

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 457**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/08** (2006.01)

**C07K 14/435** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2009 E 09731331 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2271356**

54 Título: **Péptidos antimicrobianos novedosos**

30 Prioridad:

**09.04.2008 EP 08007064**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.05.2015**

73 Titular/es:

**FORSCHUNGSZENTRUM BORSTEL LEIBNIZ-  
ZENTRUM FÜR MEDIZIN UND  
BIOWISSENSCHAFTEN (100.0%)  
Parkallee 1-40  
23845 Borstel, DE**

72 Inventor/es:

**BRANDENBURG, KLAUS**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 535 457 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 novedosos

5 La presente invención se refiere a un péptido de estructura lineal, no cíclica que consiste en o comprende de 17 a 23 aminoácidos, en donde los aminoácidos en posiciones 1 a 23, contados desde el extremo N, son como sigue: (1) G, S o falta; (2) C o falta; (3) K o R; (4) K o R; (5) Y, W o F; (6) K o R; (7) K o R; (8) F, W o L; (9) K o R; (10) K o L o falta; (11) W, L o F; (12) K o R; (13) F, Y o C; (14) K o R; (15) G o Q; (16) K o R; (17) F, L o W; (18) F o W; (19) F, L o W; (20) W o F; (21) C o falta; (22) F o G o falta (23) G o falta. Además, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido de la invención, un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención, una célula huésped que se puede hacer crecer en cultivo celular que comprende el vector de la invención, y un método de producir el péptido de la invención que comprende cultivar la célula huésped de la invención y recoger el péptido producido. Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el péptido de la invención, el péptido producido por el método de la invención, la molécula de ácido nucleico de la invención, el vector de expresión de la invención o la célula huésped de la invención y un kit que comprende el péptido de la invención, el péptido producido por el método de la invención, la molécula de ácido nucleico de la invención, el vector de expresión de la invención o la célula huésped de la invención.

20 Solo en Alemania mueren más de 60000 personas por año de intoxicación bacteriana de la sangre (sepsis). Un nuevo enfoque para combatir esta y otras afecciones ha sido el uso de péptidos antimicrobianos sintéticos (PAM) en base a motivos particulares de proteínas humanas y otras, que se unen a factores de patogenicidad bacterianos tales como lipopolisacárido (LPS). Se sabe que las últimas moléculas son, en un grado considerable, responsables de la inflamación e infección.

25 El enfoque para usar PAM ha ganado algunos intereses en los últimos años. Habitualmente, los PAM se basan en proteínas de defensa de unión a LPS tal como lactoferrina, granulinas y péptidos antimicrobianos catiónicos (PAC) (Andersson et al., 1996, Garidel et al., 2007, Ramamoorthy et al., 2006, Vallespi et al., 2003). La mayoría de estos estudios, sin embargo, se concentraron en destruir las bacterias infecciosas más que en neutralizar el LPS libre. La existencia de LPS aislado, liberado de las bacterias por la acción del sistema inmunitario o simplemente por división celular, es uno de los principales problemas en la lucha antiséptica.

35 Algunos estudios han usado el dominio de unión a LPS de la proteína LALF (Hoess et al., 1993, Paus et al., 2002), y han sintetizado péptidos lineales y cíclicos, con los que fue posible obtener una cierta neutralización de LPS in vitro, pero también in vivo, por ejemplo, en un modelo de ratón de endotoxicidad (Dankestreiter et al., 2000, Garidel et al., 2007, Hoess et al., 1993, Leslie et al., 2006, Mora et al., 2006, Ried et al., 1996, Vallespi et al., 2003). Además, el documento EP0905141 describe la actividad antiviral del péptido derivado de LALF CHYRIKPTFRRLKWKYKGFWC. Se encontró que algunos de estos péptidos tienen una semividua en suero suficiente. Sin embargo, la cuestión de si estos compuestos suprimen la endotoxicidad eficazmente y son adecuados como posibles agentes antisépticos permanece sin respuesta.

40 Se realizaron estudios biofísicos exhaustivos, en los que los se pudieran caracterizar parámetros esenciales importantes para la neutralización de LPS por PAM o péptidos cíclicos particulares basados en NK-lisina porcina o granulina humana (Andrä et al., 2004, Andrä et al., 2007, Andrä et al., 2004, Andrä et al., 2004, Andrä et al., 2007, Chen et al., 2007). Entre estos parámetros están el potencial de superficie del grupo de cabeza de LPS, la fluidez de las cadenas acilo de lípido A, la estructura de agregado de lípido A, y la incorporación en liposomas de fosfolípido en ausencia y presencia de la proteína de unión a LPS LBP.

50 Se encontró que la neutralización de LPS por estos PAM no era lo suficientemente alta para usarlos en experimentos con animales. El problema para obtener compuestos PAM adecuados es un problema grave debido al número extremadamente alto de combinaciones posibles empezando de los 20 aminoácidos proteinogénicos. Un enfoque para desarrollar PAM adecuados debe incluir su capacidad de actuar antimicrobianamente así como de neutralizar LPS. Para esto, es necesario un conocimiento detallado del tamaño, conformación, y estructura de agregado de LPS/lípido A. Algunos de estos parámetros se han determinado en artículos previos (Brandenburg, 1993, Brandenburg et al., 1999, Brandenburg et al., 1990, Brandenburg et al., 1992, Brandenburg et al., 1997, Brandenburg et al., 2000, Brandenburg et al., 2002, Brandenburg et al., 1993, Brandenburg et al., 1998, Brandenburg et al., 1996), para una revisión, véase Brandenburg y Wiese, 2004.

60 Sin embargo, incluso con esta información disponible, todavía hay una necesidad de proporcionar péptidos con excelentes propiedades antimicrobianas.

Según esto la presente invención se refiere a un péptido de estructura lineal, no cíclica que consiste en o comprende de 17 a 23 aminoácidos, en donde los aminoácidos en posiciones 1 a 23, contados desde el extremo N, son como sigue: (1) G, S o falta; (2) C o falta; (3) K o R; (4) K o R; (5) Y, W o F; (6) K o R; (7) K o R; (8) F, W o L; (9) K o R; (10) K o L o falta; (11) W, L o F; (12) K o R; (13) F, Y o C; (14) K o R; (15) G o Q; (16) K o R; (17) F, L o W; (18) F o W; (19) F, L o W; (20) W o F; (21) C o falta; (22) F o G o falta (23) G o falta.

El término "péptido" generalmente describe cadenas moleculares lineales de aminoácidos que contienen hasta 30 aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. Sin embargo, como se ha definido anteriormente, el péptido de la invención consiste en o comprende de 17 a 23 aminoácidos. El número total de aminoácidos comprendidos en el péptido puede aumentar preferiblemente hasta 30 si se añaden uno o más aminoácidos a péptidos de 17 a 23 aminoácidos en sus extremos N y/o C. Dichos aminoácidos pueden o no contribuir a la funcionalidad del péptido. En otras palabras, el/los aminoácido(s) añadido(s) puede(n) o no conferir una función distinta al péptido, sea su actividad antimicrobiana o antivírica u otra función.

El número de aminoácidos puede aumentar además si el péptido de la invención se fusiona a otro péptido o a un polipéptido (véase posteriormente). Los péptidos pueden formar oligómeros que consisten en al menos dos moléculas iguales o diferentes. Las correspondientes estructuras de orden superior de tales multímeros se denominan, correspondientemente, homo- o heterodímeros, homo- o heterotrímeros, etc.

Las abreviaturas del código de una letra como se usan para identificar los aminoácidos a lo largo de la presente invención se corresponden con las comúnmente usadas para aminoácidos.

El péptido de la presente invención se puede producir sintéticamente. La síntesis química de péptidos se conoce bien en la técnica. La síntesis en fase sólida se usa comúnmente y están disponibles varios sintetizadores comerciales, por ejemplo, sintetizadores automatizados por Applied Biosystems Inc., Foster City, CA; Beckman; MultiSyntech, Bochum, Alemania, etc. También se pueden usar métodos sintéticos en fase solución aunque son menos convenientes. Por ejemplo, se puede llevar a cabo la síntesis de péptidos usando N $\alpha$ -9-fluorenilmetoxicarbonil aminoácidos y una resina de tritilo precargada o una resina de poliestireno aminometilada con un enlazador p-carboxitritilalcohol. Los acoplamientos se pueden realizar en dimetilformamida usando N-hidroxibenzotriazol y hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio. Los grupos protectores de cadena lateral comúnmente usados son tert-butilo para D, E e Y; tritilo para N, Q, S y T; 2,2,4,6,7-pentametilhidroxibenzofuran-5-sulfonilo para R; y butoxicarbonilo para K. Después de la síntesis, los péptidos se desprotegen y cortan del soporte polimérico por tratamiento con, por ejemplo, ácido trifluoroacético al 92%/triethylsilano al 4%/H<sub>2</sub>O al 4%. Los péptidos se pueden precipitar mediante la adición éter de tert-butílico/pentano (8:2) y purificar por HPLC de fase reversa. Los péptidos se analizan comúnmente por espectrometría de masa de desorción laser asociada a matriz tiempo de vuelo. Usando estas técnicas estándar, los aminoácidos naturales se pueden sustituir con aminoácidos no naturales, particularmente D-estereoisómeros, y también con aminoácidos con cadenas laterales que tienen diferentes longitudes o funcionalidades. Se pueden introducir grupos funcionales para conjugar a moléculas pequeñas, fracciones marcadoras, péptidos o proteínas, en la molécula durante la síntesis química. Además, se pueden unir moléculas pequeñas y fracciones marcadoras durante el proceso de síntesis. Preferiblemente, la introducción de los grupos funcionales y la conjugación a otras moléculas afecta mínimamente a la estructura y función del péptido objeto.

El extremo N y C del péptido así como cualquier aminoácido comprendido en el péptido aparte de los aminoácidos terminales se puede derivar usando métodos sintéticos químicos convencionales. Los péptidos de la invención pueden contener un grupo acilo, tal como un grupo acetilo. Los métodos para acilar, y específicamente para acetilar el grupo amino libre en el extremo N son bien conocidos en la técnica. Para el extremo C, el grupo carboxilo se puede modificar por esterificación con alcoholes o amidar para formar CONH<sub>2</sub> o CONHR. Los métodos de esterificación y amidación se conocen bien en la técnica.

Además, el péptido de la invención también se puede producir semisintéticamente, por ejemplo mediante una combinación de producción recombinante y sintética. En el caso de que fragmentos del péptido se produzcan sintéticamente, la parte restante del péptido se tendría que producir de otra manera, por ejemplo, de forma recombinantes como se describe posteriormente, y después unir al fragmento para formar el péptido de la invención.

Los presentes inventores han encontrado que péptidos basados en el dominio de unión a LPS de una proteína de unión a LPS animal de *Limulus polyphemus*, el factor anti-LPS de *Limulus* (LALF) ejercen una actividad antimicrobiana alta. Mediante variación óptima de la secuencia de aminoácidos del dominio de LALF original fue posible obtener péptidos que ejercen una actividad neutralizante de LPS muy aumentada por unión a la parte de lípido A de LPS. Además, se encontró sorprendentemente que los péptidos de la presente invención también ejercen actividad antivírica y/o pueden ser aplicables en terapia contra el cáncer.

Como se ha mencionado anteriormente, el péptido de la presente invención ejerce actividad antimicrobiana. En el contexto de la presente invención, actividad antimicrobiana indica la unión a y la inhibición resultante de LPS bacteriano.

LPS es un componente principal de la membrana externa de bacterias Gram negativas, que contribuye mucho a la integridad estructural de las bacterias, y protege la membrana de ciertos tipos de ataque químico. LPS es una endotoxina, e induce una fuerte respuesta de sistemas inmunitarios de animales normales. La única bacteria Gram positiva que posee LPS es *Listeria monocytogenes*, el agente infeccioso común en leche no pasteurizada.

LPS actúa como la endotoxina prototípica, porque se une al complejo receptor CD14/TLR4/MD2, que fomenta la secreción de citoquinas proinflamatorias en muchos tipos celulares, pero especialmente en macrófagos. Una "provocación con LPS" en inmunología es la exposición del sujeto a un LPS que puede actuar como una toxina.

