKN	0,947	0,526	0,947	0,526	0,747	0,382	1,493	0,516	2,321	0,057
2. LKHGHGHGKHKNKGKKN	7,277	0,200	2,320	0,299	1,963	0,547	0,920	0,185	2,382	0,022
3. LLHKHGHGHGKHKNKGKKN	5,977	0,474	2,820	0,095	2,900	0,332	1,927	0,555	2,394	0,059
4. LLLHKHGHGHGKHKNKGKKN	7,450	0,385	5,933	0,352	3,607	0,179	4,483	0,382	2,425	0,059
5. HKHGHGHGKHKNKGKKNL	5,613	0,939	2,650	0,275	2,903	0,451	3,167	0,817	2,255	0,051
6. HKHGHGHGKHKNKGKKNLL	6,060	0,686	3,753	0,341	3,763	0,309	3,313	0,291	2,431	0,063
7. HKHGHGHGKHKNKGKKNLLL	6,893	0,535	4,940	1,161	5,710	0,665	4,723	0,731	2,418	0,058
8. HKHGHGHGLKHKNKGKKN	6,597	1,067	2,833	0,459	2,803	0,399	2,713	0,388	2,509	0,060
9. HKHGHGHGLLKHKNKGKKN	5,727	0,726	3,637	0,253	2,907	0,320	3,053	0,427	2,546	0,064
10. HKHGHGHGLLLKHKNKGKKN	5,440	0,766	3,793	0,760	3,187	0,816	3,883	0,657	2,594	0,063
11. AAAHKHGHGHGKHKNKGKKN	2,210	0,433	2,210	0,433	2,047	0,185	1,540	0,936	2,455	0,057
12. IIIHKHGHGHGKHKNKGKKN	7,200	0,144	4,383	0,191	4,057	0,497	4,497	0,827	2,770	0,064
13. VVVHKHGHGHGKHKNKGKKN	3,717	1,483	3,717	1,483	4,123	0,282	4,673	0,734	2,218	0,049
14. PPPHKHGHGHGKHKNKGKKN	2,230	0,302	2,230	0,302	0,000	0,000	4,553	0,191	2,703	0,056
15. YYYHKHGHGHGKHKNKGKKN	7,090	0,983	7,090	0,983	4,467	0,285	5,780	0,321	2,346	0,055
16. FHKHGHGHGKHKNKGKKN	8,883	1,495	7,927	0,957	4,357	0,255	6,110	1,819	2,425	0,056
17. FFHKHGHGHGKHKNKGKKN	4,350	1,419	2,307	0,811	3,320	0,314	3,667	0,552	2,182	0,052
18. FFFHKHGHGHGKHKNKGKKN	8,307	1,781	8,877	0,795	4,140	0,504	4,543	0,485	2,303	0,055

