

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 392**

51 Int. Cl.:

A61K 38/03 (2006.01)

A61K 38/40 (2006.01)

C07K 4/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2007 E 09154101 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2078529**

54 Título: **Péptidos antimicrobianos**

30 Prioridad:

10.07.2006 AT 11652006

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

26.03.2015

73 Titular/es:

**PBA3 BIOMED GMBH (100.0%)
Rotmoosweg 33b
8045 Graz, AT**

72 Inventor/es:

**BLONDELLE, SYLVIE E.;
JERALA, ROMAN;
PRISTOVSEK, PRIMOZ;
MAJERLE, ANDREJA;
ZORKO, MATEJA;
JAPELJ, BOSTJAN;
BRANDENBURG, KLAUS;
ANDRAE, JOERG;
PORRO, MASSIMO;
MORIYON URIA, IGNACIO;
LEIVA LEON, JOSE;
MARTINEZ DE TEJADA DE GARAIZABAL,
GUILLERMO;
ZWEYTICK, DAGMAR;
DEUTSCH, GUENTER y
LOHNER, KARL**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 532 392 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.

5 La presente invención se refiere a nuevas familias de péptidos y lipopéptidos que presentan actividades antimicrobianas y neutralizadoras de endotoxinas. Los nuevos compuestos pueden utilizarse además en terapia de combinación con antibióticos o agentes antiendotóxicos convencionales. Además, la presente invención da a conocer procedimientos para preparar y utilizar los nuevos compuestos.

10 La creciente incidencia de bacterias patógenas que son resistentes a antibióticos disponibles comercialmente ha comportado un creciente interés en el desarrollo de péptidos como fármacos antibacterianos. En efecto, una gran fracción de las infecciones adquiridas en el hospital (hasta el 70%) actualmente se debe a bacterias resistentes a antibióticos. Además de los problemas de resistencia a fármacos, el tratamiento antibiótico de las infecciones Gram-negativas puede provocar una liberación de endotoxina, que induce choque séptico, representando un reto adicional para la terapia antimicrobiana. El choque séptico es la causa principal de mortalidad en las unidades de cuidados intensivos. Las bacterias Gram-negativas en particular contienen lipopolisacáridos (o LPS) en su cubierta, los cuales son los inductores de esta respuesta más potentes que se conocen. Además, los antibióticos utilizados actualmente para las infecciones Gram-negativas pueden eliminar bacterias, pero la administración de antibióticos no neutraliza los LPS liberados a partir de las membranas externas de las bacterias muertas. Esta liberación de LPS de hecho puede incrementar las lesiones pulmonares y conducir al síndrome séptico. Por lo tanto, los agentes que presentan propiedades antimicrobianas y neutralizan las endotoxinas liberadas resultarían muy valiosos en el tratamiento de la infección bacteriana.

25 Debido a que las bacterias han evolucionado para presentar múltiples resistencias a un gran número de antibióticos existentes, la nueva clase de compuestos es más probable que minimicen la rápida emergencia de las resistencias bacterianas. La naturaleza nos ha enseñado que las moléculas efectoras de la inmunidad innata de los mamíferos pueden proporcionar una primera línea de defensa contra un abanico sustancial de microorganismos patógenos. En particular, los péptidos de defensa del huésped se consideran moléculas efectoras multifuncionales y representan nuevas fuentes para el desarrollo de agentes terapéuticos con los que superar la resistencia antimicrobiana. Aunque muchos antibióticos convencionales dañan o eliminan las bacterias en un periodo de días, la mayoría de péptidos antimicrobianos matan de manera prácticamente instantánea, es decir, en minutos. Una diversidad de péptidos antimicrobianos bloquean además la interacción de los LPS con sus receptores, tales como LBP, CD14 y MD-2/TLR4, resultando en la inhibición de la activación de los macrófagos, una característica que podría reducir la toxicidad de los LPS.

35 Las lactoferrinas son glucoproteínas endógenas ligantes de hierro que se encuentran en las secreciones exocrinas de los mamíferos y en los gránulos de los neutrófilos durante la respuesta inflamatoria que presentan actividad antimicrobiana y ligante de LPS. Las lactoferrinas presentan propiedades multifuncionales, incluyendo propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivíricas, antitumorales, antiinflamatorias e inmunorreguladoras. Es conocido que la lactoferrina y derivados presentan la capacidad de neutralizar las endotoxinas bacterianas (LPS), protegiendo de esta manera a los organismos de los efectos dañinos de la sepsis. De esta manera, los numerosos informes de sus actividades antimicrobianas y antiinflamatorias *in vitro* identifican la lactoferrina como importante en la defensa del huésped frente a la infección y la inflamación excesiva. La digestión proteolítica *in vitro* e *in vivo* de la lactoferrina humana rinde un fragmento peptídico denominado lactoferricina, la cual presenta una actividad antimicrobiana incrementada en comparación con la lactoferrina integral. Varios derivados sintéticos más cortos de la lactoferricina muestran actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y se unen específicamente a LPS (Strøm *et al.*, J. Peptide Res. 57:127-139, (2001)). Aunque muchos péptidos de defensa del huésped resultan prometedores como nuevos candidatos antimicrobianos, la lactoferrina humana y derivados son únicos en el aspecto de que presentan actividades multifuncionales y, debido a su origen humano, es menos probable que induzcan efectos fisiológicos adversos.

50 El sustrato de quinasa C rico en alaninas miristoilado (MARCKS) y las proteínas relacionadas con MARCKS son los sustratos de la proteína quinasa C principales en muchos tipos celulares. Se ha encontrado que la transcripción de MARCKS se encuentra significativamente regulada positivamente mediante estimulación de los macrófagos y las células microgliales en respuesta a las LPS bacterianas. El motivo de unión a LPS sobre MARCKS es muy similar a los potentes hexapéptidos antimicrobianos identificados utilizando enfoques de librería combinatorial. Debido a que MARCKS es modificado naturalmente mediante miristoilación N-terminal, puede preverse que la inserción de grupos lipofílicos en los derivados de MARCKS más cortos pueda resultar en una potente actividad antimicrobiana y/o unión a LPS.

60 La relevancia de la hidrofobicidad y en particular la presencia de cadenas alquilo o acilo de lipopéptidos para su actividad antimicrobiana ha sido descrita para lipopéptidos (por ejemplo polimixinas, octapeptinas y daptomicina). Además, las polimixinas presentan una elevada afinidad para las moléculas de LPS y permeabilizan la membrana externa alterando los grupos de cabeza cargados negativamente, mediante el desplazamiento de cationes divalentes de sus sitios de unión en los LPS. La acilación del extremo N-terminal de un péptido central no número de la lactoferricina B resulta en una actividad antimicrobiana mejorada. Recientemente se han aislado a partir de

muestras de suelo antibióticos de N-acil-aminoácido de cadena larga. También se ha informado de que las lipopoliaminas (DOSPER, DOSPA y DOGS, la totalidad de las cuales contiene una cadena de alquilo C17) muestran actividad antiendotoxina mediante secuestro de LPS y, a su vez, mediante bloqueo de los eventos de activación celular aguas abajo que conducen a la producción de mediadores proinflamatorios. Aunque ineficaces al someterlas a ensayo solas en ratas neutropénicas con bacteremia Gram-negativa invasiva causada por *Pseudomonas aeruginosa*, al administrarlas con el antibiótico ceftazimidina, estas lipopoliaminas incrementaron significativamente la tasa de supervivencia en comparación con la ceftazimidina sola.

Se prevé que desarrollos en curso de nuevos sistemas de administración incrementen el potencial de los péptidos en el campo terapéutico contra enfermedades infecciosas. Por ejemplo, la administración de péptidos en el tejido cerebral ahora resulta posible, con el reciente desarrollo de la estrategia de péptidos quiméricos (Bickel *et al.*, Adv. Drug Deliv. Rev. 46:247-279, (2001)). Se ha informado de que un caso exitoso de pneumonectomía y posterior tratamiento con fibra con polimixina B inmovilizada y hemodiafiltración continua ha conducido a la eliminación de los factores causativos de sepsis ("choque séptico") en un paciente que sufría tuberculosis pulmonar (Takahashi *et al.*, Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg. 9:319-322, 2003). De manera similar, para mejorar la biodisponibilidad de los fármacos peptídicos tras la administración oral, diversas estrategias se encuentran en desarrollo. Entre ellas se incluyen la administración de fármacos en forma de partículas, tales como nanopartículas, microcápsulas, liposomas o emulsiones, la administración mucoadhesiva y la utilización de intensificadores de la penetración (Kompella *et al.*, Adv. Drug Deliv. Rev. 46:211-245, (2001)).

Japelj B. *et al.* (J. Biol. Chem. 280(17):16955-61, 2005) se refiere a un péptido neutralizador de endotoxinas (LF11) que comprende la secuencia de aminoácidos FQWQRNIRKVR-NH₂, derivada de la lactoferrina. Durante el curso de estos estudios se determinó el residuo aminoácido de LF11 que era responsable de la unión a LPS.

De manera comparable a Japelj B. *et al.*, también en Andra J. *et al.* (Biochem. J. 385:135-43, 2005), se ha analizado la interacción del péptido LF11 derivado de la lactoferrina, que se acopló a una cadena de alquilo C12, con LPS.

En Farnaud S. *et al.* (FEMS Microbiol. Lett. 238(1):221-6, 2004) se dan a conocer péptidos antimicrobianos que se han derivado de lactoferrina bovina y humana. Los autores de este trabajo científico examinaron la unión de estos péptidos a LPS.

El documento nº US 2003/0022821 A1 se refiere a péptidos de lactoferrina modificados que comprenden entre 7 y 25 residuos aminoácidos, en los que tres o más de dichos residuos aminoácidos son catiónicos. Los péptidos según el documento nº US 2003/0022821 A1 comprenden además un residuo aminoácido voluminoso y uno lipofílico. El documento nº US 2004/0019181 da a conocer ILPWKKWPWWRWRR, que presenta actividad antimicrobiana + antiendotoxina.

Chen P.W. *et al.* (Am. J. Vet. Res. 64(9):1088-92, 2003) se refiere a análogos de lactoferrina con un elevado contenido de residuos aminoácidos lipofílicos y catiónicos.

Es un objeto de la presente invención proporcionar péptidos que muestran características antimicrobianas y neutralizadoras de endotoxinas.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un péptido con actividad antimicrobiana y neutralizadora de endotoxina, el cual consiste en la fórmula (Xaa1)M-Trp-(Xaa4)p-Arg-(Xaa7)R-(Arg)s, en la que Xaa1 se selecciona de entre el grupo que consiste en prolina (Pro) y fenilalanina (Phe), Xaa4 se selecciona de entre el grupo que consiste en arginina (Arg), triptófano (Trp) e isoleucina (Ile), Xaa7 se selecciona de entre el grupo que consiste en isoleucina (Ile), triptófano (Trp) y fenilalanina (Phe), y en el que M es 1, 2 o 3, R es 1 o 2, P es 1, 2 o 3, y S es 1 o 2.