5 LPS también aumenta la carga negativa de la membrana celular y ayuda a estabilizar la estructura de la membrana global. LPS comprende tres partes: cadenas laterales de polisacárido (O), polisacárido nuclear (oligosacárido nuclear en el género *Neisseria*) y lípido A. La cadena lateral de polisacárido se denomina el antígeno O de la bacteria. La cadena lateral O (antígeno O) también es una cadena de polisacárido que se extiende desde el polisacárido nuclear. La composición de la cadena lateral O varía entre diferentes cepas bacterianas Gram negativas. La presencia o ausencia de cadenas O determina si el LPS se considera rugoso o liso. Las cadenas O de longitud completa harían el LPS liso mientras que la ausencia o reducción de cadenas O harían el LPS rugoso. Las bacterias con LPS rugoso habitualmente tienen membranas celulares más penetrables a antibióticos hidrofóbicos ya que un LPS rugoso es más hidrofóbico. Las cadenas laterales O son reconocidas fácilmente por los anticuerpos del huésped, sin embargo, la naturaleza de la cadena puede ser modificada fácilmente por bacterias Gram negativas para evitar la detección. El oligosacárido nuclear contiene azúcares no habituales (por ejemplo, KDO, cetodesoxioctulonato y heptosa). El oligosacárido nuclear está unido al lípido A. El lípido A contiene ácidos grasos no habituales (por ejemplo, ácido hidroximiriístico) y está incluido en la membrana externa mientras que el resto del LPS se proyecta desde la superficie. El lípido A es la fracción bioactiva de LPS responsable para todas las propiedades tóxicas. Según esto, la unión al lípido A es un prerrequisito para la inactivación de LPS como factor de patogenicidad. Además, debido a la carga muy positiva de los PAM de la presente invención, estos también son capaces de destruir bacterias Gram negativas y Gram positivas, porque, en contraste a las células de mamífero, la superficie de las membranas bacterianas tiene una fuerte densidad de carga negativa.

Por tanto, el término "actividad antimicrobiana" se refiere a dicha actividad en bacterias que expresan LPS, es decir bacterias gram negativas. Los métodos de probar péptidos para dicha actividad antimicrobiana se conocen en la técnica y se describen en los ejemplos adjuntos. La evaluación de la actividad antimicrobiana de un péptido se puede hacer determinando su concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) contra una colección de cepas bacterianas Gram negativas. Estas cepas incluyen *E. coli* con beta-lactamasa de espectro extendido (ESBL) (n=2), así como cepas bacterianas bien resistentes a péptidos catiónicos (*Yersinia pestis* (n=1), *Proteus mirabilis* (n=1) y *Brucella abortus* (n=1)) o multirresistentes a antibióticos convencionales (*Shigella sonnei* (n=1), *Klebsiella oxytoca* (n=1), *Acinetobacter baumannii* (n=1), y *Stenotrophomonas maltophilia* (n=1)) *Burkholderia cepacia* (n=1). Además, se puede caracterizar la susceptibilidad de patógenos de mucosa (*Haemophilus influenzae* (n=1), *Neisseria meningitidis* (n=1), *Bordetella bronchiseptica* (n=1)). Se determinarán la CIM y CBM de los péptidos mediante la prueba de microdilución del caldo en medio de Mueller Hinton ajustado a cationes divalentes según las directrices del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI; anteriormente NCCLS) (NCCLS, 2000, *Approved Standard: M7-A5*).

Las concentraciones preferidas del péptido de la presente invención que se van a aplicar para ejercer su actividad antimicrobiana son de 10 a 20 µg/ml.

En el curso de la presente invención, los presentes inventores encontraron que una secuencia de aminoácidos adecuada para neutralizar LPS debe obedecer varios criterios: debe tener una cantidad suficiente de aminoácidos cargados positivamente tal como arginina (R) y lisina (K), algunos aminoácidos hidrofóbicos tal como triptófano (W) y fenilalanina (F), pero también tirosina (Y) y, a un cierto nivel, cisteína (C), y una cadena suficientemente flexible de longitud 'correcta'. Preferiblemente, el número de aminoácidos cargados positivamente varía de 7 a 9. También se prefiere que el número de aminoácidos hidrofóbicos sea 7 u 8. Los aminoácidos restantes son preferiblemente polares.

Los péptidos de la invención preferiblemente tienen una longitud de 17 a 23 aminoácidos para poder unirse eficazmente al dominio de lípido A de LPS pero también pueden comprender aminoácidos adicionales en sus extremos como se ha descrito anteriormente. Consisten en tres regiones o dominios: el N-terminal está predominantemente cargado negativamente, el C-terminal es predominantemente hidrofóbico y la región central está compuesta de aminoácidos que pertenecen a diferentes clases. Hay evidencia experimental de que el N-terminal se une al 1-fosfato de la fracción de lípido A de LPS, la región central se une al 4'-fosfato, mientras que el C-terminal hidrofóbico se inserta en la fracción hidrofóbica del lípido A.

Se realizaron varios experimentos para probar el enfoque usado en la presente invención y los péptidos encontrados.

Se encontró que el acortamiento de la longitud del péptido produjo una disminución de la inhibición de la expresión de citoquinas inducidas por LPS (véase la figura 1). Además, se encontró que la ciclación de péptidos, obtenida por unión S-S a través de residuos de cisteína, produjo una inhibición significativamente reducida de la producción de citoquinas lo que indica una menor actividad. La razón para esto parece estar en las estructuras secundarias de los péptidos. Todos los PAM muy activos tienen una estructura predominante de lámina β, mientras que el compuesto cíclico correspondiente esencialmente se pliega en una hélice α, como se muestra en la evaluación de la vibración de la amida I en experimentos de FITR (figura 2).

La estequiometría de unión del muy activo IPep19-2 se investigó ejemplarmente con calorimetría de titulación isotérmica. El péptido mostró unión muy fuerte a LPS con saturación ya a una proporción molar [LPS]:[IPep19-2] de 3:1 (figura 3).

5 Como un ejemplo adicional de un péptido que se une fuertemente, se muestra la influencia de IPep17-1 en la transición de fase cristalina de gel a líquido de las cadenas hidrocarbonadas de LPS (figura 4). Como se puede ver, las longitudes de onda de la posición del pico de la vibración de tensión simétrica de los grupos metileno aumentan fuertemente a todas las temperaturas. Esto se corresponde a una fluidización drástica de la fracción de la cadena acilo de LPS inducida por el péptido que es comparable a la causada por el 'compuesto de referencia' polimixina B (PMB). Se debe indicar que aunque PMB es un PAM muy bueno y es capaz de suprimir muchas actividades inducidas por LPS, no es adecuado como medicamento sistémico debido a su toxicidad inherente.

15 Como ejemplo de la influencia de los péptidos en las estructuras de agregado de LPS, se muestran los datos de dispersión de rayos X a ángulo bajo para el complejo LPS:Pep19-2 (figura 5). A 20°C los datos son indicativos para la existencia de agregados multilamelares con periodicidades a 9,71, 7,63 y 5,84 nm (las reflexiones a 4,88, 3,84 y 2,94 nm corresponden al segundo orden), a 50°C solo se encuentran dos periodicidades a 6,71 y 5,15 nm. La multilamelarización de LPS, un prerequisite necesario para su inactivación, y los valores de las periodicidades son claramente una prueba para agregados extremadamente densamente empaquetados, lo que explica por tanto la neutralización de LPS.

Además, en medidas de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia con liposomas de fosfatidilserina negativamente cargados marcados, se pudo mostrar que los péptidos antimicrobianos de la invención se incorporan en los liposomas en ausencia así como en presencia de LPS (figura 6).

25 De la figura 7, se puede ver que el daño celular a la línea de células cancerosas PC3 aumenta con concentraciones crecientes de péptido lo que demuestra así la aplicabilidad de los péptidos de la invención en terapia contra el cáncer.

30 Por último, la figura 8 demuestra que los péptidos de la invención ejercen actividad antivírica produciendo una inhibición de la replicación de virus de hasta el 90% en una línea de células T.

En resumen, los presentes inventores inesperadamente encontraron una fórmula para péptidos que tienen actividad antimicrobiana y antivírica, y adecuados para el tratamiento de enfermedades infecciosas o cáncer.

35 En una forma de realización preferida, el péptido consiste en de 17 a 23 aminoácidos.

En otra forma de realización preferida, el péptido consiste en de 17 a 21 aminoácidos, en donde los aminoácidos en las posiciones 1 a 21, contados desde el extremo N, son como sigue (1) G, S o falta; (2) C o falta; (3) K o R; (4) K o R; (5) Y o F; (6) K o R; (7) K o R; (8) F, W o L; (9) K o R; (10) W, L o F; (11) K o R; (12) F, Y o C; (13) K o R; (14) G o Q; (15) K o R; (16) F, L o W; (17) F o W; (18) F, L o W; (19) W o F; (20) C o falta; (21) G o falta.

En otra forma de realización preferida, el péptido de la invención tiene cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos:

45 1Pep17-1: KKFRLKWKYKGFWW  
 1Pep17-2: KKYRRFRWKFGKFWFW  
 1Pep17-3: RRYKKFKWRYRGRFWFW  
 1Pep19-1: GCKKFRLKWKYKGFWWCG  
 50 1Pep19-2: GCKKYRRFRWKFGKFWFWCG  
 1Pep19-3: GCRRYKKFKWRYRGRFWFWCG  
 1Pep19-4: GKKYRRFRWKFGKFWFWG  
 1Pep19-5: GKKYRRFRWFRGRFWFWG  
 1Pep19-6: GCKKFRRFKLKCKQKLWLWCG  
 55 1Pep19-7: GKKYRRFWKFGKWWFWG  
 1Pep19-8: GRRYKKFRWKFKGRFWFWG  
 1Pep19-9: GCRRFKKFRWKYKGFWWCG  
 1Pep19-10: GRRYKKFKWFRGRFWFWG  
 1Pep19-11: GCRRWKKFRWRYRGKFWFWCG  
 60 1Pep19-12: GCRRFKKFKWRYRGRFWFWCG.

Se ha confirmado experimentalmente que estos péptidos ejercen el efecto deseado en el curso de la presente invención y por tanto proporcionan una base ejemplar amplia de la invención reivindicada.

65 En una forma de realización preferida adicional, el péptido de la invención se fusiona a un péptido o polipéptido adicional.

Al fusionar el péptido de la presente invención a un péptido o polipéptido adicional, se forma un péptido o polipéptido de fusión, es decir, una molécula al menos bipartita que comprende el péptido de la invención. El péptido o polipéptido de fusión puede superar la longitud para un péptido como se ha definido anteriormente, es decir, formar una secuencia de aminoácidos de más de 30 aminoácidos que se define como un polipéptido según la presente invención, término que se usa intercambiamente con el término "proteína". Preferiblemente, el péptido adicional no tiene actividad antimicrobiana o antivírica. Alternativamente, el péptido adicional muestra actividad antimicrobiana o antivírica. Por tanto, es concebible según la presente invención que dos péptidos inventivos formen dicho péptido de fusión o polipéptido de fusión. Lo que se excluye mediante el término "péptido de fusión" (o "polipéptido de fusión") es que la secuencia del péptido de la presente invención sencillamente se extienda N- y/o C-terminalmente por uno o unos pocos aminoácidos que no confieren ninguna función distinta.

El péptido o polipéptido de fusión de la presente invención se puede producir y aislar según los métodos descritos en el presente documento para la producción del péptido de la invención.

En una forma de realización más preferida, el péptido adicional es una etiqueta, un péptido señal, un determinante antigénico o un péptido terapéuticamente activo tal como una citoquina. Los polipéptidos adecuados que se pueden fusionar al péptido de la invención son polipéptidos que pueden, por ejemplo, aumentar la solubilidad y/o facilitar la purificación del péptido de la invención.

La etiqueta podría servir para fines de purificación si el péptido se produce por métodos recombinantes. Las etiquetas ejemplares a este respecto son una etiqueta 6xHis, una etiqueta HA o una etiqueta FLAG que como tales se conocen en la técnica. Por otra parte, la etiqueta también se podría usar para dirigir el péptido de la invención a un órgano o tejido en donde las células expresan ciertos antígenos a los que se une la etiqueta. Por tanto, la etiqueta podría, por ejemplo, ser un ligando peptídico para un receptor. Los determinantes antigénicos permiten la purificación de los péptidos de fusión a través de columnas de afinidad de anticuerpo.

Los péptidos señal son cortas secuencias de aminoácidos capaces de dirigir el péptido o proteína a las que se unen a diferentes compartimentos celulares o al espacio extracelular (véase, por ejemplo, Lusk et al., 2007 para péptidos señal que se dirigen al núcleo).

En una forma de realización más preferida adicional, el péptido de la invención se fusiona a dicho péptido o polipéptido adicional a través de un enlazador.

