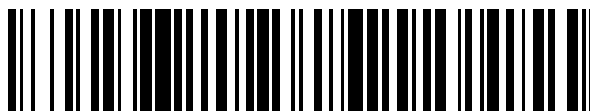


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 086**

51 Int. Cl.:

A23L 3/3463 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 36/48 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A01N 47/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2011** **PCT/EP2011/067824**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2012** **WO12049215**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2011** **E 11769866 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017** **EP 2627201**

54 Título: **Proteína antimicrobiana**

30 Prioridad:

13.10.2010 GB 201017284

12.10.2010 PT 2010105330

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
08.03.2018

73 Titular/es:

**CONSUMO EM VERDE - BIOTECNOLOGIA DAS
PLANTAS, S.A. (100.0%)
Parque Tecnológico de Cantanhede Núcleo 04
Lote 2
3060-197 Cantanhede, PT**

72 Inventor/es:

**CARREIRA, ALEXANDRA MANUELA
LOURENÇO;
VALADAS DA SILVA MONTEIRO, SARA
ALEXANDRA y
DE SEIXAS BOAVIDA FERREIRA, RICARDO
MANUEL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 658 086 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

Proteína antimicrobiana

5 Campo de la invención

La invención se refiere al campo de agentes antimicrobianos y especialmente a aquellos que se dirigen a patógenos humanos/animales.

10 Introducción

Infecciones bacterianas

15 Las bacterias son, por mucho, los agentes etiológicos más comunes de infección humana. Más de un tercio de la población mundial probablemente está infectada por patógenos bacterianos y se producen dos millones de muertes por año debido a infecciones bacterianas. De acuerdo con el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), las siguientes infecciones bacterianas se incluyen en la lista de las enfermedades infecciosas más comunes en todo el mundo hoy en día:

20 Cólera: ésta es una enfermedad que se propaga principalmente a través del agua de bebida contaminada y condiciones insalubres. Es endémica en el subcontinente indio, Rusia y África subsahariana. Es una infección aguda del intestino con la bacteria *Vibrio cholerae*. El síntoma principal es la diarrea copiosa. Entre el 5 % y el 10 % de los infectados con la enfermedad desarrollará síntomas graves, los cuales incluyen vómito y calambres en las piernas. En su forma grave, el cólera puede provocar la muerte por deshidratación. Se estima que se notifican 200.000 a la OMS anualmente.

30 Meningitis: con frecuencia conocida como meningitis espinal, ésta es una infección de la médula espinal. Por lo general es el resultado de una infección vírica o bacteriana. La meningitis bacteriana es más grave que la meningitis vírica y puede provocar daño cerebral, pérdida de oído y discapacidades de aprendizaje. Puede ser provocada, por ejemplo, por *Haemophilus influenzae* tipo b, *Neisseria meningitidis*, o *Streptococcus pneumoniae*. Se estima que se producen 1,2 millones de casos de meningitis bacteriana cada año, de los cuales más de una décima parte son mortales. Los síntomas incluyen dolor de cabeza grave, fiebre, náusea, vómito, letargo, delirio, fotofobia y un cuello rígido.

35 Neumonía: ésta tiene muchas causas posibles, pero por lo general es una infección por bacterias *Streptococcus* o micoplasma. Estas bacterias pueden vivir en el cuerpo humano sin provocar infección durante años y solo emergen cuando otra enfermedad ha reducido la inmunidad a la enfermedad. *Streptococcus pneumoniae* provoca neumonía estreptocócica, la clase más común, que es más grave que la neumonía por micoplasma. *S. pneumoniae* es responsable de más de 100.000 hospitalizaciones por neumonía anualmente, así como de 6 millones de casos de otitis media y más de 60.000 casos de enfermedades invasivas tales como la meningitis.

40 Shigellosis: se estima que esta infección provoca 60.000 muertes a nivel mundial cada año. Es más común en países en vías de desarrollo con poca salubridad. La bacteria *Shigella* provoca disentería bacteriana o shigellosis. Los síntomas incluyen diarrea con heces con sangre, vómitos y calambres en el estómago.

45 Amigdalitis: ésta es provocada por bacterias *Streptococcus*. Se producen varios millones de casos de amigdalitis cada año. Los síntomas incluyen un dolor de garganta, fiebre, dolor de cabeza, fatiga y náusea.

50 Tuberculosis: esto causa casi 2 millones de muertes cada año y la OMS estima que casi mil millones de personas se infectarán entre 2000 y 2020 si no se adoptan procedimientos más eficaces. Las bacterias de TB (por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*) se encuentran con mucha frecuencia en los pulmones, donde pueden provocar dolor en el pecho y una tos fuerte que produce flemas con sangre. Otros síntomas incluyen fatiga, pérdida de peso, pérdida de apetito, escalofríos, fiebre y sudoración nocturna.