La presente invención se refiere a péptidos y lipopéptidos aislados tal como se ha definido anteriormente, que muestran actividad antimicrobiana y actividad neutralizadora de endotoxinas.

Estas moléculas muestran un amplio espectro de actividad contra diversos patógenos (incluyendo bacterias, virus, hongos, etc.). El desarrollo de compuestos activos se basa en el análisis SAR y en experimentos biofísicos, microbiológicos, inmunológicos y estructurales con nuevos compuestos peptídicos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "aminoácido" se refiere tanto a los aminoácidos naturales como a sus derivados. Además, también puede utilizarse un mimético de uno o más aminoácidos, conocido de otro modo como péptido mimético o peptidomimético. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "mimético" se refiere a un aminoácido o análogo de aminoácido que presenta características funcionales iguales o similares a las de un aminoácido. Un péptido mimético o peptidomimético es una molécula orgánica que conserva grupos farmacóforos de cadena peptídica similares a los presentes en el péptido correspondiente. La sustitución de aminoácidos por aminoácidos no naturales o peptidomimético tal como se ha indicado anteriormente puede incrementar la actividad global u otras propiedades de un péptido individual basándose en las modificaciones de las funcionalidades de la cadena lateral. Por ejemplo, estos tipos de modificación de los péptidos ejemplificados pueden

mejorar la estabilidad del péptido frente a la degradación enzimática o incrementar la actividad biológica o reducir la inmunogenicidad.

El experto en la materia podrá sintetizar fácilmente los péptidos y lipopéptidos de la presente invención. Son bien conocidos en la técnica procedimientos estándares para la preparación de péptidos sintéticos. Los péptidos de la invención pueden sintetizarse mediante métodos utilizados comúnmente, tales como la protección con t-BOC o FMOC de los grupos alfa-amino. Ambos métodos implican síntesis por etapas, en las que se añade un único aminoácido en cada etapa partiendo del extremo carboxilo-terminal del péptido (ver Coligan *et al.*, Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, 1991, Unidad 9). Los péptidos de la invención también pueden sintetizarse mediante los métodos de síntesis peptídica en fase sólida bien conocidos en la técnica (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149, 1963), y Stewart y Young, Solid Phase Peptides Synthesis, Pierce, Rockford, Ill., 1984). Pueden sintetizarse péptidos utilizando un copoli(estireno-divinilbenzeno) que contiene 0,1 a 1,0 mmoles de aminas/g de polímero. Tras completarse la síntesis química, los péptidos pueden desprotegerse y cortarse del polímero mediante tratamiento con HF líquido-anisol al 10% durante aproximadamente 0,25 a 1 hora a 0°C. Tras la evaporación de los reactivos, se extraen los péptidos del polímero con solución de ácido acético al 1%, que seguidamente se liofiliza, rindiendo el material en bruto. Lo anterior típicamente puede purificarse mediante técnicas tales como la filtración en gel en Sephadex G-15 utilizando ácido acético al 5% como solvente, mediante cromatografía líquida de alta presión y similares. La liofilización de las fracciones apropiadas de la columna rendirá el péptido o derivados del péptido homogéneos, que seguidamente pueden caracterizarse mediante técnicas estándares tales como el análisis de aminoácidos, la cromatografía de capa fina, la cromatografía líquida de alto rendimiento, la espectroscopia de absorción de ultravioletas, la rotación molar y la solubilidad, y evaluarse mediante la degradación de Edman en fase sólida (ver, por ejemplo, Protein Purification, M. P. Deutscher, ed. Methods in Enzymology, vol. 182, Academic Press, 1990). La síntesis automatizada utilizando métodos sintéticos en fase sólida-FMOC puede llevarse a cabo utilizando un sintetizador de péptidos automático (modelo 432A, Applied Biosystems, Inc.).

Los péptidos de la presente invención también pueden sintetizarse utilizando un método microbiano de proteína de fusión en el que se fusiona un péptido portador aniónico con un péptido catiónico. En la patente US nº 5.593.866 se proporciona un método para dicha producción microbiana de péptidos catiónicos que presentan actividad antimicrobiana.

El péptido de la presente invención producido de esta manera puede purificarse mediante métodos de aislamiento/purificación para proteínas conocidos generalmente en el campo de la química de proteínas. Más particularmente, pueden mencionarse, por ejemplo, la extracción, la recristalización, la precipitación con concentración alta de sales utilizando sulfato amónico, sulfato sódico, etc., la centrifugación, la diálisis, la ultrafiltración, la cromatografía de adsorción, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía hidrofóbica, la cromatografía de fase normal, la cromatografía de fase inversa, el método de filtración en gel, la cromatografía de permeación en gel, la cromatografía de afinidad, la electroforesis, la distribución de contracorriente, etc., y combinaciones de las mismas. Resulta más eficaz un método de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa.

El péptido de la presente invención puede formar una sal mediante adición de un ácido. Entre los ejemplos del ácido se incluyen ácidos inorgánicos (tales como ácido trifluoroacético, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y ácido sulfúrico) o ácidos carboxílicos orgánicos (tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido maleico, ácido succínico, ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico y ácido salicílico), azúcares ácidos tales como ácido glucurónico, ácido galacturónico, ácido glucónico, ácido ascórbico, etc., polisacáridos ácidos tales como ácido hialurónico, condroitín-sulfatos, ácido alginico, o ácidos sulfónicos orgánicos (tales como ácido metanosulfónico y ácido p-toluenosulfónico) y similares. De estas sales resulta preferente una sal farmacéuticamente aceptable.

El péptido de la presente invención puede formar una sal con una sustancia básica. Entre los ejemplos de la sal se incluyen, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables seleccionadas de entre sales con bases inorgánicas, tales como sales de metal alcalino (sal de sodio, sal de litio, sal de potasio, etc.), sales de metal alcalino-térreo, sales amónicas y similares, o sales con bases orgánicas, tales como sales de dietanolamina, sales de ciclohexilamina y similares.

El término "aminoácido" utilizado en la presente memoria se refiere a un L-aminoácido. Sin embargo, también pueden utilizarse D-aminoácidos en la preparación de los péptidos según la presente invención.

El término "péptidos", tal como se utiliza en la presente memoria, comprende 2 a 50 residuos aminoácidos. Los "polipéptidos" y "proteínas" comprenden más de 50 residuos aminoácidos.

El término "antimicrobiano", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la actividad biológica de los péptidos de la presente invención, y se refiere a que el péptido presenta la capacidad de matar, alterar la reproducción o incapacitar de otro modo el crecimiento microbiano de manera que el péptido presente una concentración inhibidora mínima ("CIM" determinada en el medio de Mueller-Hinton siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (anteriormente NCCLS)) inferior a 32 µM, preferentemente

inferior a 16 μ M. Entre los microbios que deben inhibirse según la presente invención se incluyen bacterias, hongos, levaduras, etc. Los procedimientos para determinar la CIM de un péptido antimicrobiano son conocidos por el experto en la materia y se describen en, por ejemplo, Powell *et al.* (Molecular Plant-Microbe Interactions 8:792-794, 1995), Wu y Hancock (J. Biol. Chem. 274:29-35, 1999) y Lorian V. ("Antimicrobials in laboratory Medicine", 4a ed., páginas 330 a 396, 1996, Williams y Wilkins, Baltimore, Md). Un ensayo de la CIM permite la determinación de la concentración más baja de péptido que inhibe la multiplicación y crecimiento de microorganismos. Se encuentra contemplado que, para los fines de la presente invención, un péptido es un antimicrobiano en el caso de que presente la CIM anteriormente indicada con respecto a un microorganismo tal como se utiliza en la presente memoria.

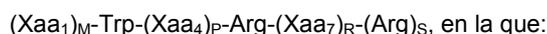
La actividad de "neutralización de endotoxina" y/o ligante de los péptidos de la presente invención puede someterse a ensayo en un ensayo *in vitro* utilizando, por ejemplo, una línea celular de macrófagos (Gough *et al.*, Infect. Immun. 64:4922-4927, 1996).

Los péptidos según la presente invención muestran también actividad antifúngica. Esta actividad ha sido demostrada para varios hongos, por ejemplo *Cryptococcus neoformans*.

La fórmula comprende preferentemente una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en FWRRWRR (SEC ID n° 40), FWRRWIRR (SEC ID n° 41), FWRRFWRR (SEC ID n° 43), FWRWRWR (SEC ID n° 44), FWRIWRWR (SEC ID n° 45), FWRIWRIWR (SEC ID n° 46), PFWRWRIWR (SEC ID n° 50), PFWRIRIRR (SEC ID n° 51), PFWRRRIRR (SEC ID n° 57), PFWRRRWRR (SEC ID n° 58), PFFWRIRIRR (SEC ID n° 60), PWRIRIRR (SEC ID n° 61), FWRWRIWR (SEC ID n° 74), FWRIRIRR (SEC ID n° 75), PWRIRIRR (SEC ID n° 83) y PFWRRIRIRR (SEC ID n° 85).

Tal como se utiliza en la presente invención, las letras minúsculas en las secuencias de aminoácidos se refieren a que dichos residuos aminoácidos específicos son de la configuración D y no de la configuración L (letras mayúsculas).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un péptido con actividad antimicrobiana y neutralizadora de endotoxina que consiste en la fórmula:



Xaa₁ se selecciona de entre el grupo que consiste en prolina (Pro) y fenilalanina (Phe),

Xaa₄ se selecciona de entre el grupo que consiste en arginina (Arg), triptófano (Trp) e isoleucina (Ile),

Xaa₇ se selecciona de entre el grupo que consiste en isoleucina (Ile), triptófano (Trp) y fenilalanina (Phe), y en la que:

M es 1, 2 o 3,
R es 1 o 2,
P es 1, 2 o 3, y
S es 1 o 2.

El extremo N-terminal y/o C-terminal de los péptidos según la presente invención puede presentar modificaciones, tales como la ac(et)ilación, amidaciones, esterificaciones, reducciones, oxidaciones, unión (covalente) de conector, enlaces peptídicos, enlaces disulfuro, etc. Los péptidos pueden modificarse adicionalmente, por ejemplo con carbohidratos, moléculas de conector, lípidos, etc.

El extremo C-terminal de los péptidos según la presente invención consiste preferentemente de un grupo seleccionado de entre el grupo que consiste en grupo carboxilo, grupos amida, en particular que consiste en un grupo N-metilamido, éster, éter o cetona, preferentemente que comprende 1 a 20 átomos de carbono, más preferentemente 1 a 10 átomos de carbono.

Según una forma de realización preferente de la presente invención, se encuentra unido un grupo acilo al extremo N-terminal o C-terminal del péptido.

Con el fin de incrementar la hidrofobicidad de los péptidos según la presente invención y en consecuencia para incrementar la interacción de los péptidos con, por ejemplo, partes hidrofóbicas de las células (por ejemplo la membrana celular), los péptidos preferentemente se modifican con grupos acilo.