Un enlazador en relación con la presente invención se usa para conectar el péptido de la invención con otros péptidos o con polipéptidos. El enlazador sirve para separar físicamente el péptido de la invención y el otro péptido o polipéptido y asegurar que ni el péptido de la invención ni el/los otro(s) péptido(s) o polipéptido(s) está(n) limitado(s) en su función debido a la estrecha proximidad entre sí. Dependiendo del otro péptido o polipéptido, el enlazador puede ser un enlace peptídico, un aminoácido, un péptido de longitud apropiada, o una molécula diferente que proporciona las características deseadas. El experto en la materia sabe como diseñar moléculas enlazadoras apropiadas, en particular péptidos enlazadores basado en su conocimiento común. Por ejemplo, se pueden elegir enlazadores peptídicos de la base de datos LIP (Loops in Proteins) (Michalsky et al., 2003). Un enlazador se puede añadir al extremo N o al C o, si se juzga adecuado, también a un aminoácido aparte de los aminoácidos terminales del péptido de la presente invención. El enlazador preferiblemente se localiza en el extremo N.

En una forma de realización más preferida, el enlazador es una lisina, glicina, serina, un éter, éster o un disulfuro.

En otra forma de realización, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido o el péptido fusionado (fusionado a otro péptido o un polipéptido) de la invención.

El término "molécula de ácido nucleico" como se usa intercambiamente con el término "polinucleótido", según la presente invención, incluye ADN, tal como ADNc o ADN genómico, y ARN. Se incluyen además moléculas que mimetizan ácidos nucleicos conocidas en la técnica tal como derivados sintéticos o semisintéticos de ADN o ARN y polímeros mixtos. Tales moléculas que mimetizan ácidos nucleicos o derivados de ácidos nucleicos según la invención incluyen ácido fosforotioato nucleico, ácido fosforamidato nucleico, ácido 2'-O-metoxietil ribonucleico, ácido morfolino nucleico, ácido hexitol nucleico (HNA) y ácido nucleico bloqueado (LNA) (véase Braasch y Corey, Chem Biol 2001, 8: 1). LNA es un derivado de ARN en el que el anillo de ribosa está constreñido por un enlace metileno entre el oxígeno 2' y el carbono 4'. Pueden contener bases no naturales o derivadas de nucleótidos adicionales, como apreciarán fácilmente los expertos en la materia.

Para los fines de la presente invención, también se puede aplicar un ácido peptidonucleico (APN). Los ácidos peptidonucleicos tienen un esqueleto compuesto de unidades N-(2-aminoetil)-glicina que se repiten unidas por enlaces peptídicos. Las bases de purina y pirimidina se unen al esqueleto por enlaces metileno carbonilo.

En una forma de realización preferida, la molécula de ácido nucleico es ADN.

El experto en la materia apreciará fácilmente que más de un ácido nucleico puede codificar el péptido de la presente invención debido a la degeneración del código genético. La degeneración se produce porque un código de bases en triplete compuesto de cuatro bases designa cada uno de los 20 aminoácidos proteinogénicos y un codón de terminación. Las posibles  $4^3$  posibilidades para bases en tripletes dan 64 posibles codones, lo que significa que debe existir alguna degeneración. Como resultado, algunos aminoácidos están codificados por más de un triplete, es decir, por hasta seis. La degeneración principalmente surge de alteraciones en la tercera posición en un triplete. Esto significa que moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia diferente, pero que aún codifican el mismo polipéptido están dentro del ámbito de la presente invención.

Además, la invención se refiere a un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención.

Preferiblemente, el vector es un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago u otro vector usado convencionalmente, por ejemplo, en ingeniería genética.

La molécula de ácido nucleico de la presente invención se puede insertar en varios vectores comercialmente disponibles. Los ejemplos no limitantes incluyen vectores plásmidos procariontes, tal como la serie pUC, pBluescript (Stratagene), la serie pET de vectores de expresión (Novagen) o pCARTOPO (Invitrogen), lambda gt11, pJOE, la serie pBBR1-MCS, pJB861, pBSMuL, pBC2, pUCPKS, pTACT1 y vectores compatibles con expresión en células de mamífero como pREP (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMC1neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2neo, pBPV-1, pdBPVMMTneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, pIZD35, el vector de expresión de ADNc de Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen), pSPORT1 (GIBCO BRL), pGEMHE (Promega), pLXIN, pSIR (Clontech), pIRES-EGFP (Clontech), pEAK-10 (Edge Biosystems) pTriEx-Hygro (Novagen) y pCINeo (Promega). Los ejemplos para vectores plásmidos adecuados para *Pichia pastoris* comprenden, por ejemplo, los plásmidos pAO815, pPIC9K y pPIC3.5K (todos de Invitrogen).

La molécula de ácido nucleico de la presente invención referida anteriormente también se puede insertar en vectores de modo que se genere una fusión traduccional con otra molécula de ácido nucleico. Las otras moléculas de ácido nucleico pueden codificar una proteína que puede, por ejemplo, aumentar la solubilidad y/o facilitar la purificación de la proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención. Los ejemplos no limitantes incluyen pET32, pET41, pET43. Además, la otra molécula de ácido nucleico puede codificar un péptido o proteína que permita la compensación de las propiedades tóxicas de los péptidos antimicrobianos de la invención que de otra manera dañarían o destruirían la célula huésped (véase posteriormente).

Los vectores también pueden contener un polinucleótido expresable que codifica una o más chaperonas para facilitar el correcto plegamiento de la proteína. Los huéspedes de expresión bacterianos adecuados comprenden, por ejemplo, cepas derivadas de BL21 (tal como BL21(DE3), BL21(DE3)PlysS, BL21(DE3)RIL, BL21(DE3)PRARE) o Rosetta®.

Para técnicas de modificación de vectores, véase Sambrook y Russel (2001). Generalmente, los vectores pueden contener uno o más orígenes de replicación (ori) y sistemas de herencia para clonación o expresión, uno o más marcadores para la selección en el huésped, por ejemplo, resistencia a antibióticos, y uno o más casetes de expresión. Los orígenes de replicación adecuados incluyen, por ejemplo, los orígenes de replicación Col E1, el vírico SV40 y el M13.

Las secuencias codificantes insertadas en el vector se pueden, por ejemplo, sintetizar por métodos estándar, o aislar de fuentes naturales. La ligación de las secuencias codificantes a los elementos reguladores transcripcionales y/o otras secuencias que codifican aminoácidos se puede llevar a cabo usando métodos establecidos. Los expertos en la materia conocen bien los elementos reguladores transcripcionales (partes de un casete de expresión) que aseguran la expresión en células procariontes o eucariotas. Estos elementos comprenden secuencias reguladoras que aseguran el inicio de la transcripción (por ejemplo, codón de iniciación de la traducción, promotores, potenciadores y/o aisladores), sitios internos de entrada a los ribosomas (IRES) (Owens et al., 2001) y opcionalmente señales de poli-A que aseguran la terminación de la transcripción y estabilización del transcrito. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores transcripcionales así como traduccionales, y/o regiones de promotor asociadas naturalmente o heterólogas. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico de la invención está operativamente unida a tales secuencias de control de la expresión lo que permite la expresión en células procariontes o eucariotas. El vector puede comprender además secuencias de nucleótidos que codifican péptidos señal como elementos reguladores adicionales. Tales secuencias las conoce el experto en la materia. Además, dependiendo del sistema de expresión usado, se pueden añadir secuencias líder capaces de dirigir el polipéptido expresado a un compartimento celular a la secuencia codificante de la molécula de ácido nucleico de la invención. Tales secuencias líder se conocen bien en la técnica. Vectores específicamente diseñados permiten el traslado de ADN entre diferentes huéspedes, tal como bacterias-células fúngicas o bacterias-células animales.

El vector es un vector de expresión.

Un vector de expresión según esta invención es capaz de dirigir la replicación, y la expresión de la molécula de ácido nucleico de la invención y el péptido, péptido de fusión o polipéptido de fusión codificado por la misma. Los vectores de expresión adecuados se han descrito anteriormente.

5 Las moléculas de ácido nucleico de la invención como se han descrito en el presente documento anteriormente se pueden diseñar para la introducción directa o para la introducción a través de liposomas, vectores fagos o vectores víricos (por ejemplo, adenovírico, retrovírico) en la células. Además, se pueden usar sistemas de baculovirus o sistemas basados en virus vaccinia o el virus del bosque Semliki como vector en un sistema de expresión eucariota para las moléculas de ácido nucleico de la invención. Se pueden usar vectores de expresión derivados de virus tal  
10 como retrovirus, virus vaccinia, virus adenoasociados, virus del herpes, o virus del papiloma bovino, para la administración de los polinucleótidos o el vector en una población celular diana. Se pueden usar métodos que conocen bien los expertos en la materia para construir vectores víricos recombinantes; véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook, 2001 y Ausubel, 2001.

15 Un vector de expresión (de mamíferos) típico contiene el elemento promotor, que media el inicio de la transcripción del ARNm, la secuencia codificante de proteína, y señales requeridas para la terminación de la transcripción y opcionalmente la poliadenilación del transcrito. Además, también se pueden incluir elementos tal como origen de replicación, gen de resistencia a fármacos, reguladores (como parte de un promotor inducible). Los elementos adicionales podrían incluir potenciadores, secuencias de Kozak y secuencias intermedias flanqueadas por sitios donantes y aceptores para el ajuste de ARN. Se puede alcanzar la transcripción y/o traducción muy eficaz en  
20 células de mamífero con los promotores temprano y tardío de SV40, las repeticiones terminales largas (LTR) de retrovirus, por ejemplo, RSV, HTLV1, HIV1, y el promotor temprano del citomegalovirus (CMV). Sin embargo, también se pueden usar elementos celulares y otros promotores víricos (por ejemplo, el promotor de actina humana, promotor de beta-actina de pollo, el promotor CAG (una combinación del promotor de beta-actina de pollo y potenciador inmediato-temprano de citomegalovirus), el promotor *gai10*, promotor del factor de elongación 1 $\alpha$  humano, potenciador de CMV, promotor de CaM-quinasa, el promotor poliédrico del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) o un intrón de globina). Los ejemplos para elementos reguladores que permiten la expresión en levaduras son el promotor *AOX1* o *GAL1*. La cotransfección con un gen de marcador seleccionable tal como *dhfr*, *gpt*, *G418*, neomicina o higromicina permite la identificación y aislamiento de las células  
25 transfectadas. El ácido nucleico transfectado también se puede amplificar para expresar grandes cantidades del (poli)péptido codificado. El marcador DHFR (dihidrofolato reductasa) es útil para desarrollar líneas celulares que llevan varios cientos o incluso varios miles de copias del gen de interés. Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintasa (GS) (Murphy et al., 1991; Bebbington et al., 1992). Usando estos marcadores, las células de mamífero se hacen crecer en medio selectivo y se seleccionan las células con la mayor resistencia. Marcadores adecuados al cultivar en *E. coli* y otras bacterias son genes de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina.

Los posibles elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped procariotas comprenden, por ejemplo, el promotor *lac*, *trp* o *tac*, el promotor *lacUV5* o *trp* en *E. coli*.

40 Además de elementos que son responsables para el inicio de la transcripción, los elementos reguladores también pueden comprender señales de terminación de la transcripción, tal como el sitio de poli-A de SV40 o el sitio de poli-A de tk o las señales de poliadenilación de SV40, LacZ y AcMNPV poliédrico, después del polinucleótido.

La invención también se refiere a una célula huésped que comprende el vector de la invención, que se puede hacer  
45 crecer en cultivo celular.

Las células huéspedes procariotas adecuadas comprenden, por ejemplo, bacterias de los géneros *Escherichia*, *Streptomyces*, *Salmonella* o *Bacillus*. Es notable que en caso de que se usen células huéspedes procariotas, el vector de la invención preferiblemente comprende el péptido de fusión o polipéptido de fusión de la invención si el péptido expresado solo fuera tóxico para dichas células procariotas. Esto también es cierto en particular para esas  
50 células huéspedes procariotas que expresan LPS.

Las células huéspedes eucariotas son, por ejemplo, levaduras tal como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*. Las células de insecto adecuadas para expresión son, por ejemplo, células S2 de *Drosophila* y Sf9 de *Spodoptera*.  
55 Para poder expresar el péptido de la invención en cantidades suficientes, preferiblemente el péptido de fusión o el polipéptido de fusión está codificado por el vector de la presente invención si la expresión del péptido de la invención solo fuera tóxica para la célula huésped. Esto lo puede determinar fácilmente el experto en la materia usando métodos biotecnológicos de rutina tal como una expresión de prueba.