55 Fiebre tifoidea: la fiebre de tifoidea es provocada por la bacteria *Salmonella typhi* y se estima que provoca 600.000 muertes anualmente, de 12-17 millones de casos. Por lo general se propaga a través de alimentos infectados o agua. Los síntomas incluyen una fiebre repentina y sostenida, dolor de cabeza grave, náusea, pérdida de apetito grave, estreñimiento y a veces diarrea.

60 Sin embargo, los números de casos precisos son difíciles de determinar, especialmente porque muchos de estos casos son endémicos de países en vías de desarrollo, donde mucha gente no tiene acceso a atención médica moderna. Aproximadamente la mitad de todas las muertes provocadas por enfermedades infecciosas cada año se puede atribuir solo a tres enfermedades: tuberculosis, malaria y SIDA. Juntas, estas enfermedades provocan más de 300 millones de enfermedades y más de 5 millones de muertes cada año.

65

La era moderna de uso de los antibióticos comenzó en el siglo diecinueve principios del veinte, con la identificación del principio activo penicilina, producido por *Penicillium notatum*, que tenía una actividad antimicrobiana potente. Sin embargo, antes de 1955, su venta no se controló y el uso excesivo y no controlado condujo a la aparición de bacterias resistentes. La resistencia a antibióticos se convirtió en un problema muy importante y las epidemias de infecciones resistentes a estafilococos comenzaron a surgir en hospitales.

El comienzo del siglo veinte también vio el desarrollo de antibióticos tales como sulfonamidas, estreptomina, neomicina, cloranfenicol, cefalosporinas y tetraciclinas. Muchos de estos compuestos todavía están en uso hoy en día, aunque todos han enfrentado el reto del desarrollo de resistencia y algunos han enfrentado problemas de toxicidad. Por ejemplo, la estreptomina puede provocar daño al riñón y sordera y el cloranfenicol puede provocar efectos secundarios graves (por ejemplo, trastornos sanguíneos graves, incluyendo anemia y leucemia).

Se hicieron más investigaciones durante la década de los 1960, lo que condujo al desarrollo de la segunda generación de antibióticos. Entre estos estaba la metilina, un derivado semisintético de penicilina producido específicamente para superar el problema de la resistencia a la penicilina. La metilina fue aclamada como un gran descubrimiento en la lucha contra la resistencia bacteriana a la penicilina, pero, desafortunadamente, ese no fue el caso, y ahora hay bacterias que son resistentes a la metilina. La ampicilina también es un derivado de penicilina. Se desarrolló para ampliar la gama de infecciones que la penicilina podría tratar y ahora ha reemplazado a la penicilina en gran medida. Con frecuencia es la primera elección en el tratamiento de una gama entera de infecciones, incluyendo infecciones respiratorias y del tracto urinario. La amoxicilina es otro derivado de la penicilina ampliamente utilizado. Como la ampicilina, tiene una amplia gama de actividades. La gentamicina está en la misma familia de antibióticos que la estreptomina (el fármaco anti-TB descubierto en 1943). En general se reserva para infecciones graves ya que puede tener efectos secundarios tóxicos graves en los oídos y los riñones.

Recientemente, una familia nueva de antibióticos llamados quinolonas, también denominadas fluoroquinolonas, se ha desarrollado por los laboratorios farmacéuticos. Además de ser eficaces contra una amplia gama de bacterias, estos antibióticos pueden alcanzar una concentración alta en el torrente sanguíneo cuando se toman por vía oral. Esto significa que muchas más infecciones que una vez pudieron haber requerido una estancia hospitalaria, ahora pueden tratarse en casa. Las fluoroquinolonas solo se usan para pacientes que están gravemente enfermos y/o cuando se requieren tratamientos largos con antibióticos (de semanas a meses).

A pesar del desarrollo de dichos compuestos de segunda generación, la aparición incesante de resistencia sigue siendo un problema. Normalmente, la resistencia sigue al uso y especialmente al uso prolongado o al mal uso de un fármaco, que finalmente conducirá a su pérdida de eficacia para tratar una enfermedad humana. El uso continuo de agentes antimicrobianos aumenta la presión de selección que favorece la aparición, multiplicación y propagación de cepas resistentes. El uso inapropiado y no controlado de agentes antimicrobianos contribuye a esto, incluyendo la prescripción sin control, la administración de dosis subóptimas, la duración insuficiente de tratamientos, el mal diagnóstico que conduce a la elección inapropiada del fármaco y el uso (y, específicamente, el uso excesivo) de productos domésticos antibacterianos en hogares, escuelas, etc.