El grupo acilo que debe unirse a los péptidos según la presente invención preferentemente es una cadena hidrofóbica seleccionada de entre el grupo que consiste en cadenas acilo C₂-C₂₀ lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas, derivados bencilo y F-moc.

El grupo acilo preferentemente se selecciona de entre el grupo que consiste en grupo dodecanoilo, grupo decanoilo, grupo octanoilo, grupo hexanoilo, grupo 2-metilhexanoilo, grupo 2-etilhexanoilo, grupo 2-propilpentanoilo, grupo 2-butiloctanoilo, grupo 2,2-dimetilbutanoilo, grupo 2-metilpentanoilo, grupo 3-metilpentanoilo, grupo 4-metilpentanoilo, grupo 6-metil-octanoilo, grupo bencilo y grupo dicitohexilacetilo.

- 5 Pueden encontrarse péptidos modificados o no modificados en la Tabla 1. Sólo los péptidos comprendidos en la definición de la reivindicación 1 constituyen péptidos de la invención.

También pueden unirse/fusionarse entre sí diversos péptidos según la presente invención con el fin de formar nuevos péptidos o polipéptidos. Lo mismo se aplica a la utilización de los péptidos según la presente invención como unidades repetitivas con el fin de obtener péptidos o polipéptidos con dos, tres, cuatro, cinco, diez o 20 unidades repetitivas.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un péptido según la presente invención.

10 Dicha composición puede utilizarse para tratar y/o prevenir, por ejemplo, la infección microbiana o el choque séptico. Finalmente, la presente invención se refiere a un péptido o lipopéptido según la presente invención para la utilización en un método de coadministración con otros agentes antimicrobianos o antisépticos en un portador o sustancia inerte farmacéuticamente aceptable con el fin de mejorar la eficiencia de dichos otros agentes antimicrobianos o antisépticos.

15 Según una forma de realización preferente de la presente invención, la composición comprende además por lo menos un agente antimicrobiano o antiséptico adicional.

20 Con el fin de obtener una composición farmacéutica con efectos antimicrobianos y/o neutralizadores de endotoxinas todavía mejores, se añaden agentes adicionales que muestran propiedades similares a los péptidos según la presente invención. Evidentemente también resulta posible añadir agentes con actividades diferentes de los péptidos según la presente invención. Estas sustancias pueden resultar de ayuda para incrementar la biodisponibilidad, tales como, por ejemplo, el incremento de la estabilidad de los péptidos o la administración de los mismos.

25 Entre los ejemplos de agentes particulares que pueden combinarse con los péptidos de la invención se incluyen aminoglucósidos (por ejemplo tobramicina), penicilinas (por ejemplo piperacilina), cefalosporinas (por ejemplo ceftazidima), fluoroquinolonas (por ejemplo ciprofloxacino), carbapenems (por ejemplo imipenem), tetraciclinas y macrólidos (por ejemplo eritromicina y claritromicina). La composición puede incluir además la adición de antibióticos para la terapia de combinación o sinérgica. El antibiótico apropiado administrado típicamente dependerá de la susceptibilidad del microorganismo, tal como de sí, por ejemplo, la bacteria es Gram-negativa o Gram-positiva, y será fácilmente discernible por el experto en la materia. Además de los antibióticos listados anteriormente, entre los antibióticos típicos se incluyen aminoglucósidos (amikacina, gentamicina, canamicina, netilmicina, tobramicina, estreptomina, azitromicina, claritromicina, eritromicina, estolato/etilsuccinato/gluceptato/lactobionato/estearato de eritromicina), beta-lactamos tales como penicilinas, (por ejemplo, penicilina G, penicilina V, meticilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, ampicilina, amoxicilina, ticarcilina, carbenicilina, mezlocilina, azlocilina y piperacilina), o cefalosporinas (por ejemplo cefalotina, cefazolina, cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefuroxima, cefonicid, cefinetazol, cefotetán, cefprozil, loracarbef, cefetamet, cefoperazona, cefotaxima, ceftizoxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima, cefixima, cefpodoxima y cefsulodín). Entre otras clases de antibióticos se incluyen carbapenems (por ejemplo imipenem), monobactams (por ejemplo aztreonam), quinolonas (por ejemplo fleroxacina, ácido nalidixico, norfloxacino, ciprofloxacino, ofloxacina, enoxacina, lomefloxacina y cinoxacina), tetraciclinas (por ejemplo doxiciclina, minociclina, tetraciclina) y glucopeptidos (por ejemplo vancomicina, teicoplanina), por ejemplo. Entre otros antibióticos se incluyen cloranfenicol, clindamicina, trimetoprim, sulfametoxazol, nitrofurantoína, rifampina y mupirocina.

45 La composición según la presente invención preferentemente puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 La composición farmacéutica de la presente invención puede consistir del péptido de la presente invención por sí solo o puede encontrarse en forma de una composición que comprenda el péptido de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable. El portador farmacéuticamente aceptable que puede utilizarse no se encuentra particularmente limitado e incluye un excipiente, un ligante, un lubricante, un colorante, un desintegrante, un tampón, un agente isotónico, un conservante, un anestésico y similares, los cuales pueden utilizarse en un campo médico. Además, puede utilizarse en combinación con otro medicamento antimicrobiano, tal como lisozima, antibióticos, y similares.

55 La composición de la presente invención puede utilizarse para el tratamiento de, por ejemplo, la parte infectada por microorganismos en el exterior del cuerpo o para el tratamiento de la infección microbiana en el interior del cuerpo, y puede seleccionarse un método de administración apropiado para la misma, según el propósito del tratamiento, de entre inyección (subcutánea, intracutánea, intravenosa, intraperitoneal, etc.), gotas oculares, instilación, administración percutánea, administración oral, inhalación, etc.

60 Además, la forma de dosificación, tal como las preparaciones inyectables (soluciones, suspensiones, emulsiones, sólidos que deben disolverse antes del uso, etc.), tabletas, cápsulas, gránulos, polvos, líquidos, inclusiones de liposomas, pomadas, geles, polvos externos, sprays, polvos para inhalar, gotas oculares, pomadas oculares, supositorios, pesarios y similares pueden seleccionarse apropiadamente según el método de administración, y puede formularse de acuerdo con ello el medicamento antimicrobiano de la presente invención.

65

Otro aspecto de la presente invención se refiere al péptido según la presente invención para la utilización como agente antimicrobiano o neutralizador de endotoxinas.

5 Los péptidos dados a conocer en la presente memoria muestran actividades antimicrobianas y/o neutralizadoras de endotoxinas. Por lo tanto, estos péptidos pueden utilizarse convenientemente como agente antimicrobiano o como agente neutralizador de endotoxinas.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere al péptido según la presente invención para la utilización en el tratamiento o la prevención de infecciones causadas por microorganismos, preferentemente por bacterias, o la sepsis o choque séptico causado preferentemente por endotoxinas.

Debido a sus características biológicas, los péptidos de la presente invención se utilizan convenientemente en medicamentos.

15 Según una forma de realización preferente de la presente invención, el medicamento preferentemente puede comprender además por lo menos un agente antimicrobiano o antiséptico adicional.

El medicamento comprende además preferentemente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para inhibir el crecimiento de por lo menos un microorganismo, que comprende la etapa de poner en contacto dicho microorganismo con una cantidad eficaz de un péptido según la presente invención.

25 Los péptidos de la presente invención pueden utilizarse para inhibir el crecimiento de microorganismos. Este efecto puede conseguirse poniendo en contacto dichas moléculas con los microorganismos que deben inhibirse.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" para inhibir el crecimiento de un microorganismo se refiere a la cantidad de péptido que resulta suficiente para reducir la respuesta del sujeto a las LPS y reducir los síntomas de sepsis. Por lo tanto, la expresión "terapéuticamente eficaz" incluye que la cantidad de péptido suficiente para prevenir, y preferentemente reducir por lo menos en 50%, y más preferentemente suficiente para reducir en 90%, un incremento clínicamente significativo del nivel plasmático de TNF. Los intervalos de dosis para la administración de péptido son suficientemente grandes para producir el efecto deseado. Generalmente la dosis variará con la edad, condición, sexo y extensión de la infección por bacterias u otros agentes, tales como los indicados anteriormente, en el paciente y podrá ser determinada por el experto en la materia. La dosis puede ser adaptada por el médico individual en el caso de que se produzcan cualesquiera contraindicaciones. En cualquier caso, la eficacia del tratamiento puede determinarse mediante el seguimiento del nivel de LPS y de TNF en un paciente. Una reducción de los niveles séricos de LPS y TNF debería correlacionarse con la recuperación del paciente.

40 Según una forma de realización preferente de la presente invención, dicho microorganismo es una bacteria Gram-positiva o Gram-negativa.

45 Los péptidos dados a conocer en la presente memoria resultan eficaces, en particular, contra las bacterias. Por lo tanto, el microorganismo preferente con el que deben ponerse en contacto preferentemente son de la familia de las enterobacteriáceas, en particular *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica* o *Klebsiella* spp., preferentemente de la familia de las pseudomonadáceas, en particular *Pseudomonas aeruginosa*, preferentemente de la familia de las alcaligenáceas, en particular *Bordetella bronchiseptica* o *Bordetella pertussis*, preferentemente de la familia de las bruceláceas, en particular *Brucella abortus*, preferentemente de la familia de las moraxeláceas, en particular *Acinetobacter baumannii*, preferentemente de la familia de las xantononadáceas, en particular *Stenotrophomonas maltophilia*, preferentemente de la familia de las pasteureláceas, en particular *Haemophilus influenzae*, preferentemente de la familia de las neisseriáceas, en particular *Neisseria meningitidis*, preferentemente de la familia de las estafilococáceas, en particular *Staphylococcus aureus* o *Staphylococcus epidermidis*, preferentemente de la familia de las enterococáceas, en particular *Enterococcus faecalis*, preferentemente de la familia de las estreptococáceas, en particular *Streptococcus agalactiae* y preferentemente de la familia de las clamidiáceas, en particular *Chlamydia pneumoniae*.

La utilización de los péptidos resulta especialmente adecuada en el caso de que dicho microorganismo muestre resistencia a múltiples fármacos.

60 La resistencia a múltiples fármacos (es decir, la resistencia de microorganismos a varios fármacos, en particular antibióticos) es uno de los mayores problemas de la práctica clínica. Por lo tanto, resulta importante proporcionar nuevos agentes que puedan afectar al crecimiento de los microorganismos.

65 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un péptido o una composición farmacéutica según la presente invención para la utilización en un método para neutralizar la actividad biológica de los componentes bacterianos,

preferentemente de componentes de la pared celular, más preferentemente lipopolisacáridos, de microorganismos mediante la administración de una cantidad eficaz del péptido o de la composición farmacéutica.

5 Los péptidos según la presente invención muestran actividad neutralizadora de endotoxinas. Por lo tanto, estas sustancias pueden utilizarse para la unión a componentes bacterianos, en particular componentes de la pared celular, y en consecuencia para la neutralización de su actividad biológica.