60 Las células huéspedes de mamífero que se podrían usar incluyen, células Hela, HEK293, H9 y Jurkat humanas, células NIH3T3 y C127 de ratón, COS 1, COS 7 y CV1, células QC1-3 de codorniz, células L de ratón, células de melanoma de Bowes y células de ovario de hámster chino (CHO). También están dentro del ámbito de la presente invención células primarias de mamífero o líneas celulares. Las células primarias son células que se obtienen directamente de un organismo. Las células primarias adecuadas son, por ejemplo, fibroblastos embrionarios de  
65 ratón (MEF), hepatocitos primarios de ratón, cardiomiocitos y células neuronales así como células madre de músculo de ratón (células satélite) y líneas celulares inmortalizadas, estables derivadas de las mismas. Alternativamente, la

proteína recombinante de la invención se puede expresar en líneas celulares estables que contienen la construcción génica integrada en un cromosoma.

5 Los medios y condiciones de cultivo apropiados para las células huéspedes descritas anteriormente se conocen en la técnica.

Alternativamente, la célula huésped es una célula aislada. Tal célula se ha aislado de un tejido de un organismo multicelular o forma un protozoo. En el caso de células eucariotas, la célula huésped de la presente invención se ha separado del tejido donde normalmente se encuentra. Las células encontradas en cultivo celular, preferiblemente en cultivo celular líquido, son células aisladas según la presente invención.

10 Como se ha mencionado anteriormente, los vectores de la presente invención presentes o expresados en una célula huésped preferiblemente comprenden la molécula de ácido nucleico que codifica el péptido de la presente invención fusionado a una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido o polipéptido capaz de compensar el efecto potencialmente tóxico del péptido de la invención para la célula huésped si el péptido solo fuera tóxico para la célula.

15 En una forma de realización adicional, la invención se refiere a un método de producir el péptido de la invención que comprende cultivar la célula huésped de la invención y recoger el péptido producido.

20 Existe un gran número de métodos adecuados en la técnica para producir péptidos en huéspedes apropiados. Si el huésped es un organismo unicelular tal como un procarionta o una célula de mamífero o insecto, el experto en la materia puede volver a una variedad de condiciones de cultivo. Convenientemente, la proteína producida se recoge del medio de cultivo, lisados de las células cultivadas o de membranas (biológicas) aisladas por técnicas establecidas. Un método preferido implica la síntesis de secuencias de ácido nucleico por PCR y su inserción en un vector de expresión. Posteriormente una célula huésped adecuada se puede transfectar o transformar, etc., con el vector de expresión. Después de ello, la célula huésped se cultiva para producir el péptido deseado, que se aísla y purifica.

30 Los medios y condiciones de cultivo apropiadas para las células huéspedes descritas anteriormente se conocen en la técnica. Por ejemplo, las condiciones adecuadas para cultivar bacterias son hacerlas crecer con aireación en medio Luria Bertani (LB). Para aumentar el rendimiento y la solubilidad del producto de expresión, el medio puede estar tamponado o suplementado con aditivos adecuados que se sabe aumentan o facilitan ambos. *E. coli* se puede cultivar desde 4 hasta aproximadamente 37°C, la temperatura exacta o secuencia de temperaturas depende de la molécula que se va a sobreexpresar. En general, el experto en la materia también sabe que estas condiciones se pueden tener que adaptar a las necesidades del huésped y los requisitos del péptido o proteína expresados. En el caso de un promotor inducible que controla el ácido nucleico de la invención en el vector presente en la célula huésped, la expresión del polipéptido se puede inducir por adición de un agente inductor apropiado. El experto en la materia conoce protocolos y estrategias de expresión adecuados.

40 Dependiendo del tipo celular y sus requisitos específicos, el cultivo de células de mamífero, por ejemplo, se puede llevar a cabo en medio RPMI o DMEM que contiene SFT al 10% (v/v), L-glutamina 2 mM y penicilina/estreptomina 100 U/ml. Las células se pueden mantener a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, saturada con agua.

45 Los medios adecuados para el cultivo de células de insecto son, por ejemplo, TNM + SFT al 10% o medio SF900. Las células de insecto habitualmente se hacen crecer a 27°C como cultivo de adhesión o en suspensión.

El experto en la materia conoce bien protocolos de expresión adecuados para células eucariotas y se pueden recuperar, por ejemplo, de Sambrook, 2001.

50 Como se ha descrito anteriormente, cuando se produce el péptido de la invención en una célula huésped, el vector de expresión preferiblemente codifica un péptido de fusión o polipéptido de fusión si el péptido producido ejerce actividad tóxica hacia la célula huésped seleccionada. Esto también es cierto en particular para bacterias que producen LPS.

55 El péptido de fusión o polipéptido de fusión expresado se tiene que procesar para cortar el péptido o polipéptido compensador pero no deseado fusionado al péptido de la invención. Esto puede tener lugar en cualquier fase del proceso de purificación después de cultivar la célula huésped. Los métodos adecuados para cortar la parte indeseada son bien métodos químicos que usan, por ejemplo, bromuro de cianógeno que corta en residuos de metionina o N-clorosuccinimida que corta en residuos de triptófano. Alternativamente, se pueden usar métodos enzimáticos que en general son más moderados que los métodos químicos. Las proteasa ejemplares adecuadas para el corte son específicas para una cierta secuencia de aminoácidos e incluyen factor Xa o proteasa TEV.

60 Un método alternativo para producir el péptido de la invención es la traducción in vitro de ARNm. Los sistemas de expresión sin células adecuados para su uso según la presente invención incluyen lisado de reticulocitos de conejo, extracto de germen de trigo, membranas microsómicas pancreáticas caninas, extracto S30 de *E. coli*, y sistemas acoplados de transcripción/traducción tal como el sistema TNT (Promega). Estos sistemas permiten la expresión de

péptidos o proteínas recombinantes tras la adición de vectores de clonación, fragmentos de ADN, o secuencias de ARN que contienen regiones codificantes y elementos promotores apropiados.

5 Los métodos de aislamiento del péptido producido se conocen bien en la técnica y comprenden, sin limitación, pasos de método tal como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel (cromatografía de exclusión molecular), cromatografía de afinidad, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), HPLC de fase reversa, electroforesis en gel en disco o inmunoprecipitación (véase, por ejemplo, Sambrook, 2001).

10 Además, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el péptido o el péptido fusionado (es decir, el péptido de la invención fusionado a otro péptido o un polipéptido) de la invención, la molécula de ácido nucleico de la invención, el vector de expresión de la invención o la célula huésped de la invención.

15 Según la presente invención, el término "composición farmacéutica" se refiere a una composición para la administración a un paciente, preferiblemente un paciente humano. La composición farmacéutica de la invención preferiblemente comprende el péptido de la invención. Opcionalmente, puede comprender moléculas adicionales capaces de alterar las características del péptido de la invención mediante las mismas, por ejemplo, estabilizando, modulando y/o activando su función. La composición puede estar forma sólida, líquida o gaseosa y puede estar, entre otras, en forma de (un) polvo(s), (un) comprimido(s), (una) solución(es), o (un) aerosol(es). La composición farmacéutica de la presente invención puede, opcional y adicionalmente, comprender un soporte farmacéuticamente aceptable. Mediante "soporte farmacéuticamente aceptable" se quiere decir un relleno, diluyente, material encapsulante o formulación auxiliar de cualquier tipo no tóxica sólida, semisólida o líquida. Los ejemplos de soportes farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tal como emulsiones aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, solventes orgánicos incluyendo DMSO, etc. Las composiciones que comprenden tales soportes se pueden formular por métodos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto a una dosis adecuada. La pauta de dosis la determinará el médico y los factores clínicos. Como se sabe bien en las artes médicas, las dosis para cualquier paciente depende de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, área de superficie corporal, edad, el compuesto particular que se administra, sexo, tiempo y vía de administración, salud general y otros fármacos que se administran al mismo tiempo. La cantidad terapéuticamente eficaz para una situación determinada se determinará fácilmente por experimentación rutinaria y está dentro de las capacidades y juicio del clínico o médico habitual. Generalmente, la pauta como una administración regular de la composición farmacéutica debe estar en el intervalo de 1 µg a 5 g unidades por día. Sin embargo, un dosis más preferida podría estar en el intervalo de 0,01 mg a 100 mg, incluso más preferiblemente de 0,01 mg a 50 mg y lo más preferiblemente de 0,01 mg a 10 mg por día.

35 La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar, por ejemplo, por vía sistémica, tópica o parenteral. El término "parenteral" como se usa en el presente documento se refiere a modos de administración que incluyen inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intrarticular e infusión.

40 En una forma de realización adicional, la invención se refiere al péptido o péptido fusionado de la invención, la molécula de ácido nucleico, el vector de expresión o la célula huésped de la invención, para tratar enfermedades infecciosas, cáncer o psoriasis.

45 Una enfermedad infecciosa es una enfermedad clínicamente manifiesta resultante de la presencia de agentes microbianos patógenos, incluyendo virus, bacterias, hongos, protozoos, parásitos multicelulares y proteínas anormales conocidas como priones. Estos patógenos son capaces de producir enfermedad en animales y/o plantas.

50 Las patologías infecciosas habitualmente se califican como enfermedades contagiosas (también denominadas enfermedades comunicables) debido a potencialidad de transmisión de una persona o especie a otra. La transmisión de una enfermedad infecciosa se puede producir a través de una o más de diversas rutas incluyendo contacto físico con individuos infectados. Estos agentes infecciosos también se pueden transmitir a través de líquidos, alimentos, líquidos corporales, objetos contaminados, inhalación por aire, o a través de propagación por vectores.

55 Entre las casi infinitas variedades de microorganismos, relativamente pocos causan enfermedad en individuos de otra manera sanos. La enfermedad infecciosa resulta de la interacción entre esos pocos patógenos y las defensas de los huéspedes de infectan. La aparición y gravedad de la enfermedad resultante de cualquier patógeno depende de la capacidad de ese patógeno de dañar el huésped así como de la capacidad del huésped de resistir el patógeno. Los microorganismos, o microbios, infecciosos, por tanto, se clasifican bien como *patógenos primarios* o como *patógenos oportunistas* según el estado de las defensas del huésped.

60 Los patógenos primarios causan enfermedad como resultado de su presencia o actividad en el huésped normal, sano, y su virulencia intrínseca (la gravedad de la enfermedad que causan) es, parte, una consecuencia necesaria de su necesidad de reproducirse y propagarse. Muchos de los patógenos primarios más comunes de seres humanos solo infectan seres humanos, sin embargo, muchas enfermedades graves están causadas por organismos adquiridos del medio ambiente o que infectan huéspedes no humanos.

65

Una forma de demostrar que una enfermedad determinada es “infecciosa”, es satisfacer los postulados de Koch (propuestos primero por Robert Koch), que requiere que el agente infeccioso se identifique solo en pacientes y no en controles sanos, y que los pacientes que contraen el agente también desarrollen la enfermedad. Estos postulados se usaron primero en el descubrimiento de que especies de *Mycobacteria* causan tuberculosis. Los postulados de Koch no se pueden evaluar por razones éticas para muchas enfermedades humanas porque requieren la infección experimental de un individuo sano con un patógeno producido como un cultivo puro. Con frecuencia, incluso enfermedades que son bastante claramente infecciosas no cumplen los criterios infecciosos. Por ejemplo, *Treponema pallidum*, la espiroqueta causante de la sífilis, no se puede cultivar *in vitro* -sin embargo el organismo se puede cultivar en testículos de conejo. Está menos claro que un cultivo puro venga de una fuente animal que sirve como huésped que lo sea cuando deriva de microbios derivados de un cultivo en placa. La epidemiología es otra herramienta importante usada para estudiar enfermedad en una población. Para las enfermedades infecciosas ayuda determinar si un brote de enfermedad es esporádico (aparición ocasional), endémico (casos regulares que con frecuencia se producen en una región), epidémico (un número inhabitualmente alto de casos en una región), o pandémico (una epidemia global).

Cáncer, según la presente invención, se refiere a una clase de enfermedades o trastornos caracterizados por la división incontrolada de células y la capacidad de estas de propagarse, bien por crecimiento directo en tejido adyacente mediante invasión, o por implantación en sitios distantes por metástasis (donde las células cancerosas son transportadas a través del torrente sanguíneo o el sistema linfático). Los cánceres pueden, entre otros, estar causados por patógenos tal como virus, por ejemplo, cáncer cervical causado por HPV.