En algunos casos, la resistencia aparece rápidamente (por ejemplo, la resistencia del *Staphylococcus aureus* a la oxalina se desarrolló en solo unos pocos años), pero en otros puede tardar más (por ejemplo, *Enterococcus faecium* tardó casi 30 años en desarrollar resistencia a vancomicina). Las razones para las diferencias en los marcos temporales no están claras y probablemente son multifactoriales. Sin embargo, la habilidad de las bacterias para evadir la acción destructora de los agentes antimicrobianos ha impedido claramente la capacidad de tratar pacientes individuales y controlar brotes grandes de enfermedades infecciosas. Por ejemplo, la OMS estima que hay casi medio millón de casos nuevos de tuberculosis resistente a múltiples fármacos (MDR-TB) al año, lo que es aproximadamente el 5 % de nueve millones de casos nuevos de TB de todos los tipos.

Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) tienen una facilidad particular para la transmisión nosocomial. En algunos hospitales en los Estados Unidos, más del 70 % del *S. aureus* aislado en pacientes son MRSA y estas cepas con frecuencia son resistentes a todos los fármacos autorizados excepto vancomicina, linezolid, daptomicina y tigeciclina. Recientemente, también se aislaron cepas de *S. aureus* completamente resistentes a vancomicina en pacientes en los Estados Unidos complicando adicionalmente la terapia. El MRSA se ha hecho altamente endémico en muchos hospitales y una vez introducido en un hospital, este organismo es muy difícil de erradicar.

Los problemas con erradicación también son ciertos para cepas resistentes a vancomicina de *E. faecium* (VRE), que con frecuencia son resistentes a todos los demás fármacos clínicamente aprobados. La resistencia a vancomicina en enterococos con frecuencia está mediada por plásmidos y puede ser resultado de varios determinantes de resistencia únicos. La combinación de resistencia a penicilina y glucopéptido en *E. faecium* provoca infecciones que no se pueden tratar de manera eficaz. Por fortuna, la mayoría de VRE provocan colonización y no infección. Cuando se produce infección, quizá no pueda ser tratable con antibióticos. La resistencia a quinolonas puede evolucionar con rapidez, incluso durante el curso de un tratamiento.

En el presente, algunas bacterias han conseguido el estatus de “bacterias multirresistentes”, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, enterococos resistentes a vancomicina y *Streptococcus pneumonia* resistente a quinolona. Para estos patógenos existen pocos o ningún antibiótico disponible para terapia. Pero, de manera sorprendente, solo se han introducido unas pocas clases de antibióticos novedosos en los últimos 40 años y todas desde 1999, incluyendo la combinación de estreptogramina quinupristina/dalfopristina (Synercid), la oxazolidinona linezolid y el lipopéptido daptomicina.

Existe una necesidad creciente de antibióticos novedosos para tratar enfermedades inducidas por patógenos bacterianos, en particular debido al problema de la resistencia a antimicrobianos. Como se ha mencionado anteriormente, muchos patógenos están desarrollando resistencia a antibióticos potentes utilizados para tratamiento. De manera alarmante, con frecuencia la resistencia no se restringe a un solo agente, sino que puede implicar resistencia a múltiples antibióticos. La búsqueda de fármacos nuevos y más eficaces continúa hoy en día, especialmente de antibióticos de espectro dirigido para evadir mecanismos de resistencia a múltiples fármacos. Sin embargo, el ritmo de esta búsqueda ha bajado de manera notable ya que ahora es mucho más difícil para las compañías farmacéuticas obtener la aprobación para fármacos nuevos. Además, el coste implicado y el retraso de tiempo entre la identificación de un antibiótico novedoso en el laboratorio y la aprobación para producirlo a nivel comercial son tan grandes que han conducido a algunas compañías a abandonar el mercado por completo.

Infecciones fúngicas

La incidencia de infecciones fúngicas ha aumentado en las últimas tres décadas como consecuencia, en parte, del número aumentado de pacientes que tienen un sistema inmune disfuncional. Esto es un resultado directo de avances importantes en medicina en años recientes, en particular en la terapia contra el cáncer, dando como resultado un número aumentado de pacientes inmunosuprimidos. Se han propuesto varias otras razones para el aumento de infecciones fúngicas, incluyendo la nutrición parenteral y los catéteres venosos centrales, el tratamiento con antibióticos de amplio espectro, el embarazo, los pacientes con diabetes no controlada, los receptores de trasplante de órgano sólido, los pacientes con SIDA, los pacientes con cáncer que están pasando sometidos a quimioterapia citotóxica, los pacientes con quemaduras o neutropenia y las patologías gastrointestinales.