10 Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para neutralizar la actividad biológica de componentes bacterianos, preferentemente de componentes de la pared celular, más preferentemente lipopolisacáridos, de los microorganismos, en el que el método es no terapéutico. Todavía otro aspecto de la invención se refiere a los péptidos o las composiciones farmacéuticas según la presente invención para la utilización en la neutralización de la actividad biológica de componentes bacterianos, preferentemente de componentes de la pared celular, más preferentemente lipopolisacáridos, de los microorganismos.

15 Todavía otro aspecto de la invención se refiere a los péptidos o composiciones farmacéuticas según la presente invención para la utilización en el tratamiento de un mamífero, en particular un individuo humano que sufre una infección microbiana o choque séptico, mediante la administración de una cantidad eficaz de un péptido o de una composición farmacéutica según la presente invención.

20 La cantidad terapéutica y profilácticamente eficaz preferentemente es de entre aproximadamente 0,5 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg, y todavía más preferentemente de entre aproximadamente 2 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg. Para la aplicación dérmica, los compuestos pueden administrarse a una concentración suficientemente elevada para eliminar rápidamente el organismo diana (por lo menos 10 a 100 veces la CIM o 100 a 1.000 µg/ml).
25 Para la aplicación intraperitoneal, el intervalo terapéutico preferentemente es de entre aproximadamente 7,5 mg/kg y aproximadamente 75 mg/kg. En el caso de la coaplicación con antibióticos convencionales, la cantidad terapéuticamente eficaz se reduce en un factor de entre 10 y 100.

30 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar un péptido según la presente invención que presenta un residuo N-terminal de prolina, que comprende las etapas siguientes:

- proporcionar una célula huésped que comprende una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido o proteína de fusión que comprende un péptido según la presente invención que presenta un residuo N-terminal de prolina, en la que el péptido se fusiona C-terminalmente con dicho polipéptido o proteína que presenta un aspartato C-terminal,
- 35 - expresar y aislar dicho polipéptido o proteína de fusión,
- someter el polipéptido o proteína de fusión aislado a un valor de pH de entre 0,5 y 4 (Skribanek Z. *et al.*, J. Pept. Sci. 8:398-406, (2002)).

45 Durante el curso de la reducción del valor de pH, el polipéptido o proteína preferentemente se incuba a 85°C durante una hora en, por ejemplo, HCl 90 mM. Los péptidos resultantes preferentemente se purifican mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (HPLC-RP) y opcionalmente se identifican y se caracterizan mediante análisis espectral de masas.

50 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de adsorción y eliminación o inactivación de bacterias o componentes bacterianas de muestras, que comprende las etapas de poner en contacto dicha muestra con péptido inmovilizado según la presente invención.

El agente antimicrobiano y neutralizador de endotoxinas/ligante de la presente invención puede aplicarse en una superficie de un material adecuado o mezclarse con un material adecuado para producir un material antimicrobiano. Dicho material antimicrobiano puede utilizarse en las diversas formas de una perla, una película, una placa, un monofilamento, un tejido no tejido, una esponja, un paño, un tejido tejido, una fibra corta, un tubo, una fibra hueca, o similar. Más particularmente, puede utilizarse para un órgano artificial, un catéter, una sutura (fibra de unión) para operaciones quirúrgicas, una membrana de diálisis, y similares, así como para productos sanitarios, un filtro antimicrobiano y similares.

60 El dispositivo o implante puede utilizarse como agente eliminador de endotoxinas que comprende el péptido de la presente invención inmovilizado en un portador insoluble. El agente eliminador de endotoxinas de la presente invención se basa en la aplicación de una elevada capacidad de unión a endotoxinas del péptido de la presente invención a la adsorción y eliminación de endotoxinas.

65 La forma del portador insoluble en el que se inmoviliza el péptido de la presente invención no se encuentra particularmente limitado y pueden citarse diversas formas, por ejemplo formas de membrana (tipo filtro, tipo hueco, tipo tubo, tipo membrana plana, etc.), gránulo, látex, chip, polvos y microplaca.

El material del portador insoluble tampoco se encuentra limitado particularmente y pueden citarse diversos materiales, por ejemplo materiales de poliestireno, materiales de polipropileno, materiales de poliamida, materiales de celulosa, materiales de agarosa, materiales de poliacrilamida, materiales de dextrano y materiales de polímero de vinilo.

El método para inmovilizar el péptido de la presente invención en el portador insoluble tampoco se encuentra limitado particularmente y la inmovilización del péptido de la presente invención puede llevarse a cabo mediante la utilización de métodos generales utilizados como método de preparación para enzimas inmovilizados, tales como un método de adsorción física, un método de enlace iónico, un método de enlace covalente y un método de inclusión.

Por ejemplo, en el caso de portadores insolubles realizados en materiales de poliestireno o materiales de polipropileno, el péptido de la presente invención puede inmovilizarse físicamente. Además, por ejemplo, los portadores insolubles realizados en materiales de poliamida, materiales de celulosa, materiales de agarosa, materiales de poliacrilamida, materiales de dextrano o materiales de polímero de vinilo, en los que el péptido de la presente invención puede inmovilizarse químicamente. Como método de inmovilización (unión) química, puede citarse, por ejemplo, un método de diazotización en el que el acoplamiento de diazo se lleva a cabo utilizando un grupo amino aromático en el portador insoluble; un método con CNBr, en el que se forma un enlace peptídico mediante la activación de un grupo hidroxilo en el portador insoluble con CNBr; un método con azida ácida, en el que se forma un enlace peptídico mediante la utilización de un derivado de hidrazina del portador insoluble; un método de alquilación, en el que se alquila un péptido utilizando un grupo funcional reactivo, tal como un halógeno en el portador insoluble; un método de entrecruzamiento, en el que un agente entrecruzante reactivo con un grupo amino libre, tal como glutaraldehído, se entrecruza entre el portador insoluble y el grupo amino libre en el péptido; un método de carbodiimida, un método de activación de epoxi, y métodos en los que se forma un enlace mediante un espaciador utilizando uno de los métodos anteriormente indicados. Puede seleccionarse un método apropiado a partir de dichos métodos conocidos dependiendo del tipo de portador insoluble para la aplicación en el enlace del péptido de la presente invención.

El portador insoluble en el que se insolubiliza el péptido de la presente invención se pone en contacto con una solución en la que se desea la eliminación de la endotoxina, formando un complejo de la endotoxina en la solución y el portador insoluble en el que se inmoviliza el péptido de la presente invención, y después se elimina el complejo formado de esta manera, de manera que puede eliminarse la endotoxina presente en la solución.

El método para poner en contacto el portador insoluble en el que se inmoviliza el péptido de la presente invención con la solución en la que se desea la eliminación de la endotoxina no se encuentra limitado particularmente y pueden utilizarse medios conocidos de puesta en contacto de sólido-líquido. Por ejemplo, un método en el que se pasa una solución a través de un portador insoluble en forma de filtro o en forma de fibra hueca o sobre un portador insoluble en forma de membrana plana; un método en el que se pasa una solución por una columna cargada con un portador insoluble granular; un método en el que se carga una solución en un pocillo en forma de microplaca y se deja la solución en reposo durante un tiempo determinado y después se separa la solución; un método en el que se añade una solución sobre un portador insoluble de cualquier forma y se agita o se deja en reposo durante un tiempo determinado y después pueden utilizarse medios habituales de separación de sólido-líquido (filtración, centrifugación, aspiración, decantación, etc.) con el fin de obtener una solución que se encuentra libre de endotoxinas, o similares.

La solución en la que se desea la eliminación de endotoxinas no se encuentra limitada particularmente y entre los ejemplos de la misma se incluyen soluciones utilizadas en una planta de producción farmacéutica, una instalación médica, y similares, más particularmente líquido dializado, líquido parenteral, sangre, farmacéuticos, agua superpura y similares, aunque sin limitarse a ellos.

Un aspecto de la invención es un compuesto antimicrobiano, es decir, que inhibe, previene o destruye el crecimiento o proliferación de microbios tales como bacterias, hongos o similares. Estos compuestos son péptidos o lipopéptidos de la fórmula general descrita de manera general en la presente memoria.

Otro aspecto de la invención son los péptidos o lipopéptidos de la fórmula general indicada de manera general en la presente memoria para la utilización en un método de tratamiento de endotoxemia mediante la neutralización de la actividad biológica de los componentes bacterianos, preferentemente de paredes celulares, tales como endotoxinas.

Los ejemplos y figuras siguientes se proporcionan a modo de guía para el experto ordinario en la materia y no pretenden limitar el alcance de la invención reivindicada en modo alguno.

La figura 1 muestra la concentración inhibidora mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) de péptidos seleccionados (ver la denominación peptídica) y polimixina (PMB) para dos cepas de *E. coli* y *Shigella sonnei*, tal como se indica en la figura.

La figura 2 muestra la reducción de la concentración inhibidora mínima de la novobiocina tras la adición de cantidades definidas de péptido seleccionado.

5 La figura 3 muestra el efecto de permeabilización de los péptidos seleccionados noapéptido de polimixina B (NPMB) y un péptido no permeabilizador (P3) medido a partir del incremento de la intensidad de fluorescencia debido a la distribución de la N-fenilnaftilamina (NPN) hacia la cubierta celular de *E. coli*. La secuencia de las sustancias listadas en las leyendas en la parte derecha del gráfico corresponden a la secuencia de las curvas en los gráficos en su punto final.

10 La figura 4 muestra la neutralización de la secreción de TNF- α de monocitos estimulados por LPS en presencia de péptidos seleccionados.

La figura 5 muestra la liberación de TNF- α en presencia de diferentes antibióticos, polimixina B (PMB) y péptidos seleccionados (ver la denominación de los péptidos).

15 La figura 6 muestra la actividad hemolítica de péptidos que contienen cadenas de N-acilo. La cantidad de péptidos añadidos a 2,5% de glóbulos rojos humanos se indica en la figura.

20 La figura 7 muestra el cromatograma de la separación mediante HPLC de los productos de corte del péptido recombinante. La fracción con un tiempo de retención de 8,175 minutos contenía el péptido.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de péptidos y lipopéptidos

25 Los péptidos se sintetizaron mediante síntesis simultánea de múltiples péptidos siguiendo los protocolos estándares de síntesis con Fmoc (Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5131-5135, 1985). La resina para cada péptido se compartimentalizó en un paquete de malla de polipropileno, que permitió llevar a cabo todas las etapas sintéticas comunes en un reactor común (es decir, los lavados y las etapas de desprotección y neutralización), mientras que las etapas de acoplamiento deseadas se llevaron a cabo mediante tratamiento de cada paquete con las soluciones apropiadas de aminoácidos separadas. El ácido lipofílico se unió al extremo N-terminal utilizando una estrategia similar a la utilizada al acoplar un aminoácido protegido. Las cadenas laterales de lisina y triptófano se protegieron con un grupo tBoc, arginina con un grupo pentametilbenzofurán-5-sulfonilo, cisteína, glutamina y asparagina con tritilo, ácido aspártico, ácido glutámico, tirosina, serina y treonina con t-butilo. El corte final se llevó a cabo mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (Fields *et al.*, *Int. J. Peptide Prot. Res.* 35:161-214, 1990). La identidad y la pureza de los péptidos se determinaron mediante análisis espectral de masas acoplado a un sistema de cromatografía líquida (Finnigan LCQ) y cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) analítica utilizando un HPLC Beckman System Gold. Los péptidos y lipopéptidos se purificaron mediante RP-HPLC preparativa utilizando una HPLC preparativa Waters Milliprep 300 con un recolector de fracciones Foxy. Se utilizó solución de ácido acético (hasta 95%) o de acetonitrilo (hasta 50%) para solubilizar los lipopéptidos para la purificación.