En una forma de realización más preferida, las enfermedades infecciosas están causadas por infección bacteriana.

Las infecciones bacterianas según la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, meningitis bacteriana, cólera, difteria, listeriosis, tos ferina (coqueluche), neumonía neumocócica, salmonelosis, tétanos, tífus o infecciones del aparato urinario. También se incluyen bacterias resistentes a uno o más antibióticos comúnmente aplicados, por ejemplo *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (SARM).

En una forma de realización más preferida adicional, la enfermedad infecciosa es sepsis.

La sepsis es una afección médica grave caracterizada por un estado inflamatorio del cuerpo entero causado por infección.

La sepsis se define en general como la presencia de varios organismos patógenos, o sus toxinas, en la sangre o tejidos. Mientras que el término sepsis se usa frecuentemente para referirse a la septicemia (intoxicación sanguínea), la septicemia es solo un tipo de sepsis. Bacteriemia se refiere específicamente a la presencia de bacterias en el torrente sanguíneo (viremia y fungemia son términos análogos para virus y hongos).

Además de los síntomas relacionados a la infección provocadora, la sepsis se caracteriza por evidencia de inflamación aguda presente a lo largo del cuerpo entero, y por tanto frecuentemente se asocia con fiebre y recuento elevado de glóbulos blancos (leucocitosis). El concepto moderno de sepsis es que la respuesta inmunitaria del huésped a la infección causa la mayoría de los síntomas de la sepsis, produciendo consecuencias hemodinámicas y daño a órganos. Esta respuesta del huésped se ha denominado síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) y se caracteriza por compromiso hemodinámico y alteración metabólica resultante.

Esta respuesta inmunológica produce la activación extendida de proteínas de fase aguda, que afecta al sistema del complemento y las rutas de coagulación, que después produce daño a la vasculatura así como a los órganos. Varios sistemas contrarreguladores neuroendocrinos se activan también después, con frecuencia agravando el problema. Incluso con tratamientos inmediatos y agresivos, esto puede evolucionar a síndrome de disfunción orgánica múltiple y finalmente la muerte.

En otra forma de realización más preferida, las enfermedades infecciosas están producidas por infección vírica.

Las infecciones víricas según la presente invención incluyen las causadas por retrovirus tal como alfa-, beta-, gamma- y delta-retrovirus (por ejemplo, el virus linfotrópico T humano), espumavirus, lentivirus (por ejemplo, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)), virus del papiloma tal como HPV, virus de la hepatitis B y C y virus herpes tal como el virus de Epstein-Barr.

Además, la presente invención se refiere a un kit que comprende el péptido de la invención, la molécula de ácido nucleico de la invención, el vector de expresión de la invención o la célula huésped de la invención.

Los varios componentes del kit pueden estar embalados en uno o más envases tal como uno o más viales. Los viales pueden, además de los componentes, comprender conservantes o tampones para el almacenamiento.

Las figuras muestran:

Figura 1:

Comparación de los péptidos lineales Pep12, 17-1 y 19-1 para inhibir la expresión de citoquinas inducida por LPS en células mononucleares humanas. El IPep19-1 inhibe lo más fuertemente la producción de citoquinas inducida por LPS.

5

Figura 2:

La comparación de péptidos cíclicos y lineales muestra diferentes estructuras secundarias, obtenidas a través de evaluación de la banda I de amida del péptido.

Figura 3:

Unión de IPep19-2 a LPS medida por calorimetría de titulación isotérmica.

Figura 4:

Transición de fase cristalina gel a líquida de las cadenas hidrocarbonadas de LPS en presencia de IPep19-2 (figura 4 A), e IPep17-1 (figura 4 B) de experimentos de FTIR.

15

Figura 5:

Patrones de dispersión de rayos X a ángulo bajo (SAXS) de mezclas LPS Ra:Pep19-2 a 20 y 50°C.

Figura 6:

Experimentos de FRET de liposomas de PS marcados que muestran la intercalación del péptido y péptido+LPS en los liposomas.

Figura 7:

Acción de algunos péptidos contra células tumorales (PC3 = células de carcinoma de próstata) como la salida de LDH (lactodeshidrogenasa).

25

Figura 8:

Acción anti-VIH de los PAM Pep19-2, -4, 6, y 8 a concentraciones de péptido de 1, 5, 10 y 20 µg/ml. El % de inhibición de la replicación del virus en una línea de células T se representa frente a la concentración de péptido que muestra una inhibición del 99% para los péptidos Pep19-5 y 19-8 a 20 µg/ml.

30

Los ejemplos ilustran la invención:

35 Ejemplo 1: Síntesis de péptidos

Se sintetizaron péptidos lineales con las secuencias descritas anteriormente con un extremo C amidado mediante la técnica de síntesis de péptidos en fase sólida en un sintetizador de péptidos automático en la resina Fmoc-amida estándar según el protocolo de síntesis fastmoc del fabricante. El grupo Fmoc N-terminal se eliminó del péptido-resina y el péptido se desprotegió y cortó con ácido trifluoroacético (TFA) al 90%, anisol al 5%, tioanisol al 2%, ditiotreitil al 3% durante 3 horas a temperatura ambiente. Después del corte la suspensión se filtró y los péptidos solubles se precipitaron con éter dietílico helado seguido por centrifugación y lavado extenso con éter. Los péptidos se purificaron por RP-HPLC usando una columna Aqua C18 (Phenomenex). La elución se hizo usando un gradiente del 0-70% de acetonitrilo en (TFA) al 0,1%. Los péptidos se purificaron de nuevo por HPLC de fase reversa a purezas por encima del 95%. La pureza se determinó por espectrometría de masas de desorción laser asistida por matriz tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS, Bruker).

40

45

Ejemplo 2: Secreción de citoquinas de células mononucleares humanas

Células mononucleares humanas (CMN): se mezcló sangre heparinizada (20 UI/ml) obtenida de donantes sanos con un volumen igual de solución equilibrada de Hank, se colocó sobre Ficoll, y se centrifugó durante 40 minutos (21°C, 500 g). La interfase de CMN se recogió y lavó dos veces en medio de Hank y después se resuspendió en RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomocina 100 µg/ml. Las CMN (200 µl/pocillo; 5x10<sup>6</sup> células/ml) se transfirieron a placas de cultivo de 96 pocillos. Se añadieron veinte microlitros de una mezcla que contenía LPS (100 ng/ml o 10 ng/ml) y Gra-pep (10:1, exceso de % en peso) a cada pocillo. Los sobrenadantes se recogieron después de 4 horas de incubación a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%, y se midió la producción de TNFα en un ELISA sándwich. TNFα se determinó en duplicado a dos diluciones diferentes y se hizo la media de los valores de dos experimentos independientes.

55

60 Ejemplo 3: Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

Para las medidas de espectroscopía de infrarrojos, las muestras de lípidos se colocaron en una cubeta de CaF<sub>2</sub> con un espaciador de teflón 12,5 µM. Se realizaron barridos de temperatura automáticamente entre 10 y 70°C con una velocidad de calentamiento de 0,6°C/min. Cada 3°C, se acumularon 50 interferogramas, se apodizaron, se hizo la transformada de Fourier, y se convirtieron a espectros de absorbancia. Para bandas de absorción fuertes, los parámetros de banda (posición del pico, ancho de la banda e intensidad) se evaluaron a partir de los espectros

65

originales, o después de restar las bandas de agua fuertes si era necesario. La banda vibracional principal usada para el análisis es la vibración de tensión simétrica de los grupos metileno  $\nu_s(\text{CH}_2)$  localizada aproximadamente a  $2850 \text{ cm}^{-1}$ , una medida de orden de las cadenas de lípido A. Para la determinación de las estructuras secundarias de los péptidos, se usó la banda vibracional de amida I en el intervalo de  $1700$  a  $1600 \text{ cm}^{-1}$ .

5

#### Ejemplo 4: Calorimetría de titulación isotérmica (CTI)

Se realizaron medidas micocalorimétricas de la unión de péptidos a las endotoxinas en un calorímetro de titulación isotérmico MCS a  $37^\circ\text{C}$ . Brevemente, después de desgasificación completa de las suspensiones por ultrasonificación, se dispensaron  $1,5 \text{ ml}$  de muestras de endotoxina ( $0,05 \text{ mM}$ ) en la célula microcalorimétrica, y  $100 \mu\text{l}$  de soluciones de péptidos ( $2 \text{ mM}$ ) se cargaron en el compartimento de jeringa. Después de equilibrar la temperatura, los péptidos ( $3 \mu\text{l}$ ) se titularon cada  $5$  minutos en la célula que contenía lípido con agitación constante. El calor de interacción medido por el instrumento de CTI después de cada inyección se representó frente al tiempo. Las curvas de titulación se repitieron tres veces.

15

#### Ejemplo 5: Difracción de rayos X a ángulo bajo

Las medidas de difracción de rayos X se realizaron en la dependencia del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) en la instalación de radiación del sincrotrón de Hamburgo HASYLAB usando la cámara de SAXS X33. Se registraron patrones de difracción en el intervalo de vector de dispersión  $0,1 < s < 1,0 \text{ nm}^{-1}$  ( $s = 2 \sin \theta/\lambda$ , ángulo de dispersión  $2\theta$  y  $\lambda$  la longitud de onda =  $0,15 \text{ nm}$ ) a  $40^\circ\text{C}$  con tiempos de exposición de  $1$  minuto usando un detector de placa de imágenes con lectura en línea (MAR345, MarResearch, Norderstedt/Alemania). El eje  $s$  se calibró con behenato de Ag, que tiene una periodicidad de  $58,4 \text{ nm}$ . Los patrones de difracción se pueden evaluar asignando las razones de espaciamiento del máximo de dispersión principal a estructuras dimensionales definidas. Las estructuras lamelar y cúbica son las más relevantes aquí. Se caracterizan por las siguientes características:

25

(1) Lamelar: Las reflexiones se agrupan en razones equidistantes, es decir,  $1, 1/2, 1/3, 1/4, \text{ etc.}$ , de la distancia de repetición lamelar  $d_l$ ;

(2) Cúbica: Los diferentes grupos de espacio de estas estructuras tridimensionales no lamelares se diferencian en la razón de sus espaciamientos. La relación entre el espaciamiento recíproco  $s_{hkl} = 1/d_{hkl}$  y la constante de red  $a$  es  $s_{hkl} = [(h^2 + k^2 + l^2)/a^2]^{1/2}$  ( $hkl$  = índices de Miller del correspondiente conjunto de plano).

La figura 5 representa los patrones de dispersión de rayos X a ángulo bajo (SAXS) de mezclas LPS Ra:Pep19-2 a  $20$  y  $50^\circ\text{C}$ . Los patrones de dispersión de rayos X a ángulo bajo obtenidos son característicos para la existencia de estructuras de agregados multilamelares de LPS, que se ve de la aparición de reflexiones que están a razones equidistantes. Por tanto, a  $20^\circ\text{C}$  se produce una periodicidad a  $9,71$  con la reflexión de segundo orden a  $4,88 \text{ nm}$ , otra periodicidad a  $7,63$  con la reflexión de segundo orden a  $3,84 \text{ nm}$  y la periodicidad principal a  $5,84 \text{ nm}$  con dos reflexiones de orden superior a  $2,94$  y  $1,96 \text{ nm}$ . La primera periodicidad corresponde a una periodicidad casi sin afectar de LPS R60 puro, mientras que las dos periodicidades adicionales con valores menores son indicativas de pilas lamelares fuertemente comprimidas, de las que la bioactividad fuertemente reducida de LPS se hace inteligible.

40

A  $50^\circ\text{C}$ , la periodicidad del LPS sin perturbar desaparece, y solo permanecen las dos pilas multilamelares con lamelas comprimidas.

45

#### Ejemplo 6: Espectroscopía de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET)

La intercalación de los péptidos y de LPS Re en liposomas se determinó por espectroscopía FRET aplicada como un ensayo de dilución de sonda. Los liposomas se marcaron con el colorante donante NBD-fosfatidiletanolamina (NBD-PE) y el colorante aceptor rodamina-PE. A continuación, se añadieron los lípidos seguidos por los péptidos (o viceversa) a liposomas a una concentración final de  $1 \mu\text{M}$ . La intercalación se siguió como el aumento de la razón de intensidad de donante ID a  $531 \text{ nm}$  respecto a esa de la intensidad del aceptor IA a  $593 \text{ nm}$  (señal FRET) de una manera dependiente del tiempo.