Las infecciones fúngicas más graves son las infecciones fúngicas invasivas (IFI) (por ejemplo, infección en el torrente sanguíneo) que se asocian a mortalidad alta. Las especies de *Candida* son los agentes causantes más frecuentes de IFI con una tasa de mortalidad promedio del 30 %. *Candida albicans* es responsable de aproximadamente el 50 % de los casos de infección invasiva por *Candida*, pero ha habido un aumento estable en las frecuencias relativas de especies no albicans, a saber, de *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*. Las especies de *Aspergillus* son los mohos invasivos más comúnmente aislados, con una predominancia de la especie *Aspergillus fumigatus*. Como infecciones por *Candida*, aspergilosis invasiva. Por lo general se asocia a pacientes críticamente enfermos, pero su tasa de mortalidad es mucho mayor, no obstante dependiente de la infección individual específica considerada: por ejemplo, el 85 % o más para enfermedad diseminada o del sistema nervioso central y el 60 % para enfermedad pulmonar difusa.

La prevalencia y tasa de mortalidad de las IFI han aumentado en las últimas tres décadas. Los datos de Estados Unidos muestran que en 1980 este grupo de enfermedades fue responsable de 828 muertes y fue la décima causa más prominente de infección mortal. En 1997, la misma serie de datos mostró que el número de muertes ha subido a 2370 y a la séptima causa más prevalente de infección terminal. Los datos recientes muestran que *Candida* se ha hecho más prevalente que las especies *Escherichia coli* y *Pseudomonas* y ahora es la cuarta infección mortal más común en los Estados Unidos.

Las IFI por *Candida* también están aumentando en el entorno nosocomial y se anticipa otro aumento conforme sigan aumentando los factores de riesgo de estas infecciones. Las especies *Candida* justifican del 8 al 10 % de todas las IFI nosocomiales y ocurren a una tasa de 6 a 23 infecciones por 100.000 personas anualmente en los Estados Unidos. La preocupación principal con candidiasis invasiva no solo es su tasa de mortalidad alta, sino también la longitud excesiva de estancia en hospital para pacientes infectados, de 3 a 10 días, dando un coste estimado global atribuible a la candidemia de aproximadamente mil millones de dólares por año en los Estados Unidos. Un estudio recientemente publicado sobre la población portuguesa mostró que hay una incidencia de fungemia nosocomial de 2,7 por 1.000 admisiones hospitalarias, con una tasa de mortalidad del 39,3 %. De acuerdo con otro estudio reciente publicado sobre la incidencia de IFI en Europa, este número parece estar más próximo a las incidencias encontradas en otros países europeos, pero es considerablemente menor que aquel encontrado para la población de Estados Unidos. Otro informe reciente mostró que en Escocia la incidencia de candidemia es de 4,8 casos por 100.000 población por año.

Desde finales de la década de 1950, el tratamiento de referencia para el tratamiento de la infección fúngica potencialmente mortal ha sido la anfotericina B. Este compuesto dirige y se une a esteroides en la membrana celular fúngica para crear poros iónicos, dando como resultado una pérdida de potencial de membrana y un colapso posterior. Aunque sigue siendo el agente fungicida de espectro más amplio disponible, su alta toxicidad y su requisito de administración parenteral ha limitado su uso.

La década de 1990 vio la introducción de formulaciones lipídicas de anfotericina B, así como los triazoles, fluconazol e itraconazol. Los triazoles actúan por síntesis de ergosterol a través de la inhibición de lanosterol 14 α -desmetilasa dependiente de CYP-450, lo que interfiere con crecimiento celular, finalmente conduciendo a la muerte celular. Aunque estos agentes presentaron ventajas claras sobre la anfotericina B, estaban limitadas por su formulación, su espectro de actividad y/o su desarrollo de resistencia.

Desde 2000, se han desarrollado agentes antifúngicos nuevos para superar las fuertes limitaciones de los fármacos preexistentes, tales como triazoles de espectro ampliado (voriconazol y posaconazol) y equinocandinas (caspofungina, micafungina y anidulafungina). Las equinocandinas inhiben la síntesis de β -1,3-D-glucanos, conduciendo a la desestabilización de la pared celular fúngica, lisis celular y muerte celular. Están activas, *in vitro*, contra especies de *Candida* y *Aspergillus*, pero no contra una amplia gama de otros hongos patógenos emergentes. Incluso entre estos agentes nuevos, todavía hay limitaciones como los efectos farmacológicos adversos (especialmente para voriconazol), interacciones de fármaco-fármaco asociadas a triazoles y falta de preparaciones alternativas (por ejemplo, faltan preparaciones intravenosas para posaconazol y faltan preparaciones orales para equinocandinas).