Ejemplo 2: Ensayos antimicrobianos

45 Se sometió a ensayo cada péptido y lipopéptido para la concentración inhibidora mínima (CIM) contra una lista de bacterias:

50 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* DC2, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, *Acinetobacter baumannii* CUN 10817 - 01, *Pseudomonas aeruginosa*: CUN 4158-02, *Stenotrophomonas maltophilia*: CUN 3998-00, *Brucella abortus* 9.49 per-, *Yersinia pestis* KIM pYV-, *Escherichia coli* CUN 2709-04, *Escherichia coli* CUN 1786-04, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Salmonella minnesota* HL63 (S), *Salmonella minnesota* R60 HL100 (Ra), *Salmonella minnesota* R7 HL44 (Rd1), *Salmonella minnesota* R595 HL111 (Re), *Bordetella bronchiseptica* CUN 11844-99, *Bordetella bronchiseptica*: RB50, *Haemophilus influenzae* CUN 6277-04, *Neisseria meningitidis* CUN 6395-04, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus agalactiae* CUN 4783-03, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Staphylococcus aureus* CUN 3792-99, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus epidermidis* CUN 5-93, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

60 Se inocularon y diluyeron cultivos bacterianos recién cultivados en caldo de Mueller-Hinton (MH) hasta una concentración de ensayo final aproximada de $1-5 \times 10^5$ UFC/ml. Se determinó un recuento viable de la suspensión bacteriana mediante dilución del cultivo con caldo de MH y siembra en placa de 100 μ l de una dilución apropiada de 10 veces sobre una placa de agar MH. Se determinó la CIM tras la incubación durante la noche a 37°C en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos mediante un método de microdilución de caldo siguiendo las directrices de la National Committee for Clinical Laboratory Standard. De esta manera, se mezclaron 100 μ l de suspensión bacteriana con 100 μ l de solución de péptido o lipopéptido en caldo de MH en placas de fondo plano de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 37°C. Se midió antes y después de la incubación la absorbancia a 620 nm de cada pocillo. Se sometieron a ensayo todos los péptidos y lipopéptidos en diluciones en serie de dos veces partiendo de 250 μ g/ml, por duplicado. Se comparó la actividad de los péptidos con las células en caldo de MH (0% de inhibición)

y de caldo de MH solo (100% de inhibición). Se define la CIM como la concentración más baja de péptido o lipopéptido a la que no se produce cambio de DO entre el tiempo 0 y tras la incubación durante la noche. Se utilizaron antibióticos disponibles comercialmente a modo de controles estándares en todos los ensayos.

- 5 Se define la concentración bactericida mínima (CBM) como la concentración más baja del antimicrobiano que eliminó 99,9% del inóculo de partida y se determinó según recomienda la CLSI/NC-CLS. Brevemente, se extrajeron 100 μ l de suspensión de aquellos pocillos en los que el crecimiento era indetectable y se sembraron en placas de MH. Se incubaron las placas a 37°C durante 24 h (fig. 1).

10 **Ejemplo 3: Actividad sinérgica con antibióticos convencionales**

La membrana externa de las bacterias Gram-negativas actúa como barrera de permeabilidad contra los compuestos hidrofóbicos. Para medir la actividad permeabilizadora de los péptidos se utilizaron dos métodos. Ambos ensayos presentan la misma base: una membrana permeabilizada por péptidos permite que las sustancias hidrofóbicas (NPN) accedan a la bicapa lipídica y que la novobiocina alcance su diana interna (ADN girasa). Dichos ensayos se llevaron a cabo en *P. aeruginosa* 4158-02 (CUN) debido a la más baja permeabilidad intrínseca de esta bacteria.

Ensayo de sinergia novobiocina-péptido:

- 20 Se midió la actividad permeabilizadora de los péptidos mediante la comparación de la CIM de cada combinación de péptido-novobiocina con la de la novobiocina sola según un método de titulación de tablero publicado anteriormente (Lorian V., *Antimicrobials in laboratory Medicine*, 4a ed., páginas 330 a 396, 1996, Williams y Wilkins, Baltimore, Md). Con el fin de comparar las actividades permeabilizadoras de los péptidos, se determinaron dos índices: (i) el índice de concentración inhibidora fraccional (CIF) se calculó de acuerdo con la ecuación siguiente: índice CIF=(CIM de combinación ensayada de novobiocina)/(CIM de novobiocina sola) + (CIM de péptido en combinación)/(CIM de péptido solo). Se definió la interacción como sinérgica si el índice CIF era $\leq 0,5$, (b) se definió la caída de CIM como la proporción entre las CIM de novobiocina en ausencia y en presencia de un péptido dado. Se consideró una combinación como sinérgica en el caso de que su caída de CIM fuese ≥ 4 (fig. 2).

30 *Ensayo fluorimétrico:*

Se llevaron a cabo experimentos de fluorescencia tal como han descrito Loh y colaboradores (*Antimicrob. Agents Chemother.* 26:546-551, 1984) con algunas modificaciones. Brevemente, se cultivaron bacterias en caldo LB hasta la fase logarítmica, se lavaron en tampón HEPES 5 mM (pH 7,2) y se resuspendieron en el mismo tampón con 0,1% de glucosa hasta una absorbancia final de 0,5 a $\lambda=600$ nm. Se midió la fluorescencia a 37°C en un fluorímetro (LS-50, Perkin-Elmer) utilizando una longitud de onda de excitación de 350 nm y una longitud de onda de emisión de 420 nm. Se añadió NPN a la suspensión a una concentración final de 10 μ M y posteriormente se añadieron péptidos a una concentración final de 50 μ g/ml (fig. 3).

40 **Ejemplo 4: Neutralización de la secreción de TNF- α de monocitos estimulados por LPS**

Se midió la inhibición de la activación inducida por LPS de células mononucleares humanas por péptidos derivados de la lactoferrina utilizando LPS Ra procedente de la cepa mutante rugosa R60 de *Salmonella enterica* (serovar minnesota). Se incubó el lipopolisacárido con péptidos (columnas blancas, 0,1 μ g/ml; columnas negras, 1 μ g/ml) durante 30 minutos a 37°C y se añadieron a las células recién aisladas de donantes sanos (concentración final: 1 ng/ml de LPS). Se utilizó como control no tratado la cantidad de TNF- α en el sobrenadante de cultivo celular inducida por LPS solo (fig. 4).

50 **Ejemplo 5: Neutralización de la estimulación de las células inmunológicas de bacterias muertas**

Las bacterias pueden eliminarse con diferentes antibióticos, con diana en diferentes moléculas esenciales para la supervivencia bacteriana. Al eliminar las bacterias Gram-negativas, los LPS liberados pueden estimular la producción de citoquinas, tales como TNF- α , u otros mediadores inflamatorios. La comparación de agentes antimicrobianos bien establecidos que actúan a través de diferentes dianas celulares con compuestos de la presente invención se llevó a cabo de la manera siguiente: se cultivaron bacterias (*E. coli* cepa 0:111) en medio LB hasta una absorbancia a 600 nm de 0,4 y se diluyeron 2.500 veces en medio RPMI con adición de glucosa. Se añadieron diferentes concentraciones de antibióticos o péptidos de la presente invención y se incubaron durante la noche. Se añadieron 80 μ l de suspensión celular a 100 μ l que contenían 10^5 células MonoMac6 y tras 15 horas se determinó la liberación de TNF- α al medio utilizando un ensayo ELISA. Los resultados demuestran claramente que el cloranfenicol, la penicilina y la rifampicina, los cuales eliminan las células bacterianas, resultaron en una elevada estimulación de los monocitos, mientras que los péptidos VS1-22 y VS1-53 inhibieron significativamente la liberación de TNF- α , de manera similar al lipopéptido tóxico polimixina B (fig. 5).

60 **Ejemplo 6: Ensayos *in vivo***

Modelo de ratón de endotoxemia aguda para determinar la actividad antiendotóxica de los péptidos

Los ratones son notablemente resistentes al choque séptico mediado por LPS. Sin embargo, la sensibilidad de los ratones a la endotoxina puede potenciarse mediante la coinyección de LPS con galactosamina. Se inyectaron por vía intraperitoneal 200 µl de solución salina libre de pirógenos que contenía una mezcla de 0,3 µg de LPS de *E. coli* y 18 mg de galactosamina en grupos de 16 a 18 hembras de ratones ICR-CD1 de 20 a 25 g de peso. Algunos experimentos previos permitieron determinar que dicha combinación era letal para el 90% (LD₉₀) de los animales 48 h después de la inyección. Inmediatamente después de este reto, los ratones recibieron una segunda inyección intraperitoneal en un sitio diferente del abdomen que contenía 150 µg del péptido disueltos en 150 µl de solución salina libre de pirógenos DMF al 10%. En todos los experimentos se dejó un grupo de ratones sin tratar, mientras que otro grupo recibió 150 µg de polimixina B. Se realizó un seguimiento de la mortalidad de los animales a intervalos diarios hasta las 168 horas después del reto. Bajo las condiciones experimentales de los presentes inventores, la polimixina B no confirió una protección significativa contra el choque endotóxico.

Modelo de conejo para determinar la actividad antiendotóxica de los péptidos:

El principio de actividad de citoquina proinflamatoria inducida por lípido A que conduce a dermonecrosis hemorrágica (reacción clásica de Shwartzmann) se sometió a ensayo en el conejo, un modelo animal muy similar al ser humano en términos de sensibilidad a la actividad de LPS y se comparó con la inhibición de la activación de la cascada enzimática de LAL inducida por lípido A que conduce al coágulo. De esta manera, se inyectó en conejos New Zealand White, en la región dorsal afeitada, lípido A de *S. minnesota* Re595 solo o con péptido 1:100 (p/p) (5 µg en 0,2 ml de tampón de solución salina, vía i.d.). Transcurridas 72 a 96 horas desde la inyección, se observó la dermis de los animales para la presencia de necrosis abierta o la inhibición de la misma. A modo de control se utilizó polimixina B (PmB).