55

#### Ejemplo 7: Actividad antibacteriana de los péptidos

La actividad antibacteriana de los péptidos se determinó por ensayos de susceptibilidad de microdilución realizados en caldo de Mueller-Hinton. El ensayo de susceptibilidad se realizó según las recomendaciones del Clinical Standards Institute (CLSI, anteriormente NCCLS) [Standards, 2000]. Los péptidos ( $2 \text{ mg/ml}$  en HEPES  $4 \text{ mM}$ , pH  $7,2$ ) se diluyeron dos veces en caldo de Mueller-Hinton en placas de microtitulación de  $96$  pocillos para obtener concentraciones de  $512$  a  $0,25 \mu\text{g/ml}$  en un volumen de  $100 \mu\text{l}$ . Las bacterias se cultivaron en placas de agar Mueller-Hinton durante de  $1$  a  $3$  días dependiendo de la velocidad de crecimiento de las bacterias, se resuspendieron en  $2 \text{ ml}$  de solución salina al  $0,9\%$  y se ajustaron a  $10^8 \text{ UFC/ml}$ . La suspensión bacteriana se diluyó  $100$  veces en caldo de Mueller-Hinton, y se añadieron  $0,1 \text{ ml}$  de esta nueva dilución ( $10^5 \text{ UFC}$ ) a las diluciones de los péptidos. Las placas de microtitulación se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante  $24$  horas. La concentración inhibitoria mínima

65

(CIM) de cada péptido contra una cepa bacteriana determinada se consideró como la concentración mínima del péptido que previene el crecimiento de ese organismo 24 horas después de la inoculación. Se determinó el efecto bactericida de los péptidos, después de 24 horas de incubación a 37°C, sembrando 10 µl del contenido de pocillos no turbios en placas de agar Mueller-Hinton. Las placas se incubaron a 37°C durante de 1 a 5 días, y se realizó un recuento viable. La concentración bactericida mínima (CBM) de cada péptido para una cepa bacteriana determinada se consideró como la concentración mínima del péptido que destruye el 99,9% de las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en el inóculo final.

Ejemplo 8: Modelo animal de endotoxicidad

Se obtuvieron LPS de tipo salvaje de *E. coli* ATCC 35218 y *P. aeruginosa* PAO1 de la fase acuosa de un extracto de agua-fenol y se purificaron por tratamiento con agentes caotrópicos y detergentes.

Se distribuyeron al azar ratones ICR (CD-1) hembras que pesaban 20-23 g en grupos experimentales (n=16). Se indujo choque endotóxico en los animales por coinoculación de LPS y galactosamina según el método de Galanos et al. Específicamente, cada animal recibió una inyección intraperitoneal que contenía una mezcla de 0,3 µg de LPS y 18 mg de galactosamina resuspendida en 200 µl de solución salina sin endotoxina.

Inmediatamente después de la administración de LPS, los animales se inocularon por vía intraperitoneal con 150 µg del péptido de prueba resuspendido en 150 µl de solución salina sin pirógeno que contenía dimetilformamida al 10% como agente solubilizante. Para facilitar la acción terapéutica del péptido, los ratones tratados así se masajearon suavemente en el sitio de inoculación durante unos segundos. Se siguió la mortalidad animal a las 6 horas y a las 12 horas después de la inoculación y a intervalos diarios durante 5 días.

En cada experimento independiente un grupo de animales recibió 150 µl de solución salina sin pirógeno que contenía 150 µg de polimixina B, un lipopéptido con propiedades antiendotóxicas bien conocidas, mientras que otro grupo se dejó sin tratar.

Los resultados de la mortalidad animal en todos los puntos temporales experimentales se analizaron globalmente usando el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. Cuando los gráficos de supervivencia eran paralelos, los datos se compararon mediante la prueba de orden logarítmico, mientras que para esos gráficos que se intersecaron la de "Breslow-Gehan-Wilcoxon".

Ejemplo 9:

En experimentos animales algunos péptidos encontrados en el curso de la presente invención se investigaron, y hasta ahora 3 de la serie IPep19 mostraron actividad excelente, mientras que la serie IPep17 mostraron menor aumento de supervivencia (véanse algunos ejemplos en la tabla 1)

Péptido	Ratones muertos/número de ratones		
	24 h	48 h	72 h
LPS solo	11/11		
LPS + PMB	0/10	0/10	0/10
LPS + I-Pep17-1	7/11	7/11	8/11
LPS + I-Pep17-2	7/10	7/10	8/11
LPS + I-Pep19-2	0/10	0/10	0/10

Tabla 1: actividad antimicrobiana de péptidos ejemplares en un modelo de ratón

Se debe enfatizar que la dosis de LPS era muy alta (150 ng) para poder observar efectos claros. También se realizó una reducción de la dosis (50 ng/animal). Se pudo mostrar además que los péptidos de la serie 17 eran ahora mucho más eficaces (resultados no mostrados).

Además, se investigó la capacidad de los péptidos de inhibir el crecimiento de especies bacterianas relevantes:

La eficacia del péptido de la presente invención se muestra en los tres ejemplos en la tabla 2 a continuación (en µg/ml):

A) *Escherichia coli* ATCC 25922

péptido	CIM	CIM	CBM	CBM
Pep 19-2	128	128	512	512
Pep 19-4	15,6	7,8	15,6	15,6
Pep 19-5	15,6	15,6	15,6	15,6
Pep 19-6	>500	>500	>500	>500
Pep 19-7	>500	>500	>500	>500

B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

péptido	CIM	CIM	CBM	CBM
Pep 19-2	128	128	512	512
Pep 19-4	15,6	15,6	62,5	125,0
Pep 19-5	15,6	15,6	31,25	15,6
Pep 19-6	>500	>500	>500	>500
Pep 19-7	>500	>500	>500	>500

C) SARM, *S. maltophilia* y *A. baumannii*

5

	SARM ATCC 43300	SARM CUN 3792-99	Stenotrophomonas maltophilia 3998-00 CUN	Acinetobacter baumannii ATCC 19606
Pep 19-2	128	1024	512	64
Pep 19-4	16	16	32	16
Pep 19-5	16	16	64	16
Pep 19-6	64	32	1024	64
Pep 19-7	16	16	645	16
Pep 18-8	8	8	32	16

Tabla 2: valores de CIM y CBM (determinación en duplicado) para una cepa Gram positiva (*E. coli*), una cepa Gram positiva (*S. aureus*) y valores de CIM para dos cepas de SARM y las cepas Gram negativas *S. maltophilia* y *A. baumannii*. CIM = concentración de inhibición mínima, esta es la concentración a partir de la cual no se observa crecimiento adicional; CBM = concentración bactericida mínima, la concentración, que no solo inhibe el crecimiento bacteriano, sino que inactivó estos completamente.

Ejemplo 10

La actividad de algunos péptidos según la invención contra células tumorales se probó usando células PC3 (carcinoma de próstata). Como parámetro de medida se siguió la liberación de lactato deshidrogenasa que está relacionada con una reducción de NAD a NADH y por tanto indica un daño de las células. Los resultados de este experimento se representan en la figura 7. De la figura 7, se puede ver que el daño celular a la línea de células cancerosas PC3 aumenta con concentraciones crecientes de péptido.

Ejemplo 11

Se incubó una línea de células T (PM1) con un aislado de VIH-1 y las células infectadas se cultivaron en medio que contenía péptido. Después de algunos días el número de virus se determinó comparado con células sin tratar. El número de virus se determina por las concentraciones de la cápside de VIH en el sobrenadante.

La figura 8 representa la acción anti-VIH de los péptidos Pep19-2, -4, 6 y 8 a concentraciones de péptido de 1, 5, 10 y 20 µg/ml. El % de inhibición de la replicación de virus en una línea de células T se representa frente a la concentración de péptido que muestra una inhibición del 99% para los péptidos Pep19-5 y 19-8 a 20 µg/ml.

**Referencias**

- Andersson, M. et al. (1996) NK-lysin, structure and function of a novel effector molecule of porcine T and NK cells. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **54**, 123-126
- Andrä, J. et al. (2004) Biophysical characterization of the interaction of *Limulus polyphemus* endotoxin neutralizing protein with lipopolysaccharide. *Eur.J.Biochem.* **271**, 2037-2046
- Andrä, J. et al. (2007) Mechanism of interaction of optimized *Limulus*-derived cyclic peptides with endotoxins: thermodynamic, biophysical and microbiological analysis. *Biochem.J.* **406**, 297-307
- Andrä, J., et al. (2004) Biophysical characterization of endotoxin inactivation by NK-2, an antimicrobial peptide derived from mammalian NK-lysin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1593-1599
- Andrä, J. et al. (2004) Cyclic antimicrobial peptides based on *Limulus* anti-lipopolysaccharide factor for neutralization of lipopolysaccharide. *Biochem.Pharmacol.* **68**, 1297-1307
- Andrä, J. et al. (2007) Rationale for the design of shortened derivatives of the NK-lysin-derived antimicrobial peptide NK-2 with improved activity against Gram-negative pathogens. *J.Biol. Chem.* **282**, 14719-14728

7. Brandenburg, K. (1993) Fourier transform infrared spectroscopy characterization of the lamellar and nonlamellar structures of free lipid A and Re lipopolysaccharides from *Salmonella minnesota* and *Escherichia coli*. *Biophys. J.* **64**, 1215-1231.
- 5 8. Brandenburg, K. et al. (1999) Investigation into the acyl chain packing of endotoxins and phospholipids under near physiological conditions by WAXS and FTIR spectroscopy. *J.Struct.Biol.* **128**, 175-186
9. Brandenburg, K. et al. (1990) Phase diagram of lipid A from *Salmonella minnesota* and *Escherichia coli* rough mutant lipopolysaccharide. *J.Struct.Biol.* **105**, 11-21
- 10 10. Brandenburg, K. et al. (1992) Phase diagram of deep rough mutant lipopolysaccharide from *Salmonella minnesota* R595. *J. Struct. Biol.* **108**, 93-106
- 15 11. Brandenburg, K. et al. (1997) Conformational studies of synthetic lipid A analogues and partial structures by infrared spectroscopy. *Biochim.Biophys.Acta* **1329**, 193-201
12. Brandenburg, K. et al. (2000) Physico-chemical characteristics of triacyl lipid A partial structure OM-174 in relation to biological activity. *Eur.J.Biochem.* **267**, 3370-3377
- 20 13. Brandenburg, K. et al. (2002) Biophysical characterization of triacyl monosaccharide lipid A partial structures in relation to bioactivity. *Biophys.J.* **83**, 322-333
14. Brandenburg, K. et al. (1993) Influence of the supramolecular structure of free lipid A on its biological activity. *Eur.J.Biochem.* **218**, 555-563
- 25 15. Brandenburg, K. et al. (1998) Characterization of the nonlamellar cubic and H<sub>II</sub> structures of lipid A from *Salmonella enterica* serovar Minnesota by X-ray diffraction and freeze-fracture electron microscopy. *Chem.Phys.Lipids* **91**, 53-69
- 30 16. Brandenburg, K. et al. (1996) Conformation of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharide. *J.Endotoxin Res.* **3**, 173-178
17. Brandenburg, K. y Wiese, A. (2004) Endotoxins: relationships between structure, function, and activity. *Curr.Top.Med.Chem.* **4**, 1127-1146
- 35 18. Chen, X. et al. (2007) Biophysical analysis of the interaction of granulysin-derived peptides with enterobacterial endotoxins. *Biochim.Biophys.Acta* **1768**, 2421-2431
19. Dankesreiter, S. et al. (2000) Synthetic endotoxin-binding peptides block endotoxin-triggered TNF- $\alpha$  production by macrophages in vitro and in vivo and prevent endotoxin-mediated toxic shock. *J.Immunol.* **164**, 4804-4811
- 40 20. Garidel, P. et al. (2007) Novel antiinflammatory and antiinfective agents. *Antiinfective Agents Medic. Chem.* **6**, 185-200
- 45 21. Hoess, A. et al. (1993) Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, *Limulus* anti-LPS factor, at 1.5 Å resolution. *EMBO J.* **12**, 3351-3356
22. Leslie, D. B. et al. (2006) Comparison of endotoxin antagonism of linear and cyclized peptides derived from *Limulus* anti-lipopolysaccharide factor. *Surg.Infect.* **7**, 45-52
- 50 23. Mora, P. et al. (2006) Design of a minimized cyclic tetrapeptide that neutralizes bacterial endotoxins. *J.Pept.Sci.* **12**, 491-496
24. Paus, E. J. et al. (2002) Production of recombinant endotoxin neutralizing protein in *Pichia pastoris* and methods for its purification. *Protein Expr.Purif.* **26**, 202-210
- 55 25. Ramamoorthy, A. et al. (2006) Cell selectivity correlates with membrane-specific interactions: a case study on the antimicrobial peptide G15 derived from granulysin. *Biochim.Biophys.Acta* **1758**, 154-163
- 60 26. Ried, C., et al. (1996) High affinity endotoxin-binding and neutralizing peptides based on the crystal structure of recombinant *Limulus* anti-lipopolysaccharide factor. *J.Biol.Chem.* **271**, 28120-28127
27. Vallespi, M. G. et al. (2003) A *Limulus* anti-LPS factor-derived peptide modulates cytokine gene expression and promotes resolution of bacterial acute infection in mice. *Int.Immunopharmacol* **3**, 247-256
- 65 28. Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual"; CSH Press, Cold Spring Harbor, 2001

29. Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)
- 5 30. Lusk, C.P., Blobel, G., King, M.C. (2007). Highway to the inner nuclear membrane: rules for the road. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8(5)**:414-20.