Los antifúngicos disponibles ahora también son ineficientes para la erradicación profiláctica de la colonización de *Candida albicans*. De hecho, esta levadura presenta la capacidad de crecimiento de una biopelícula, que presenta tolerancia intrínseca aumentada a antifúngicos tales como azoles, polienos y 5-fluorocitosina. Por esta razón, la candidiasis con frecuencia se asocia a dispositivos médicos permanentes (por ejemplo, implantes dentales, válvulas de corazón, injertos de bypass vasculares, lentes oculares, articulaciones artificiales y derivaciones del sistema nervioso central), que pueden actuar como sustratos para el crecimiento de biopelícula. En un estudio multicéntrico de 427 pacientes consecutivos con candidemia, se descubrió que la tasa de mortalidad para pacientes con candidemia relacionada con catéter era del 41 %. Por tanto, a pesar del desarrollo de antifúngicos nuevos, la tasa de mortalidad de la infección fúngica nosocomial sigue siendo inaceptablemente alta. Además, también existe una lista creciente de patógenos fúngicos nuevos y emergentes, incluyendo especies no albican de especies de *Candida* y no *fumigatus* de *Aspergillus*, que por lo general son difíciles de diagnosticar y tratar, haciéndolas responsables de tasas mayores de mortalidad.

El documento WO 2007/010459 A2 desvela la extracción de una proteína a partir de las semillas, cotiledones o plántulas del género *Lupinus*, así como la manera de producirla de forma recombinante y de expresarla en plantas modificadas genéticamente. Su uso se desvela, o cualquier modificación de la proteína que mantenga sus propiedades biológicas, como un complemento en la nutrición humana o animal y como un fungicida para plantas, insecticida, promotor del crecimiento, fertilizante o en la preparación de organismos modificados genéticamente.

El documento US 7067624 B2 desvela una nueva familia de proteínas antimicrobianas. Pueden aislarse proteínas prototipo de *Macadania integrifolia* así como otras especies de plantas. También se describe ADN que codifica la proteína, así como construcciones de ADN que pueden usarse para expresar la proteína antimicrobiana o para introducir la proteína antimicrobiana en una planta. Pueden administrarse composiciones que comprenden las proteínas antimicrobianas o la proteína antimicrobiana en sí a plantas o animales mamíferos para combatir la infestación microbiana. Es uno de los objetivos de la presente invención intentar una solución para los problemas mencionados anteriormente y, específicamente, por ejemplo, proporcionar un agente antimicrobiano alternativo con actividad de amplio espectro y potente contra patógenos humanos/animales teniendo al mismo tiempo una baja toxicidad.

Los inventores de manera sorprendente han descubierto que el polipéptido Blad de *Lupinus* muestra actividad antimicrobiana potente contra un gran número de diversos organismos bacterianos y fúngicos que son patógenos para humanos o animales. Los inventores también han descubierto que el polipéptido Blad es no tóxico para humanos, haciendo de este modo al Blad un compuesto excelente para su uso como antimicrobiano contra patógenos humanos y animales en una gama de entornos.

En consecuencia, los inventores proporcionan una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende la secuencia Blad que se muestra en la SEQ ID NO: 4 o una variante activa del mismo para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia o profilaxis, en la que dicha variante activa tiene actividad antimicrobiana y comprende una secuencia que tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 60 % con la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la SEQ ID NO: 4 que tiene al menos 100 aminoácidos de longitud. Los inventores también proporcionan dicha composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de una infección en o sobre un sujeto por un microorganismo. En realizaciones preferidas, la composición comprende además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y/o un agente quelante. Preferentemente, la composición se usa en dicho método en el que el sujeto tiene un sistema inmunitario comprometido o está críticamente enfermo.

Los inventores también proporcionan el uso de una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende la secuencia Blad que se muestra en la SEQ ID NO: 4 o una variante activa del mismo, en el que dicha variante activa tiene actividad antimicrobiana y comprende una secuencia que tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 60 % con la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la SEQ ID NO: 4 que tiene al menos 100 aminoácidos

de longitud; para destruir o inhibir el crecimiento de, un microorganismo que es patógeno para un ser humano o un animal en un sitio que no está sobre o en el cuerpo humano o animal. Preferentemente dicha composición se usa para desinfectar, con respecto a un microorganismo patógeno humano o animal, un artículo que debe ser ingerido por o colocado directamente sobre o en, un ser humano o animal o una superficie que necesita el mismo, preferentemente en la que dicho artículo es un alimento o un dispositivo o instrumento médico o en el que dicha superficie se ubica dentro de un ambiente donde:

- (a) un examen médico, diagnóstico o tratamiento se ha de realizar;
- (b) un alimento se ha de preparar o de lo contrario se ha manipular o almacenar;
- (c) un lavado personal y/o sanitización se ha de realizar; y/o
- (d) una persona en riesgo particular de

- (i) adquirir una infección por un microorganismo; y/o
- (ii) ser incapaz de evitar una infección microbiana sin intervención médica;

se sitúa.