Tabla 4: péptidos de diferentes reivindicaciones que muestran una correlación positiva entre el análisis de ensayo *in vitro* vs. *in vivo*

SEC ID nº (modificación)	Diseño de péptido	Actividad de LAL final ¹ Péptido: LPS Re595 100:1 (p/p)	Reacción de Shwartzmann ² local en de conejo Péptido :LPS Re595 100:1 (p/p)
25	VS1-18	NEGATIVA	NEGATIVA
17	VS1-15	NEGATIVA	NEGATIVA
17 (2,2-DMB ³)	VS1-42	NEGATIVA	NEGATIVA
51	VS1-22	NEGATIVA	NEGATIVA
51 (2,2-DMB)	VS1-52	NEGATIVA	NEGATIVA
75 (ciclo)	VF-50	NEGATIVA	NEGATIVA
77	P2-11	NEGATIVA	NEGATIVA
78	P2-19	NEGATIVA	NEGATIVA
79	P2-18	NEGATIVA	NEGATIVA
12	P1-12	NEGATIVA	NEGATIVA
20	P1-39	NEGATIVA	NEGATIVA
69	P1-63	NEGATIVA	NEGATIVA
-	PmB	NEGATIVA	NEGATIVA

¹Ensayo de Limulus (coagulación de gel): sensibilidad 0,125 EU/ml, correspondiente a 10 pg/ml de LPS de *S. minnesota* Re595; resultados obtenidos con un mínimo de 6 ensayos realizados por triplicado mediante ensayo LAL utilizando soluciones madre preparadas en diferentes días.

²Resultados obtenidos con un mínimo de 3 inyecciones dérmicas del péptido seleccionado en un mínimo de 3 conejos sometidos a ensayo en diferentes experimentos temporales.

³2,2-DMB ... 2,2-dimetilbutanoilo

Ejemplo 7: ensayos de toxicidad contra células de mamífero

Se determinó la actividad hemolítica de los péptidos contra glóbulos rojos, los cuales se obtuvieron de sangre humana heparinizada, mediante la liberación de la hemoglobina tras una incubación de una hora a 37°C. Se consiguió la liberación total de la hemoglobina (absorbancia medida a 414 nm) mediante la adición de Triton X-100 (concentración final: 0,5%). Se muestran los datos para péptidos acilados a concentraciones superiores a su CIM (5 a 50 veces según el péptido y la especie bacteriana) (fig. 6).

Además, se seleccionaron los péptidos que mostraban la actividad permeabilizadora de membranas más elevada y se evaluó su toxicidad para las células HeLa humanas mediante el ensayo de exclusión de pigmento azul tripán

(Mishell B.B. y S.M. Shiigi, Selected methods in cellular immunology, Freeman and Co., San Francisco, 14-17, 1980). Al someterlos a ensayo a 100 µg/ml, todos los péptidos (n=16) mostraron efectos nulos o insignificantes sobre la capacidad de las células de excluir el pigmento.

5 **Ejemplo 8: purificación de los péptidos expresados**

Para purificar las proteínas recombinantes, el pellet de células bacterianas de 1 litro se resuspendió en 20 ml de tampón de lisis (Tris 10 mM, pH=8,0, EDTA 1 mM, DOC al 0,1%) y se dispersó mediante sonicación. La mezcla se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min. a 4°C para separar el sobrenadante soluble y la fracción de pellet insoluble que contenía cuerpos de inclusión. La fracción de cuerpos de inclusión insolubles que contenía la proteína de fusión KSI-P2-33 se lavó dos veces con 20 ml de tampón de lavado, que contenía Tris 10 mM, pH=8,0, EDTA 1 mM y DOC al 0,1%, dos veces con Tris 10 mM, pH=8,0, EDTA 1 mM y urea 2 M y tres veces con Tris 20 mM, pH=8,0. Los cuerpos de inclusión insolubles se disolvieron en 10 ml de HCl-guanidina 6 M, se centrifugaron y el sobrenadante soluble se dializó frente a 2 litros de agua desionizada, causando la precipitación de KSI-P2-33. Las proteínas de fusión (10 mg) se disolvieron en 10 ml de HCl 90 mM; las mezclas se mezclaron durante 2 horas a 85°C para cortar el enlace aspartilo-prolilo entre la proteína de fusión y los péptidos. El péptido liberado mediante corte ácido se purificó mediante HPLC: se secó la mezcla de reacción, se disolvió en agua desionizada y se inyectó en la columna de RP-HPLC C5 (Sephasil) y se eluyó con un gradiente de 5% de acetonitrilo, HCl 5 mM hasta 95% de acetonitrilo, HCl 5 mM. Se detectó el pico de péptido (fig. 7) a partir de la absorbancia de UV a 280 nm. Se determinó la identidad del péptido mediante espectrometría de masas.

Ejemplo 9: ensayos antimicrobianos con péptidos inmovilizados

El péptido P2-32 (500 µg) se unió covalentemente a partículas magnéticas (10 mg) activadas con cloruro cianúrico (Chemicell, número de producto 1314) utilizando solución salina tampón de fosfato, pH=7,5. Tras mezclar la suspensión en un agitador durante 2 horas a temperatura ambiente, se añadió el tampón de bloqueo (PBS, pH=7,5 y etanolamina al 2%) y se mezcló la suspensión en un agitador durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las partículas se lavaron dos veces con PBS. Los péptidos inmovilizados se sometieron a ensayo contra *E. coli* (cepa 0:111) cultivado en medio LB hasta una absorbancia a 600 nm de 0,4 y se diluyeron 2.500 veces en medio LB. Se añadieron diferentes concentraciones de partículas magnéticas inmovilizadas con péptidos y se incubaron durante la noche. Los resultados evitaron el crecimiento bacteriano a las concentraciones de 50, 25 y 10 mg/ml de partículas magnéticas inmovilizadas.

Tabla 5:

Cantidad de partículas magnéticas inmovilizadas añadidas (mg)	Vol (µl) de <i>E. coli</i> diluido en LB	Crecimiento bacteriano
5	100	inhibido
2,5	100	inhibido
1	100	inhibido
0,5	100	no inhibido
0,25	100	no inhibido

Ejemplo 10: actividad antifúngica

Se mantuvieron cultivos de *C. neoformans* ATCC 32045 en placas de agar con medio para levaduras (ML, Difco Laboratories, Detroit, Mich.) a 4°C. Antes del ensayo los cultivos se cultivaron en placas de agar y se incubaron durante 72 h a 26°C. A continuación, se inocularon dos colonias de dichos cultivos fúngicos recién cultivados, en 5 ml de caldo LM 2X, se agitaron con vórtex y se diluyeron 10 veces en caldo LM 2X, para una concentración de ensayo final aproximada de 1x10⁵ a 5x10⁵ UFC/ml. En placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos se añadieron suspensiones fúngicas en caldo LM 2X a los péptidos dispensadas a concentraciones comprendidas entre 1 mg/ml y 1 µg/ml derivadas de diluciones en serie de dos veces en agua estéril. Seguidamente las placas se incubaron durante 72 h a 26°C. Se determinó el porcentaje relativo de crecimiento de los hongos observado para cada muestra de ensayo a partir de la densidad óptica a 620 nm (DO₆₂₀) mediante la utilización de un aparato Titertek Multiskan Plus. Se definió la CIM como la concentración más baja de la muestra de ensayo que resultaba en 2% de crecimiento y se definió la IC₅₀ como la concentración de muestra de ensayo que resultaba en un 50% de inhibición del crecimiento. Se calculó la IC₅₀ mediante la utilización de un programa informático de ajuste a curva sigmoideal (Graphpad Prism, ISI Software, San Diego, CA). Los resultados obtenidos para péptidos seleccionados se muestran en la Tabla 6.

Denominación del péptido	SEC ID nº	Modificación C-terminal	Media	
			IC ₅₀ (µg/ml)	CIM (µg/ml)
VS1-13	4	FWQRNIRIRR-NH2	8	32
VS1-14	80 (SEC ID nº 4)	RRRINRQWF-NH2	12	32

ES 2 532 392 T3

Denominación del péptido	SEC ID nº	Modificación C-terminal	Media		
	retro)				
VS1-15	17		FWQRNIRKWR-NH2	5	16
VS1-16	66		RWKRINRQWF-NH2	13	32
VS1-17	24		FWQRRIRKWR-NH2	5	32
VS1-18	25		FWQRRIRRWRR-NH2	7	32
VS1-19	64		PFWQRNIRKWR-NH2	3	8
VS1-20	47		FWRNIRKWR-NH2	4	16
VS1-21	37		FWRIRKWR-NH2	4	16
VS1-22	51		PFWRIRIRR-NH2	2	8
VS1-23	59		PFWRIRIRRD-NH2	4	8
VS1-24	60		PFFWRIRIRR-NH2	3	8
VS1-25	52		PFWRQIRRR-NH2	6	32
VS1-26	81		PFWRRQIRR-NH2	6	32
VS1-27	53		PFWRARIRR-NH2	8	32
VS1-28	54		PFWRKIRRR-NH2	8	32
VS1-29	55		PFWRKRLRR-NH2	9	32
VS1-30	82		PFWRKKLKR-NH2	10	32
VS1-31	56		PFWRKRWRR-NH2	8	32
VS1-32	57		PFWRRRIRR-NH2	9	32
VS1-33	58		PFWRRRWRR-NH2	9	32
VS1-34	61		PWRIRIRR-NH2	2	8
VS1-35	83		PWRRIRR-NH2	12	32
VS1-36	84		PWRRKIRR-NH2	11	62
VS1-37	85		PFWRRRIRR-NH2	9	32
VS1-39	86		RRWFWRR-OH	6	32
VS1-40	17	Octanoilo	FWQRNIRKWR-NH2	2	8
VS1-41	17	2-etilhexanoilo	FWQRNIRKWR-NH2	4	8
VS1-42	17	2,2-dimetilbutanoilo	FWQRNIRKWR-NH2	6	16
VS1-43	17	6-metiloctanoilo	FWQRNIRKWR-NH2	6	16
VS1-44	17	Diciclohexilacetilo	FWQRNIRKWR-NH2	4	16
VS1-45	66	Octanoilo	RWKRINRQWF-NH2	2	4
VS1-46	66	2-etilhexanoilo	RWKRINRQWF-NH2	4	8
VS1-47	66	2,2-dimetilbutanoilo	RWKRINRQWF-NH2	8	16
VS1-48	66	6-metiloctanoilo	RWKRINRQWF-NH2	2	8
VS1-50	51	Octanoilo	PFWRIRIRR-NH2	6	16
VS1-51	51	2-etilhexanoilo	PFWRIRIRR-NH2	3	8
VS1-52	51	2,2-dimetilbutanoilo	PFWRIRIRR-NH2	2	4
VS1-53	51	6-metiloctanoilo	PFWRIRIRR-NH2	6	16
VS1-55	75	Octanoilo	FWRIRIRR-NH2	4	16
VS1-56	75	2-etilhexanoilo	FWRIRIRR-NH2	3	16
VS1-57	75	2,2-dimetilbutanoilo	FWRIRIRR-NH2	2	4
VS1-58	75	6-metiloctanoilo	FWRIRIRR-NH2	6	16
VS1-60	43	Octanoilo	FWRRFWRR-NH2	10	32
VS1-61	43	2-etilhexanoilo	FWRRFWRR-NH2	6	16
VS1-62	43	2,2-dimetilbutanoilo	FWRRFWRR-NH2	4	16
VS1-63	43	6-metiloctanoilo	FWRRFWRR-NH2	11	62
VS1-49	66	Diciclohexilacetilo	RWKRINRQWF-NH2	2	4
VS1-54	51	Diciclohexilacetilo	PFWRIRIRR-NH2	3	8