Péptido N° Secuencia	E. coli ATCC 25922		E. coli ATCC 25922		S. aureus ATCC 29213		Candida albicans ATCC 90028		Hemólisis (%)	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
	24/04/2006		24/04/2006		21/04/2006		22/04/2006		20/04/2006	
	Crecimiento interno* contabilizado		Crecimiento interno no contabilizado							
19. WHKHGHGKHKNKGKKN	4,253	1,117	4,253	1,117	4,090	1,017	3,950	0,519	2,503	0,062
20. WWHKHGHGKHKNKGKKN	5,087	1,050	3,460	0,455	3,633	0,229	5,080	0,609	2,709	0,066
21. WWWHKHGHGKHKNKGKKN	9,000	0,479	9,000	0,479	4,710	0,661	7,037	1,653	2,812	0,070
22. Ac-LLLHKHGHGKHKNKGKKN	4,597	1,085	4,597	1,085	4,580	0,866	7,480	0,807	3,200	0,070
23. Ac-FFFHKHGHGKHKNKGKKN	8,007	0,276	8,007	0,276	4,187	0,025	7,450	0,408	3,091	0,071
24. Ac-WWWHKHGHGKHKNKGKKN	6,860	0,546	6,860	0,546	3,900	0,122	6,253	0,599	3,243	0,081
25. HKHGHGKHKNKGKKNWWW	9,237	0,318	9,237	0,318	6,847	0,657	8,780	0,036	3,625	0,087
26. HKHGHGKHKNKGKKNFFF	8,087	0,598	8,087	0,598	5,070	0,654	7,593	0,660	3,031	0,064
27. LLLNKGKKNKHGHGKHKH	4,880	1,264	4,880	1,264	4,027	0,329	5,857	0,081	2,625	0,068
28. NKKGKKNKHGHGKHKHL	7,943	0,189	7,943	0,189	5,957	0,818	5,663	0,211	3,261	0,087
29. WWWWHKHGHGKHKNKGKKN	8,343	0,068	8,343	0,068	5,077	0,475	5,793	0,226	4,334	0,108
30. FFFFHKHGHGKHKNKGKKN	8,137	0,530	8,137	0,530	3,907	0,361	7,663	0,356	3,340	0,093
31. LLLHKHGHGKHKNKGKKN	8,113	0,388	8,113	0,388	3,917	0,156	8,177	1,028	3,006	0,082
32. IIIHKHGHGKHKNKGKKN	5,877	0,556	5,877	0,556	3,423	0,525	4,747	0,651	2,534	0,062
33. HKHGHGKHKNKGKKN	2,167	1,016	2,167	1,016	0,797	0,200	1,347	0,516	2,194	0,051
34. HKHGHGKHKNKGKKNKH	8,483	1,270	3,257	0,843	2,183	0,306	2,340	0,387	2,376	0,037
35. HKHGHGKHKNKGKKNKH	3,413	0,083	3,413	0,083	2,937	0,067	3,147	0,344	2,212	0,052
36. HKHGHGKHKNKGKKNKH	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	2,194	0,052
37. HKHGHGKHKNKGKKNKH	8,030	0,114	8,030	0,114	4,073	0,548	5,993	0,178	3,564	0,069

Péptido N° Secuencia	E. coli ATCC 25922		E. coli ATCC 25922		S. aureus ATCC 29213		Candida albicans ATCC 90028		Hemólisis (%)	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
	24/04/2006		24/04/2006		21/04/2006		22/04/2006		20/04/2006	
	Crecimiento interno* contabilizado		Crecimiento interno no contabilizado							
38. HKHLHGHLKHKNKLLKNGKH	4,967	1,704	4,967	1,704	2,807	0,348	3,800	0,249	2,334	0,051
39. HKHGHHLKHKNKLLKNGKH	6,537	0,408	4,157	0,100	2,520	0,236	3,310	0,489	2,303	0,051
40. HKHGHGHLKHKNKLLKNGKH	3,577	0,186	3,577	0,186	2,720	0,113	3,237	0,153	2,425	0,058
41. HKHGHGHLKHKNKLLKNGKH	6,473	0,575	3,203	0,309	3,417	0,375	2,177	0,170	2,346	0,053
42. GKHKNGKNGKHNGWK	5,513	0,408	5,513	0,408	4,303	0,267	4,280	0,359	2,461	0,059
43. LGKHKNKNGKHNGWK	3,970	0,070	3,970	0,070	2,597	0,249	3,457	0,075	3,140	0,056
44. LLLGKHKNKNGKHNGWK	7,500	0,384	7,500	0,384	3,417	0,107	4,227	0,227	3,152	0,081
45. LLLGKHKNKNGKHNGWK	7,237	0,444	7,237	0,444	3,653	0,242	5,200	0,401	2,667	0,072
46. GKHKNGKNGKHNGWKL	6,077	0,136	6,077	0,136	4,390	0,436	4,420	0,316	2,564	0,062
47. GKHKNGKNGKHNGWKL	10,190	0,793	10,190	0,793	4,297	0,086	5,447	0,085	2,909	0,079
48. GKHKNGKNGKHNGWKL	9,607	0,811	9,607	0,811	4,913	0,497	4,083	0,161	3,061	0,078
49. GKHKNGKNGKHNGWK	6,793	1,198	6,793	1,198	3,490	0,384	4,047	0,470	2,467	0,061
50. GKHKNGKNGKHNGWK	9,500	1,621	9,500	1,621	3,700	0,534	3,970	0,092	3,237	0,080
51. GKHKNGKNGKHNGWK	6,897	0,075	6,897	0,075	3,263	0,312	4,300	0,176	2,722	0,068
52. AAAGKHKNKNGKHNGWK	5,380	1,592	5,380	1,592	2,757	0,250	3,353	0,253	2,661	0,069
53. IIGKHKNKNGKHNGWK	6,627	0,293	6,627	0,293	3,247	0,189	4,770	0,690	2,885	0,081
54. FFFGKHKNKNGKHNGWK	7,530	0,190	7,530	0,190	3,910	0,123	5,847	0,376	3,352	0,095
55. WWWGKHKNKNGKHNGWK	9,757	0,179	9,757	0,179	4,133	0,575	7,140	0,391	2,703	0,068
56. GKHKNGKNGKHNGWK	5,910	0,075	5,910	0,075	3,237	0,292	3,807	0,253	2,109	0,046