**Lista de secuencias**

- 10 <110> Forschungszentrum Borstel - Leibnizzentrum für Medizin und Biowissenschaften
- <120> Péptidos antimicrobianos novedosos
- 15 <130> P1712 PCT
- <150> EP 08 00 7064.2
- <151> 09-04-2008
- 20 <160> 15
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 25 <211> 17
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: 1Pep17-1"
- <400> 1
- Lys Lys Phe Arg Arg Leu Lys Trp Lys Tyr Lys Gly Lys Phe Trp Phe
- 1 5 10 15
- Trp
- 35 <210> 2
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: 1Pep17-2"
- <400> 2
- Lys Lys Tyr Arg Arg Phe Arg Trp Lys Phe Lys Gly Lys Phe Trp Phe
- 1 5 10 15
- Trp
- 45 <210> 3
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- 50 <220>
- <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: 1Pep17-3"
- <400> 3
- Arg Arg Tyr Lys Lys Phe Lys Trp Arg Tyr Arg Gly Arg Phe Trp Phe
- 1 5 10 15
- 55 Trp

<210> 4  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 5 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: 1Pep19-1"  
  
 10 <400> 4  
 Gly Cys Lys Lys Phe Arg Arg Leu Lys Trp Lys Tyr Lys Gly Lys Phe  
 1 5 10 15  
  
 Trp Phe Trp Cys Gly  
 20  
  
 <210> 5  
 <211> 21  
 15 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: 1Pep19-2"  
  
 20 <400> 5  
 Gly Cys Lys Lys Tyr Arg Arg Phe Arg Trp Lys Phe Lys Gly Lys Phe  
 1 5 10 15  
  
 Trp Phe Trp Cys Gly  
 20  
  
 <210> 6  
 <211> 21  
 25 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: 1Pep19-3"  
  
 30 <400> 6  
 Gly Cys Arg Arg Tyr Lys Lys Phe Lys Trp Arg Tyr Arg Gly Arg Phe  
 1 5 10 15  
  
 Trp Phe Trp Cys Gly  
 20  
  
 35 <210> 7  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
  
 40 <220>  
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: 1Pep19-4"  
  
 <400> 7  
 Gly Lys Lys Tyr Arg Arg Phe Arg Trp Lys Phe Lys Gly Lys Trp Phe  
 1 5 10 15  
  
 Trp Phe Gly  
 45  
  
 <210> 8  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 50 <213> secuencia artificial

<220>

<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: 1Pep19-5"

5 <400> 8

Gly Lys Lys Tyr Arg Arg Phe Arg Trp Lys Phe Arg Gly Arg Phe Trp  
 1 5 10 15

Phe Trp Gly

<210> 9

<211> 21

10 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: 1Pep19-6"

15

<400> 9

Gly Cys Lys Lys Phe Arg Arg Phe Lys Leu Lys Cys Lys Gln Lys Leu  
 1 5 10 15

Trp Leu Trp Cys Gly  
 20

<210> 10

20 <211> 18

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: 1Pep19-7"

<400> 10

Gly Lys Lys Tyr Arg Arg Phe Trp Lys Phe Lys Gly Lys Trp Phe Phe  
 1 5 10 15

Trp Gly

30 <210> 11

<211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

35 <220>

<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: 1Pep19-8"

<400> 11

Gly Arg Arg Tyr Lys Lys Phe Arg Trp Lys Phe Lys Gly Arg Trp Phe  
 1 5 10 15

Trp Phe Gly

40

<210> 12

<211> 21

<212> PRT

<213> secuencia artificial

45

<220>

<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: 1Pep19-9"

<400> 12

ES 2 535 457 T3

Gly Cys Arg Arg Phe Lys Lys Phe Arg Trp Lys Tyr Lys Gly Lys Phe  
1 5 10 15

Trp Phe Trp Cys Gly  
20

5 <210> 13  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

10 <220>  
<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: 1Pep19-10"

<400> 13  
Gly Arg Arg Tyr Lys Lys Phe Lys Trp Arg Phe Arg Gly Arg Phe Trp  
1 5 10 15

Phe Trp Gly

15 <210> 14  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

20 <220>  
<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: 1Pep19-11"

<400> 14  
Gly Cys Arg Arg Trp Lys Lys Phe Arg Trp Arg Tyr Arg Gly Lys Phe  
1 5 10 15

Trp Phe Trp Cys Gly  
20

25 <210> 15  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

30 <220>  
<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: 1Pep19-12"

<400> 15  
Gly Cys Arg Arg Phe Lys Lys Phe Lys Lys Trp Arg Tyr Arg Gly Arg  
1 5 10 15

Phe Trp Phe Trp Cys Phe Gly  
20

35

## REIVINDICACIONES

1. Un péptido de estructura lineal, no cíclica que consiste en o comprende de 17 a 23 aminoácidos, en donde los aminoácidos en posiciones 1 a 23, contados desde el extremo N, son como sigue (1) G, S o falta; (2) C o falta; (3) K o R; (4) K o R; (5) Y, W o F; (6) K o R; (7) K o R; (8) F, W o L; (9) K o R; (10) K o L o falta; (11) W, L o F; (12) K o R; (13) F, Y o C; (14) K o R; (15) G o Q; (16) K o R; (17) F, L o W; (18) F o W; (19) F, L o W; (20) W o F; (21) C o falta; (22) F o G o falta (23) G o falta.
2. El péptido de la reivindicación 1 que tiene cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos
- |            |                         |
|------------|-------------------------|
| 1Pep17-1:  | KKFRRLKWKYKGFVFW        |
| 1Pep17-2:  | KKYRRFRWKFKGFVFW        |
| 1Pep17-3:  | RRYKKFKWRYRGRVFW        |
| 1Pep19-1:  | GCKKFRRLKWKYKGFVFWCG    |
| 1Pep19-2:  | GCKKYRRFRWKFKGFVFWCG    |
| 1Pep19-3:  | GCRRYKKFKWRYRGRVFWCG    |
| 1Pep19-4:  | GKKYRRFRWKFKGKVFVFWG    |
| 1Pep19-5:  | GKKYRRFRWKFGRVFWFWG     |
| 1Pep19-6:  | GCKKFRRFKLKCKQKLWLWCG   |
| 1Pep19-7:  | GKKYRRFWKFKGKVFVFWG     |
| 1Pep19-8:  | GRRYKKFRWKFKGRVFWFWG    |
| 1Pep19-9:  | GCRRFKKFRWKYKGFVFWCG    |
| 1Pep19-10: | GRRYKKFKWRFRGRVFWFWG    |
| 1Pep19-11: | GCRRWKKFRWRYRGKGFVFWCG  |
| 1Pep19-12: | GCRRFKKFKWRYRGRVFWVFCG. |
3. El péptido de la reivindicación 1 o 2 fusionado a un péptido o polipéptido adicional.
4. El péptido de la reivindicación 3, en donde el péptido adicional es una etiqueta, un péptido señal o un determinante antigénico.
5. El péptido de la reivindicación 3 o 4 fusionado a dicho péptido o polipéptido adicional a través de un enlazador.
6. Una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido o péptido fusionado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6, en donde la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADN.
8. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6 o 7.
9. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 8, que se puede hacer crecer en cultivo celular.
10. Un método para producir el péptido o péptido fusionado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 9 y recoger el péptido producido.
11. Una composición farmacéutica que comprende el péptido o péptido fusionado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6 o 7, el vector de expresión de la reivindicación 8 o la célula huésped de la reivindicación 9.
12. El péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6 o 7, el vector de expresión de la reivindicación 8 o la célula huésped de la reivindicación 9, para su uso en tratar enfermedades infecciosas o cáncer.
13. El péptido para uso de la reivindicación 12, en donde las enfermedades infecciosas están causadas por infección bacteriana o vírica.
14. El péptido para uso de la reivindicación 12 o 13, en donde la enfermedad infecciosa es sepsis.
15. Un kit que comprende el péptido o péptido fusionado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6 o 7, el vector de expresión de la reivindicación 8 o la célula huésped de la reivindicación 9.