ES 2 532 392 T3

Denominación del péptido	SEC ID nº	Modificación C-terminal		Media	
VS1-59	75	(diciclo)-hexilacetilo	FWRIRIRR-NH2	14	62
VS1-64	43	(diciclo)-hexilacetilo	FWRRFWRR-NH2	6	32
VF50	75	ciclo	FWRIRIFRR-NH2	2	8

REIVINDICACIONES

1. Péptido con actividad antimicrobiana y neutralizadora de endotoxinas que consiste en la fórmula:

5 (Xaa₁)_M-Trp-(Xaa₄)_P-Arg-(Xaa₇)_R-(Arg)_S, en la que:

Xaa₁ se selecciona de entre el grupo que consiste en prolina (Pro) y fenilalanina (Phe),

10 Xaa₄ se selecciona de entre el grupo que consiste en arginina (Arg), triptófano (Trp) e isoleucina (Ile),

Xaa₇ se selecciona de entre el grupo que consiste en isoleucina (Ile), triptófano (Trp) y fenilalanina (Phe), y en la que:

15 M es 1, 2 o 3,
R es 1 o 2,
P es 1, 2 o 3, y
S es 1 o 2.

20 2. Péptido según la reivindicación 1, caracterizado por que la fórmula comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en FWRRWRR (SEC ID n° 40), FWRRWIRR (SEC ID n° 41), FWRRFWRR (SEC ID n° 43), FWRWRWR (SEC ID n° 44), FWRIWRWR (SEC ID n° 45), FWRIWRIWR (SEC ID n° 46), PFWRWRIWR (SEC ID n° 50), PFWRIRIRR (SEC ID n° 51), PFWRRRIRR (SEC ID n° 57), PFWRRRWRR (SEC ID n° 58), PFWRIRIRR (SEC ID n° 60), PWRIRIRR (SEC ID n° 61), FWRWRIWR (SEC ID n° 74), FWRIRIRR (SEC ID n° 75), PWRRIRR (SEC ID n° 83) y PFWRRRIRIRR (SEC ID n° 85).

25 3. Péptido según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el extremo C-terminal consiste preferentemente de un grupo seleccionado de entre el grupo que consiste en un grupo N-metilamido o un grupo carboxilo o seleccionado de entre el grupo de las amidas, ésteres, éteres o cetonas, comprendiendo preferentemente entre 1 y 120 átomos de carbono, más preferentemente entre 1 y 10 átomos de carbono, en particular que consiste en un grupo N-metilamido.

30 4. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que un grupo acilo se encuentra unido al extremo N-terminal o C-terminal del péptido.

35 5. Péptido según la reivindicación 4, caracterizado por que el grupo acilo es una cadena hidrofóbica seleccionada de entre el grupo que consiste en cadenas acilo lineales y ramificadas saturadas e insaturadas de C₂-C₂₀, derivados de bencilo y F-moc.

40 6. Péptido según la reivindicación 4 o 5, caracterizado por que el grupo acilo se selecciona de entre el grupo que consiste en grupo dodecanoilo, grupo decanoilo, grupo octanoilo, grupo hexanoilo, grupo 2-metilhexanoilo, grupo 2-etilhexanoilo, grupo 2-propilpentanoilo, grupo 2-butiloctanoilo, grupo 2,2-dimetilbutanoilo, grupo 2-metilpentanoilo, grupo 3-metilpentanoilo, grupo 4-metilpentanoilo, grupo 6-metil-octanoilo, grupo bencilo y grupo diciclohexilacetilo.

45 7. Composición farmacéutica que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Composición según la reivindicación 7, que comprende por lo menos un agente antimicrobiano o antiséptico adicional.

50 9. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su utilización como agente antimicrobiano, neutralizador de endotoxinas o agente antifúngico.

55 10. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su utilización en el tratamiento o la prevención de infecciones causadas por microorganismos, preferentemente por bacterias y/o hongos, o la sepsis o el choque séptico causado preferentemente por endotoxinas.

11. Péptido para su utilización según la reivindicación 10, caracterizado por que el medicamento comprende o se caracteriza además porque se utiliza con por lo menos un agente antimicrobiano o antiséptico adicional.

60 12. Método de inhibición del crecimiento *in vitro* de por lo menos un microorganismo, que comprende la etapa de poner en contacto dicho microorganismo con una cantidad eficaz de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

65 13. Método según la reivindicación 12, caracterizado por que dicho microorganismo es una bacteria Gram-positiva o Gram-negativa.

14. Método para preparar un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que presenta un residuo N-terminal de prolina, que comprende las etapas siguientes:

- 5 - proporcionar una célula huésped que comprende una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido o proteína de fusión que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que presenta un residuo N-terminal de prolina, en el que el péptido se encuentra fusionado en el extremo C-terminal a dicho polipéptido o proteína que presenta un aspartato C-terminal,
- 10 - expresar y aislar dicho polipéptido o proteína de fusión,
- someter el polipéptido o proteína de fusión aislado a un valor de pH de entre 0,5 y 4.

15. Método de adsorción y eliminación o inactivación de bacterias o componentes bacterianos de muestras, que comprende las etapas de poner en contacto dicha muestra con péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 inmovilizado.