Péptido N° Secuencia	E. coli ATCC 25922		E. coli ATCC 25922		S. aureus ATCC 29213		Candida albicans ATCC 90028		Hemólisis (%)	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
	24/04/2006		24/04/2006		21/04/2006		22/04/2006		20/04/2006	
	Crecimiento interno* contabilizado		Crecimiento interno no contabilizado							
57. Ac-LLLGGKHKNGKNGKHNGWK	5,743	0,061	5,743	0,061	3,757	0,040	6,237	0,644	2,812	0,071
58. Ac-FFFGKHKNGKNGKHNGWK	6,573	0,317	6,573	0,317	3,970	0,387	6,493	0,559	2,709	0,069
59. Ac-WWWGKHKNKGGKNGKHNGWK	8,043	0,172	8,043	0,172	3,953	0,454	6,187	0,701	3,685	0,099
60. GKHKNGKNGKHNGWKWWW	9,350	0,282	9,350	0,282	7,187	0,471	7,757	0,659	4,298	0,117
61. GKHKNGKNGKHNGWKFFF	8,487	1,186	8,487	1,186	7,200	0,321	8,033	0,775	4,776	0,134
62. HKHGHHLHKHKNGKNGKH	5,537	1,380	5,537	1,380	2,743	0,544	3,123	0,663	2,437	0,059
63. HKHGHHLHKHKNGKNGKH	6,003	2,117	6,003	2,117	3,057	0,345	4,033	0,362	2,170	0,052
LL-37	6,53	0,256	6,53	0,256	4,660	0,969	4,890	1,092	21,464	0,765

ES 2 476 590 T3

Tabla 1b

	Secuencia	Valores de RDA (mm)			
		<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>S. aureus</i> ATCC 29213 en	
		Tris HCl 10 mM (pH 7,4)		Tris HCl 10 mM (pH 7,4)	
T1	KNKGKKNKGKH	2,56	0,33	0,00	0,00
T2	KNKGKKNKGKHHWWW	8,90	0,47	4,23	0,78
T3	KNKGKKNKGKWWW	9,16	0,64	4,07	0,08
T4	KNKGKKNKGWWW	nd	nd	nd	nd
T5	KNKGKKNWWW	8,36	0,47	2,85	0,44
T6	KNKGKKNWWW	8,16	0,45	2,79	0,27
T7	KNKGKKNWWW	6,84	0,52	0,00	0,00
T8	KNKGKKNWWW	2,94	0,72	0,00	0,00
T9	KNKKNWWW	2,73	0,10	0,00	0,00
T10	KNKKNWWW	2,69	0,95	0,00	0,00
T11	KKNWWW	0,00	0,00	0,00	0,00
T12	KNKKNWWW	0,00	0,00	0,00	0,00
T13	KNKGKKNKGKHHWWWWW	7,93	0,18	5,58	0,59
T14	KNKGKKNKGKWWWWW	7,90	0,83	5,07	0,24
T15	KNKGKKNKGWWWWW	8,03	0,04	3,90	0,52
T16	KNKGKKNKWWWWW	9,09	0,06	3,83	0,55
T17	KNKGKKNKWWWWW	8,98	0,28	3,88	0,26
T18	KNKGKKNVWWW	8,21	0,14	1,82	0,26
T19	KNKGKKNVWWW	4,49	0,26	1,10	0,09
T20	KNKKNVWWW	4,22	0,02	0,55	0,08
T21	KNKKNVWWW	1,70	0,37	0,00	0,00
T22	KKNVWWW	2,18	0,27	0,00	0,00
T23	KNKGKKNKGKHHWWW	8,65	0,18	3,26	0,27
T24	KNKGKKNKGKHHWWW	8,44	0,49	2,41	0,54
T25	KNKGKKNKGKHHWWW	8,87	0,23	2,55	0,17
T26	KNKGKKNKGKHHWWW	7,47	0,57	1,76	0,32
T27	KNKGKKNKGKHHWWW	7,56	0,30	1,68	0,35
T28	KNKGKKNKGKHHWWW	4,99	0,52	0,00	0,00
T29	KNKGKKNKGKHHWWW	0,00	0,00	0,00	0,00
T30	KNKGKKNKGKHHWWW	3,05	0,01	0,00	0,00
T31	KNKGKKNKGKHHWWW	1,48	0,21	0,00	0,00
T32	KNKGKKNKGKHHWWW	0,00	0,00	0,00	0,00
T33	WWWKNKGKKNKGKH	7,95	0,31	2,20	0,40
T34	WWWKNKGKKNKGK	4,94	0,82	0,43	0,24
T35	WWWKNKGKKNKG	1,57	0,08	0,00	0,00