En realizaciones preferidas de estos usos, dicha composición comprende adicionalmente un agente quelante. En realizaciones preferidas, el microorganismo es una bacteria o un hongo, preferentemente en las que:

- la bacteria es una especie patógena de uno de los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Listeria*, *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Salmonella*; o
- el hongo es una especie patógena de uno de los siguientes géneros: *Candida*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cryptococcus* y *Trichosporon*, preferentemente en las que el hongo puede provocar una infección fúngica invasiva, preferentemente *C. albicans*, *A. Fumigatus* o *Alternaria alternata*.

Los inventores también proporcionan un método de destrucción o inhibición del crecimiento de, un microorganismo que es patógeno para un ser humano o un animal en un sitio que no está en o dentro del cuerpo humano o animal, comprendiendo dicho método administrar a dicho sitio una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende la secuencia Blad que se muestra en la SEQ ID NO: 4 o una variante activa de la misma, en el que dicha variante activa tiene actividad antimicrobiana y comprende una secuencia que tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 60 % con cualquiera de SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la SEQ ID NO: 4 que tiene al menos 100 aminoácidos de longitud. La invención se describirá ahora con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- La figura 1 muestra curvas de tiempo-destrucción para *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*;
- La figura 2 muestra halos de inhibición para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa* y *L. monocytogenes*;
- La figura 3A muestra una curva de tiempo-destrucción para *C. albicans*;
- Las figuras 3B y 4 muestran curvas para *C. albicans*;
- Las figuras 5 a 8 muestran colectivamente halos de inhibición para *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *A. Fumigatus*;
- La figura 9 muestra curvas de tiempo-destrucción para *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*;
- La figura 10 muestra la secuencia codificante precursora de β -conglutina de *Lupinus albus* (SEQ ID NO: 1); y
- La figura 11 muestra el fragmento interno de la secuencia codificante precursora de β -conglutina que corresponde a Blad (SEQ ID NO: 3).

Blad

Blad ("banda de *Lupinus albus* doce" – banda de *L. albus* dulce) fue el nombre dado a un producto de degradación estable e intermedio de β -conglutina, la proteína de almacenamiento principal presente en semillas del género *Lupinus*. Se caracterizó como un polipéptido de 20 kD, compuesto por 173 restos de aminoácidos y codificado por un fragmento interno (519 nucleótidos, depositados en GenBank con el número de acceso ABB13526) del gen que codifica el precursor de β -conglutina de *Lupinus* (1791 nucleótidos, publicado en GenBank, con el número de acceso AAS97865). Cuando se usan secuencias terminales de Blad codificantes de cebadores para amplificar una secuencia de ADN de *Lupinus* genómico, se obtiene un producto de ~620 pb, que indica la presencia de un intrón en el fragmento de genes que codifica Blad. El Blad de origen natural es el componente principal de un glucooligómero de 210 kD que se acumula exclusivamente (después de la proteólisis limitada intensiva de β -conglutina) en los cotiledones de especies de *Lupinus*, entre los días 4 y 12 después del comienzo de la germinación. Aunque dicho oligómero se glucosila, El Blad de origen natural no se glucosila. El glucooligómero que contiene Blad está compuesto por varios polipéptidos, presentando, los principales, masas moleculares de 14, 17, 20, 32, 36, 48 y 50 kD. El polipéptido de 20 kD, Blad, es por mucho el polipéptido más abundante dentro del oligómero y parece ser el único con actividad lectina. El Blad de origen natural constituye aproximadamente el 80 % de la proteína cotiledonaria total en plántulas de 8 días de edad.