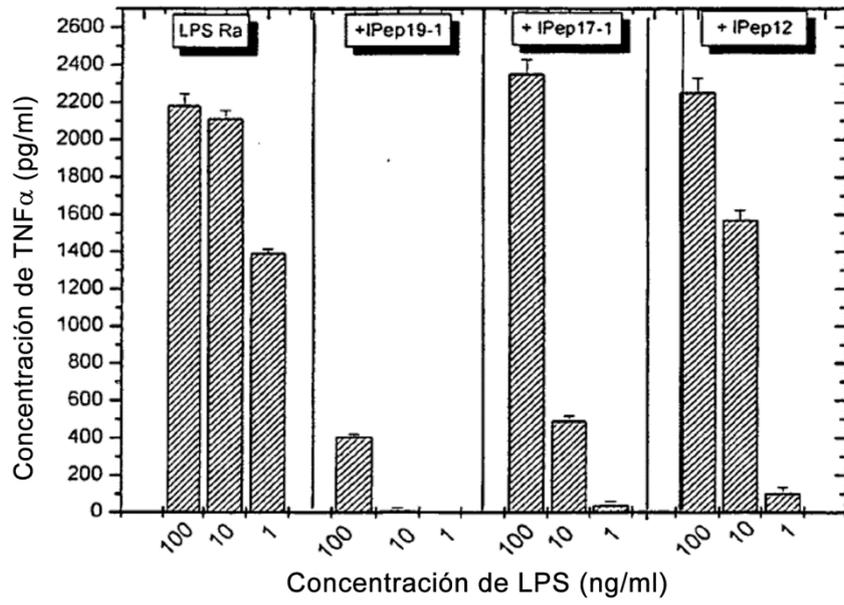


Figura 1

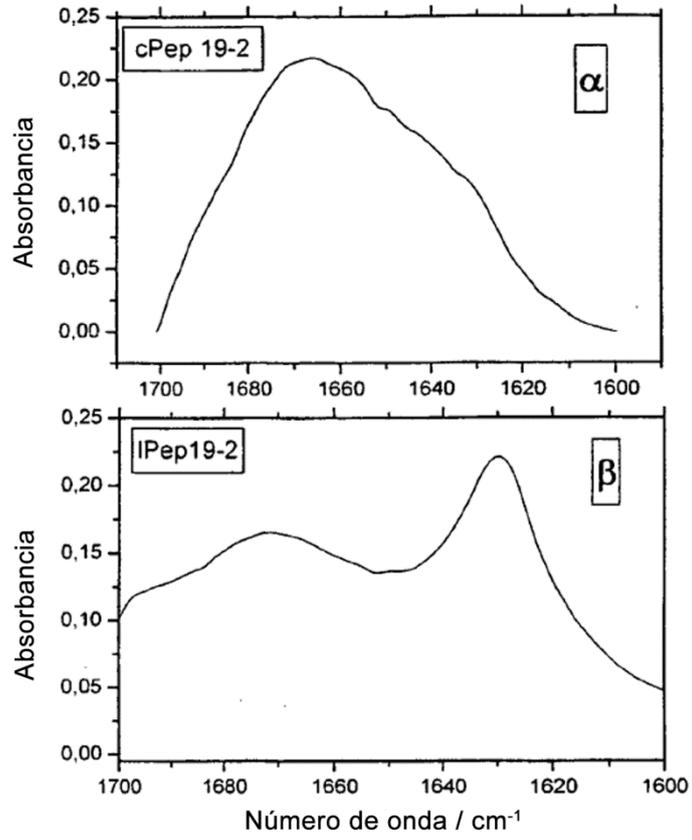


Figura 2

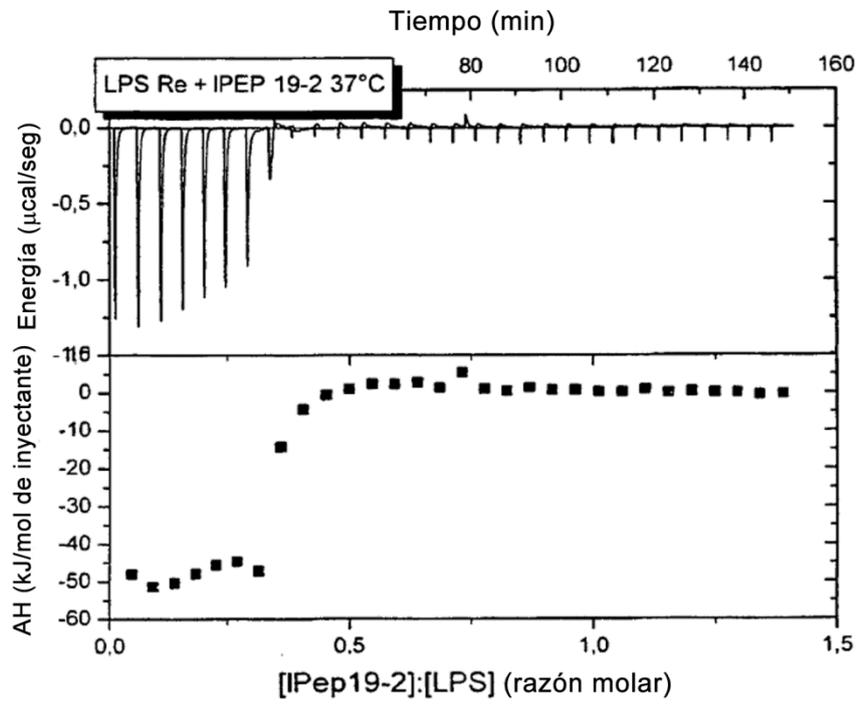
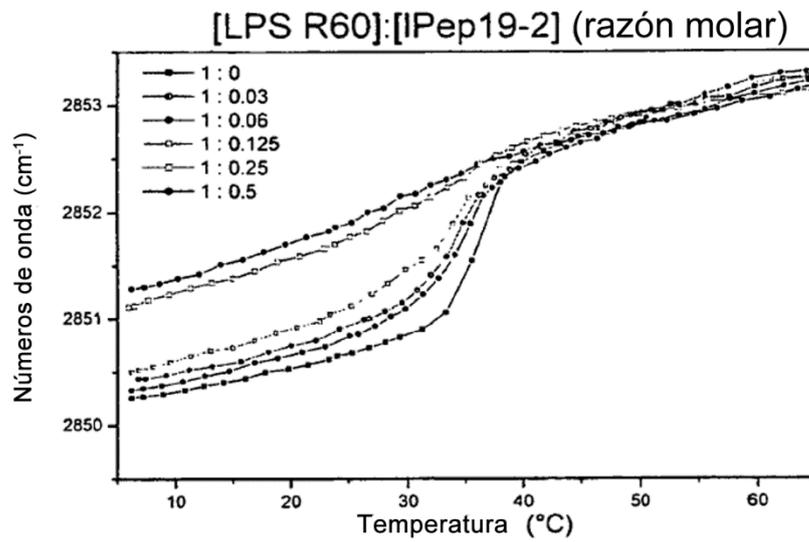


Figura 3

A



B

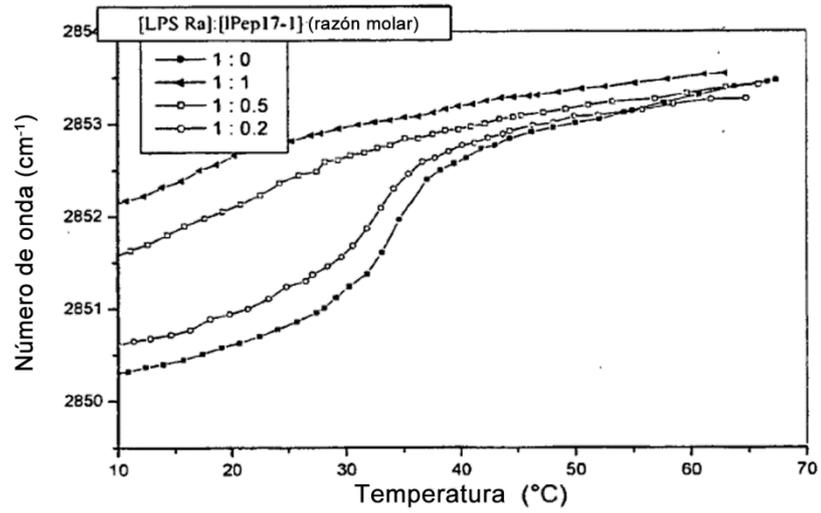


Figura 4

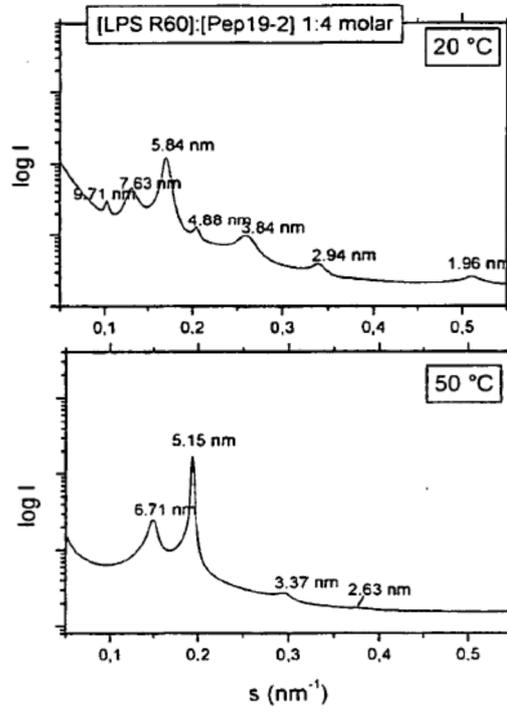


Figura 5

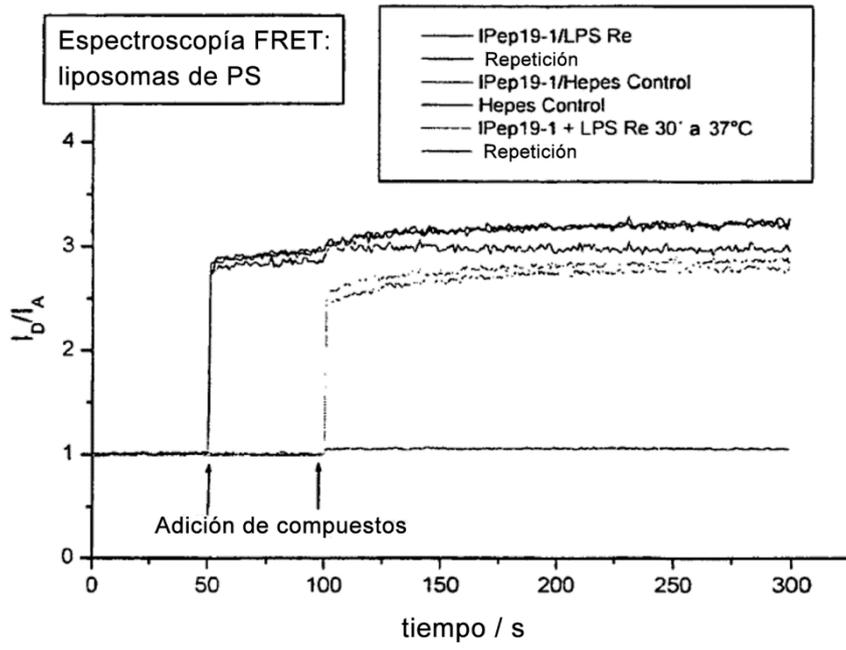


Figura 6

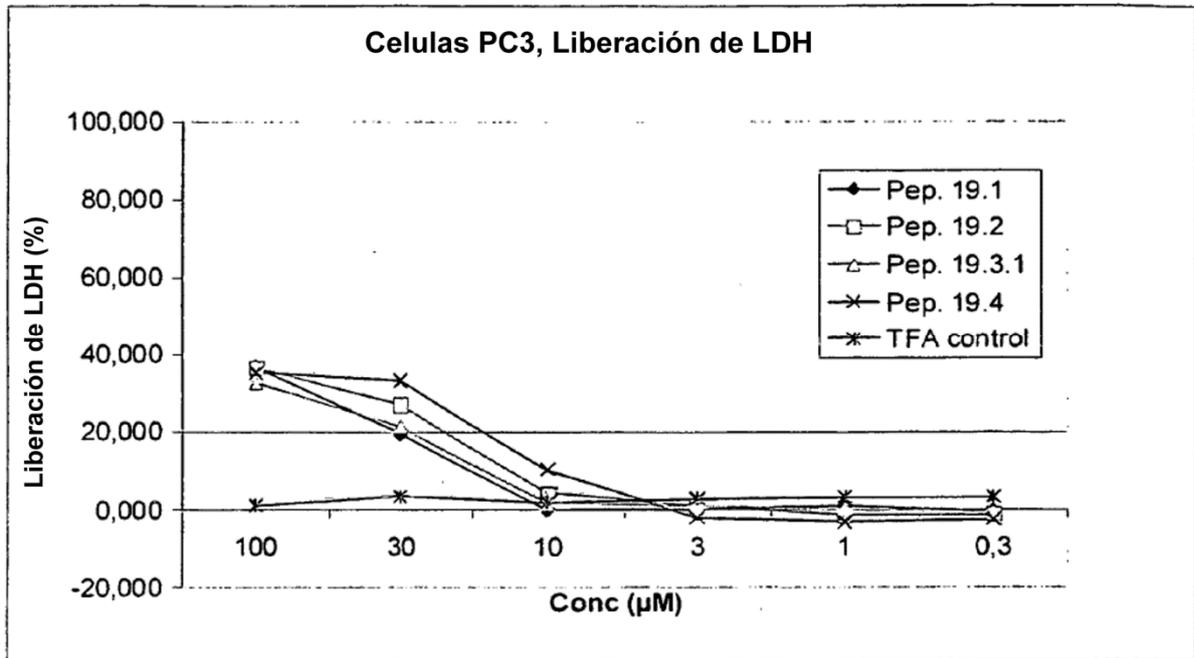


Figura 7

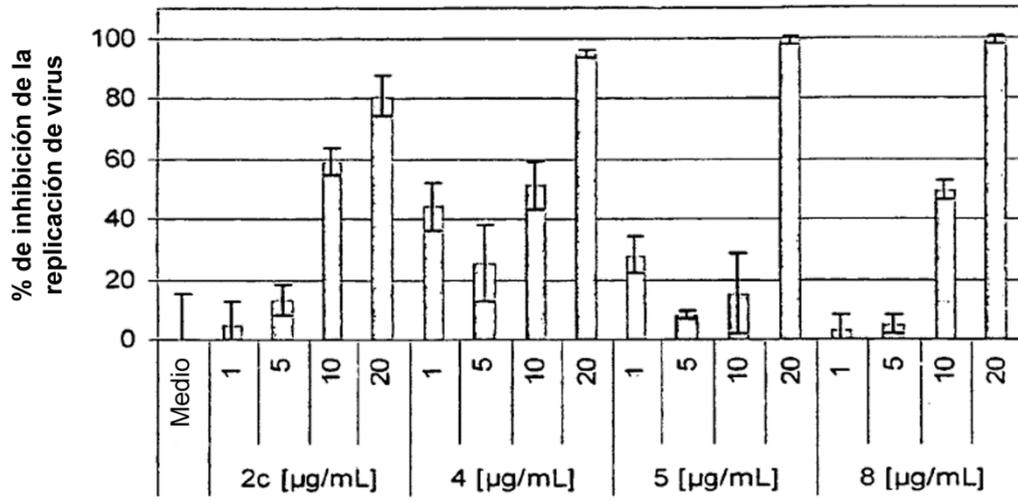


Figura 8