ES 2 476 590 T3

		Valores de RDA (mm)			
		<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>S. aureus</i> ATCC 29213 en	
Secuencia		Tris HCl 10 mM (pH 7,4)		Tris HCl 10 mM (pH 7,4)	
T36	WWWKNGKKN	5,04	0,18	0,66	0,09
T37	WWWKNGK	3,28	0,06	0,11	0,06
T38	WWWKNGK	1,42	0,15	0,00	0,00
T39	WWWKNG	0,00	0,00	0,00	0,00
T40	WWWKNK	0,00	0,00	0,00	0,00
T41	WWWKN	0,00	0,00	0,00	0,00
T42	WWWK	0,00	0,00	0,00	0,00
T43	SNSGSSNGSH	0,00	0,00	0,00	0,00
T44	SNSGSSNGSHWWW	0,00	0,00	0,00	0,00
T45	WWWSNSGSSNGSH	0,00	0,00	0,00	0,00
T46	KKKKKKKKKK	5,94	0,71	1,32	0,40
T47	KKKKKKKKKKWWW	7,48	0,13	4,46	0,71
T48	KKKKKKKKKKWWW	9,26	0,30	7,19	1,30
T49	KKKKKKKKKKWWW	7,90	0,03	5,48	1,33
T50	KKKKKKKKWWW	7,82	0,26	4,90	0,69
T51	KKKKKKWWW	8,12	0,42	4,16	0,33
T52	KKKKKWWW	9,01	0,06	3,43	0,46
T53	KKKKWWW	8,11	0,44	2,85	0,33
T54	KKKWWW	4,93	0,48	2,02	0,49
T55	KKWWW	2,95	0,43	1,01	0,38
T56	KWWW	4,48	0,28	0,75	0,18
T57	SSSSSSSSSS	0,00	0,00	0,00	0,00
T58	SSSSSSSSSSWWW	0,00	0,00	0,00	0,00
T59	DDDDDDDDDD	0,00	0,00	0,00	0,00
T60	DDDDDDDDDDWWW	0,00	0,00	0,00	0,00
T61	KNKGKNGKHGSGSPWWW	8,64	0,04	1,52	0,17
LL-37		7,55	0,36	3,23	0,67

Tabla 1c

Péptido	Péptido ( $\mu\text{M}$ )	Datos			Media	SD
GKR-22	0,1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	50	1,04	1,08	1,01	1,04	0,04
	100	3,66	3,31	2,50	3,16	0,60
GKR-22-WWW	0,1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	10	0,50	0,94	0,54	0,66	0,24
	50	1,95	1,59	1,40	1,65	0,28
	100	5,30	5,74	5,62	5,55	0,23
PKR-21	0,1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	10	0,42	0,39	0,58	0,46	0,10
	50	4,66	3,95	3,51	4,04	0,58
	100	4,65	4,56	4,55	4,59	0,06
PKR-21-WWW	0,1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	0,55	0,42	0,51	0,49	0,07
	5	1,26	1,06	1,10	1,14	0,11
	10	3,54	2,82	2,97	3,11	0,38
	50	5,84	5,44	5,13	5,47	0,36
	100	6,69	7,04	7,19	6,97	0,26