La secuencia codificante precursora de β -conglutina de *L. albus* (SEQ ID NO: 1) se proporciona en la figura 10. La secuencia codificante de la subunidad parental de β -conglutina se ubica en los restos 70 a 1668. La subunidad codificada parental de β -conglutina de 533 restos de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) es:

MGKMRVRFPTLVVLGIVFLMAVSIGIAYGEKDVLSHERPEEREQE EWQPRRQR
PQSRREEREQE EQGSPSYPRRQSGYERRQYHERSEQREEREQEQQGSPSYSRR
QRNPYHFSSQRFQTLTKNRNGKIRVLERFDQRTNRLNLQNYRIVEFQSKPNTLI
LPKHSDADYVLVLNLRATITIVNPDRRQAYNLEYGDALRIPAGSTSYILNPDDN
QKLRVVKLAIPINNPgyfydfypsSTKDQQSYFSGFSRNTLEATFNTRYEEIQRI
ILGNEDEQEYEEQRRGQEQSDQDEGVIVIVSKKQIQKLTkHAQSSSGKDKPSDSG
PFNLRSNEPIYSNKYGNFYEITPDRNPQVQDLNISLTYIKINEGALLPHYNSKA
IYVVVVDEGEGNYELVGIRDQQRQQDEQEEKEEEVIRYSARLSEGDIFVIPAGYP
ISINASSNLRLLGFGINADENQRNFLAGSKDNVIRQLDRAVNELTFPGSAEDIER
5 LIKNQQQSYFANGQPQQQQQQQSEKEGRGRGRGSSLPF

El fragmento interno de la secuencia codificante precursora de β -conglutina que corresponde a Blad (SEQ ID NO: 3) se proporciona en la figura 11. El polipéptido Blad (SEQ ID NO: 4) es:

RRQRNPYHFSSQRFQTLTKNRNGKIRVLERFDQRTNRLNLQNYRIVEFQSKPNT
LILPKHSDADYVLVLNLRATITIVNPDRRQAYNLEYGDALRIPAGSTSYILNPD
DNQKLRVVKLAIPINNPgyfydfypsSTKDQQSYFSGFSRNTLEATFNTRYEEIQ
10 RIILGNED

La invención se refiere a una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende Blad o una variante activa del mismo. Por tanto, se refiere a una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende la secuencia de polipéptido de SEQ ID NO: 4 o una variante activa del mismo. En realizaciones alternativas, la composición consiste esencialmente en un polipéptido antimicrobiano que comprende Blad o una variante activa del mismo y/o el polipéptido antimicrobiano consiste esencialmente en Blad o una variante activa del mismo. En otras realizaciones, el polipéptido antimicrobiano que comprende (o consiste esencialmente en) Blad o una variante activa del mismo se puede usar en forma aislada.

Una variante activa de Blad es una variante de Blad que conserva la habilidad de actuar como un antimicrobiano (es decir, tiene actividad antimicrobiana – véase más adelante para una descripción del nivel de dicha actividad y cómo medirla). “Una variante activa de Blad” incluye dentro de su alcance un fragmento de la SEQ ID NO: 4. En realizaciones preferidas, se selecciona un fragmento de la SEQ ID NO: 4 que es al menos el 60 % de la longitud de la SEQ ID NO: 4, preferentemente al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % y mucho más preferentemente al menos el 95 % de la longitud de la SEQ ID NO: 4. La variante de Blad tendrá una longitud de al menos el 100 restos de aminoácidos, tales como al menos 120, 140, 160 o 173 restos de aminoácidos.

“Una variante activa de Blad” también incluye dentro de su alcance una secuencia de polipéptido que tiene homología con la SEQ ID NO: 4, preferentemente al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, preferentemente al menos el 85 %, preferentemente al menos el 90 %, preferentemente al menos el 95 %, preferentemente al menos el 97 % y mucho más preferentemente al menos el 99 % de identidad, por ejemplo, sobre la secuencia completa o sobre una región de al menos 100, preferentemente al menos 120, preferentemente al menos 140 y mucho más preferentemente al menos 160 o más restos de aminoácidos contiguos. Se conocen bien en la técnica métodos de medir la homología de la proteína y se entenderá por los expertos en la materia que, en el presente contexto, la homología se calcula basándose en la identidad de aminoácidos (a veces denominada “homología dura”).

La variante de Blad activa homóloga normalmente difiere de la secuencia de polipéptido de la SEQ ID NO: 4 por sustitución, inserción u delección, por ejemplo, de 1, 2, 3, 4, 5 a 8 o más sustituciones, delecciones o inserciones. Las sustituciones preferentemente son ‘conservadoras’, es decir que un aminoácido se puede sustituir por un aminoácido similar, por lo que aminoácidos similares comparten uno de los siguientes grupos: restos aromáticos (F/H/W/Y), restos alifáticos no polares (G/A/P/I/L/V), alifáticos polares no cargados (C/S/T/M/N/Q) y alifáticos polares cargados (D/E/K/R). Los subgrupos preferidos comprenden: G/A/P; I/L/V; C/S/T; N/Q; D/E y K/R.