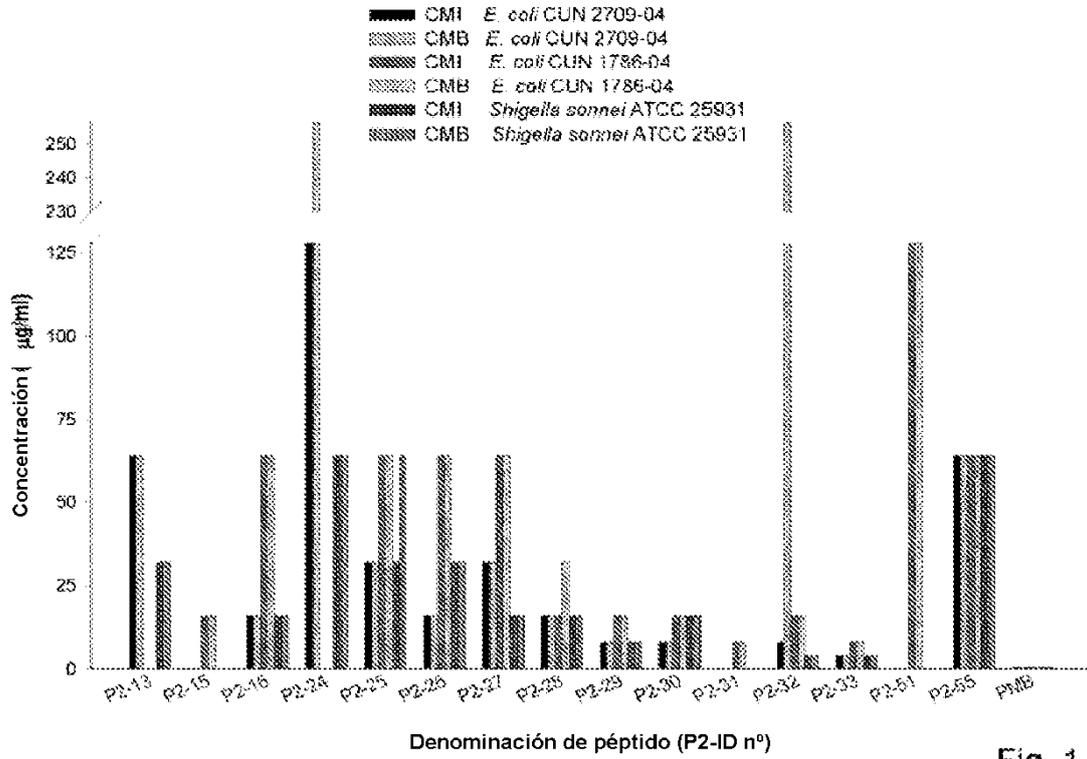


Fig. 1

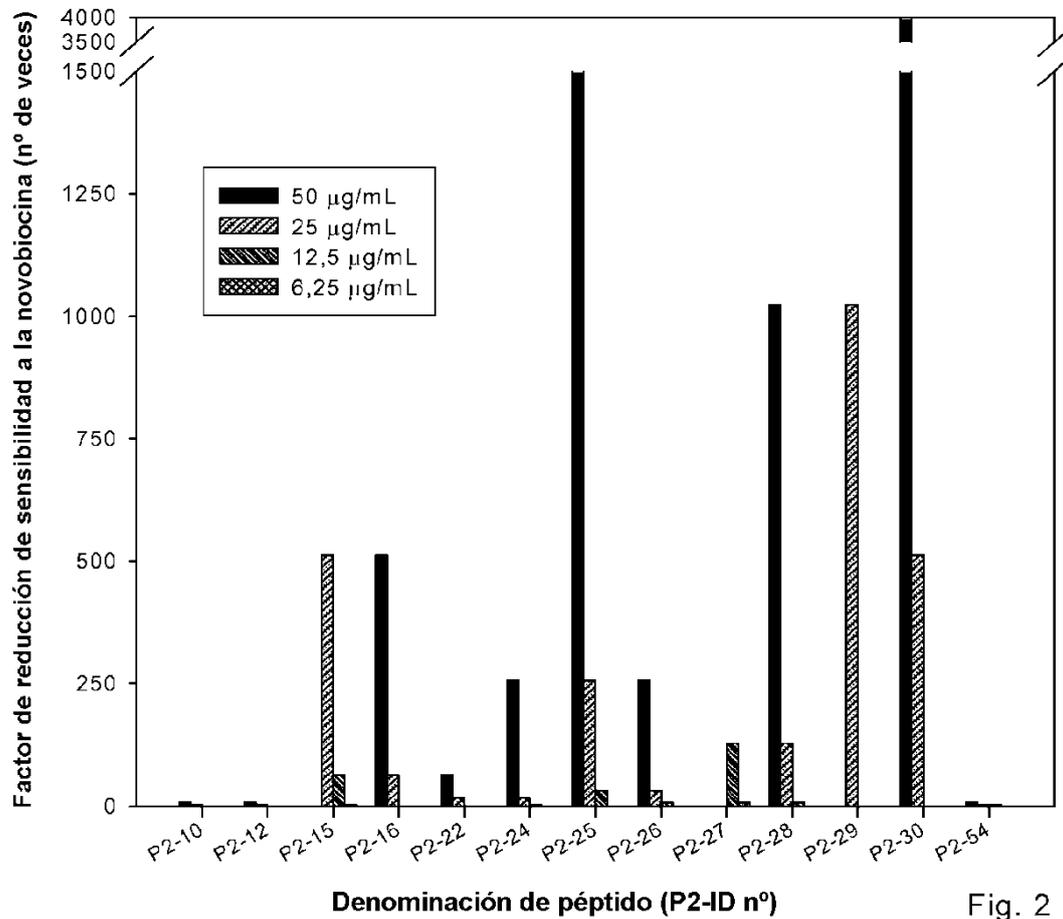


Fig. 2

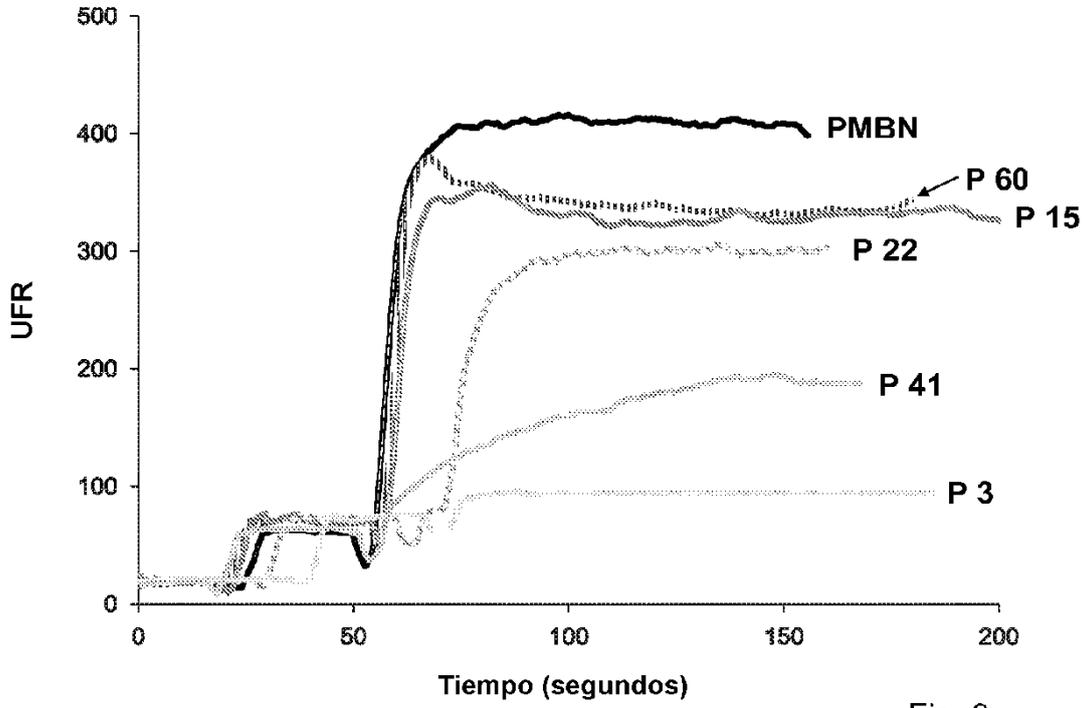


Fig. 3

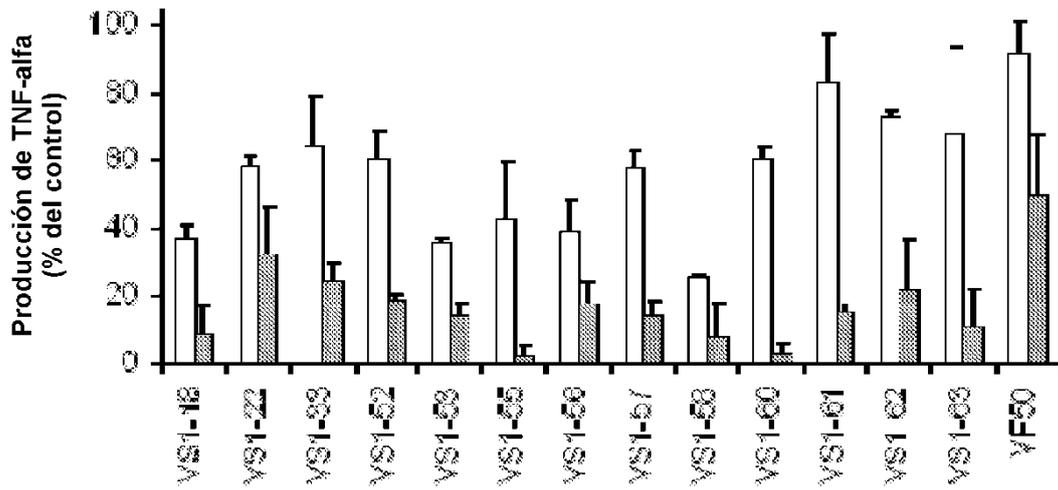


Fig. 4

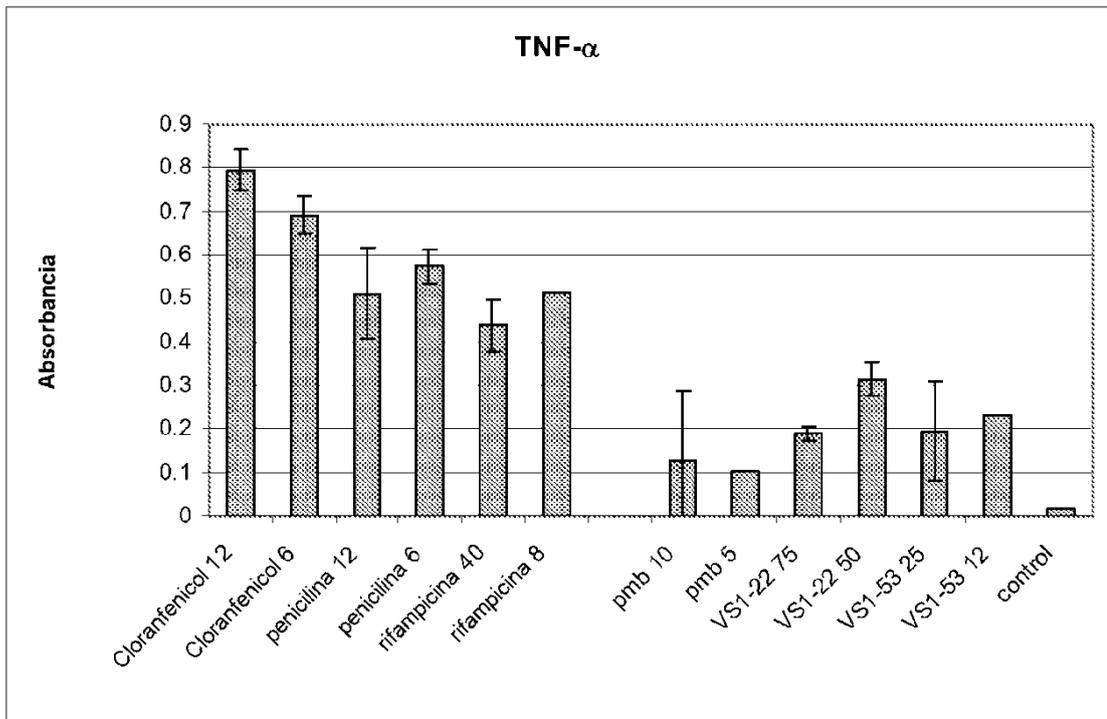


Fig. 5

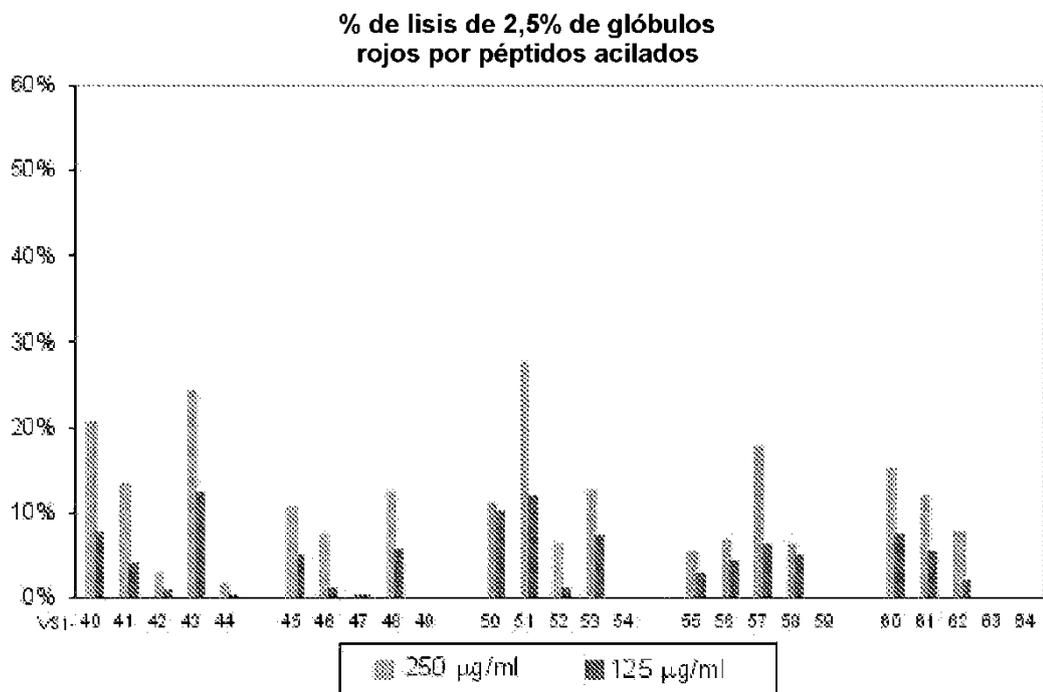


Fig. 6

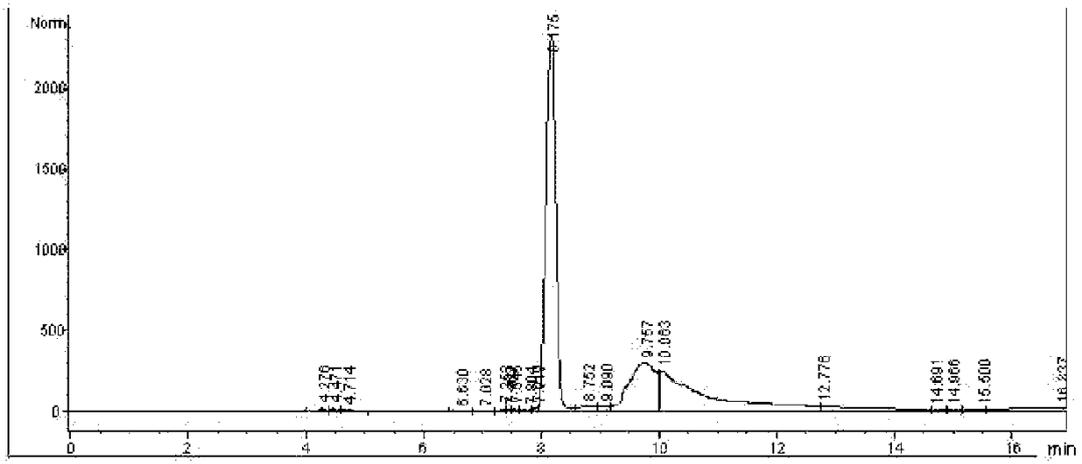


Fig. 7