Tabla 1d

Péptido	Péptido ( $\mu\text{M}$ )	Datos			Media	SD
GKR-22	0,1	0	0	0	0,00	0,00
	0,5	0	0	0	0,00	0,00
	1	0	0	0	0,00	0,00
	5	1,88	1,85	2,07	1,93	0,12
	10	2,07	3,47	2,74	2,76	0,70
	50	3,68	3,65	3,61	3,65	0,04
	100	4,5	5,24	4,19	4,64	0,54
GKR-22-WWW	0,1	0	0	0	0,00	0,00
	0,5	0,14	0,85	0,17	0,39	0,40
	1	2,74	3,2	2,59	2,84	0,32
	5	2,97	3,58	3,2	3,25	0,31
	10	5,67	5,68	5,48	5,61	0,11
	50	6,61	6,64	6,47	6,57	0,09
	100	7,8	8,04	8,12	7,99	0,17
PKR-21	0,1	0	0	0	0,00	0,00
	0,5	0,3	0,7	0,58	0,53	0,21
	1	0,56	0,97	1,02	0,85	0,25
	5	0,63	1,65	0,55	0,94	0,61
	10	0,94	1,08	1,02	1,01	0,07
	50	1,16	1,52	1,01	1,23	0,26
	100	1,34	1,37	1,39	1,37	0,03
PKR-21-WWW	0,1	0	0	0	0,00	0,00
	0,5	1,26	1,05	0,84	1,05	0,21
	1	3,6	2,59	3,49	3,23	0,55
	5	4,99	5,03	4,75	4,92	0,15
	10	5,86	5,87	6,13	5,95	0,15
	50	7,71	7,97	6,98	7,55	0,51
	100	7,34	8,26	7,99	7,86	0,47

Tabla 1e

Péptido	Péptido ( $\mu\text{M}$ )	Datos			Media	SD
GKR-22	0,1	0	0	0	0,00	0,00
	0,5	0	0	0	0,00	0,00
	1	0,4	0,26	0,25	0,30	0,08
	5	1,87	1,67	2,03	1,86	0,18
	10	2,37	2,46	1,95	2,26	0,27
	50	3,03	3,09	2,96	3,03	0,07
	100	3,88	3,94	3,07	3,63	0,49
GKR-22-WWW	0,1	0	0	0	0,00	0,00
	0,5	0,36	0,49	0,6	0,48	0,12
	1	3,6	3,67	3,78	3,68	0,09
	5	3,87	4,57	4,53	4,32	0,39
	10	6,04	6,87	5,73	6,21	0,59
	50	7,12	8,12	7,41	7,55	0,51
	100	7,4	8,78	8,05	8,08	0,69
PKR-21	0,1	0	0	0	0,00	0,00
	0,5	0	0	0	0,00	0,00
	1	0	0	0	0,00	0,00
	5	0	0	0	0,00	0,00
	10	0,17	0,4	0,77	0,45	0,30
	50	1,06	1,6	1,24	1,30	0,27
	100	2,63	2,54	1,84	2,34	0,43
PKR-21-WWW	0,1	0	0	0	0,00	0,00
	0,5	0	0	0	0,00	0,00
	1	2,56	2,59	3,06	2,74	0,28
	5	2,98	2,5	3,07	2,85	0,31
	10	3,53	4,06	3,83	3,81	0,27
	50	4,21	5,14	4,23	4,53	0,53
	100	4,77	5,67	5,02	5,15	0,46

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Dermagen AB

<120> Composición mejorada

<130> P5856007

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 83

<212> PRT

<213> Quinínógeno humano

<400> 1

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

Gly His Gln Arg Gly His Gly Leu Gly His Gly His Glu Gln Gln His  
 20 25 30

Gly Leu Gly His Gly His Lys Phe Lys Leu Asp Asp Asp Leu Glu His  
 35 40 45

Gln Gly Gly His Val Leu Asp His Gly His Lys His Lys His Gly His  
 50 55 60

Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys Lys Asn Gly Lys His Asn  
 65 70 75 80

Gly Trp Lys

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

<400> 2

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

Gly Lys Lys Asn  
 20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

<400> 3

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

Gly Lys Lys Asn  
 20

<210> 4

ES 2 476 590 T3

<211> 20  
<212> PRT  
<213> artificial

<400> 4

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

Asn Trp Trp Trp  
20

<210> 5  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> artificial

<400> 5

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

Asn Phe Phe Phe  
20

<210> 6  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> artificial

<400> 6

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

Asn Gly Trp Lys  
20

<210> 7  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> artificial

<400> 7

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

Asn Gly Trp Lys  
20

<210> 8  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> artificial

<400> 8

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

Lys Trp Trp Trp  
20

<210> 9

<211> 20  
<212> PRT  
<213> artificial

<400> 9

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

Lys Trp Trp Trp  
20

<210> 10  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> quininógeno humano

<400> 10

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

Asn

<210> 11  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> quinonógeno humano

<400> 11

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

Lys Trp Trp Trp  
20

<210> 12  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> quininógeno humano

<400> 12

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

Lys

## REIVINDICACIONES

1. Un péptido antimicrobiano con actividad antimicrobiana incrementada que comprende
- 5 a) un primer conjunto de residuos de aminoácido seleccionado de las SEQ ID Nos 10 y 12, y
- b) un segundo conjunto de residuos de aminoácido que consiste en de 3 a 8 residuos de aminoácido hidrofóbicos seleccionados del grupo que consiste en V, L, I, F, Y y W, y donde dicho segundo conjunto de residuos de aminoácido está unido al extremo aminoterminal o carboxiterminal de dicho primer conjunto de residuos de aminoácido, obteniendo de este modo dicho péptido antimicrobiano con actividad antimicrobiana incrementada en comparación con el primer conjunto de residuos solo.
- 10 2. El péptido antimicrobiano según la reivindicación 1, donde dicho segundo conjunto comprende el mismo residuo de aminoácido hidrofóbico o una mezcla de diferentes residuos de aminoácido hidrofóbicos.
- 15 3. El péptido antimicrobiano según las reivindicaciones 1-2, donde dicho segundo conjunto se selecciona del grupo que consiste en  $F_{(3-8)}$ ,  $W_{(3-8)}$ ,  $I_{(3-8)}$ ,  $Y_{(3-8)}$  y  $V_{(3-8)}$ .
4. El péptido antimicrobiano según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho péptido se selecciona del grupo que consiste en el nº 4, 7, 12-13, 15, 18, 21-26, 45, 48, 53-55 y 57-61 de la tabla 1A.
- 20 5. El péptido antimicrobiano según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho péptido antimicrobiano es modificado mediante esterificación en el extremo C y/o PEGilación o alquilación en el extremo N.
6. El péptido antimicrobiano según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde cualquiera de los aminoácidos puede ser reemplazado por el correspondiente aminoácido D.
7. Una composición antimicrobiana/farmacéutica que comprende un péptido antimicrobiano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un tampón, diluyente, vehículo, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 8. La composición antimicrobiana/farmacéutica según la reivindicación 7, donde la composición antimicrobiana/farmacéutica se encuentra en la forma de gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, recubrimiento de catéteres y agujas, cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, geles, ungüentos, dispersiones, suspensiones, cremas, aerosoles, gotas o formas inyectables.
- 30 9. Un producto que comprende el péptido antimicrobiano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la composición antimicrobiana/farmacéutica según las reivindicaciones 7 a 8, donde el producto se selecciona del grupo que consiste en vendas, escayolas, suturas, jabón, tampones, pañales, champús, pasta de dientes, compuestos anti-acné, cremas solares, textiles, adhesivos, recubrimientos de heridas, disoluciones de limpieza, lentes de contacto, o implantes.
- 35 10. El uso del péptido antimicrobiano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o de la composición según las reivindicaciones 7 a 8 ó del producto según la reivindicación 9, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o infección provocada por un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en bacterias, virus, parásitos, hongos y levaduras.
- 40 11. El uso según la reivindicación 10, donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en dermatitis atópica, impétigo, úlceras cutáneas crónicas, heridas infectadas agudas o crónicas y heridas por quemadura, acné, otitis externa, infecciones fúngicas, neumonía, dermatitis seborreica, intertrigo candida, vaginitis candida, candidiasis orofaríngea, infecciones oculares e infecciones nasales.