Un polipéptido antimicrobiano que comprende Blad o una variante activa del mismo (como se ha descrito anteriormente) puede consistir en Blad o una variante activa del mismo con cualquier número de restos de aminoácidos añadidos al extremo N y/o al extremo C a condición de que el polipéptido conserve la actividad antimicrobiana (una vez más, véase a continuación una descripción del nivel de dicha actividad y cómo medirla).

Preferentemente, se añaden no más de 300 restos de aminoácidos a cualquiera o ambos extremos de Blad o una variante activa del mismo, más preferentemente no más de 200 restos de aminoácidos, preferentemente no más de 150 restos de aminoácidos, preferentemente no más de 100 restos de aminoácidos, preferentemente no más de 80, 60 o 40 restos de aminoácidos, mucho más preferentemente no más de 20 restos de aminoácidos.

Un polipéptido antimicrobiano que comprende (o consiste esencialmente en) Blad o una variante activa del mismo (como se ha descrito anteriormente) se puede utilizar en la invención en la forma de una proteína purificada (por ejemplo, eliminada de una fuente vegetal, animal o microbiana) y/o recombinante. La producción de una forma recombinante permite la producción de variantes activas de Blad.

Ya se han descrito en la técnica métodos de purificación de Blad de origen natural (por ejemplo, Ramos et al. (1997) *Planta* 203(1): 26-34 y Monteiro et al. (2010) *PLoS ONE* 5(1): e8542). Una fuente adecuada de Blad de origen natural es una planta del género *Lupinus*, tal como *Lupinus albus*, preferentemente un cotiledón de dicha planta, preferentemente cosechada entre aproximadamente 4 y aproximadamente 14 días después del inicio de la germinación, más preferentemente cosechada de 6 a 12 días después del inicio de la germinación (tal como 8 días después del comienzo de la germinación). Se desvelan métodos en la técnica para una extracción de proteína total que conduce a un extracto en bruto que comprende Blad y para una purificación de proteína de dicho extracto que conduce a un extracto parcialmente purificado, por ejemplo, que comprende el glucooligómero que contiene Blad que comprende Blad.

Para aislar Blad en sí entonces uno puede usar SDS-PAGE y/o, preferentemente, HPLC de fase inversa (FI) en una columna C-18.

Una manera alternativa de obtener un extracto parcialmente purificado que comprende el glucooligómero que comprende Blad es utilizar la actividad de unión a quitina de Blad. El glucooligómero se une de una manera muy fuerte a una columna de quitina como parte de una purificación por cromatografía de afinidad a quitina, aluyéndose con HCl 0,05 N. Son detalles de un ejemplo de este método de purificación los siguientes:

Cotiledones de plantas de altramuz de 8 días de edad se cosecharon y homogenizaron en Milli-Q más agua (pH ajustado a 8,0), que contenía CaCl_2 10 mM y MgCl_2 10 mM. El homogenizado se filtró a través de estopilla y se centrifugó a 30.000 g durante 1 hora a 4 °C. El sedimento posteriormente se suspendió en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, que contenía NaCl al 10 % (p/v), EDTA 10 mM y EGTA 10 mM, se agitaron durante 1 hora a 4 °C y se centrifugaron a 30.000 g durante 1 hora a 4 °C. La fracción de globulina total, contenida en el sobrenadante, se precipitó con sulfato de amonio (561 g/l), se dejó agitando en frío durante 1 hora y se centrifugó a 30.000 g durante 30 minutos a 4 °C. El sedimento obtenido se disolvió en tampón de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, se desaló en columnas PD-10 equilibradas en el mismo tampón y se hizo pasar a través de una columna de cromatografía de afinidad a quitina preequilibrada en el mismo tampón. La columna se lavó con tampón de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 y las proteínas unidas se eluyeron con HCl 0,05 N. Las fracciones eluidas se neutralizaron de inmediato con Tris 2 M y las fracciones pico se agruparon, se liofilizaron y se analizaron por SDS-PAGE.

Para la preparación de la columna de quitina, se obtuvo quitina en bruto de Sigma y se procesó de la siguiente manera: la muestra de quitina se lavó exhaustivamente con Milli-Q más agua, seguido de HCl 0,05 N. Después se lavó con carbonato de sodio al 1 % (p/v) y después con etanol, hasta que la absorbancia del lavado fue inferior a 0,05. Después se compactó quitina en una punta de pipeta y se equilibró con tampón de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5

Se conocen bien métodos de producir proteínas recombinantes en la técnica. Dichos métodos como se aplican en el presente documento implicarán insertar el polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende Blad o una variante activa del mismo en un vector de expresión adecuado – permitiendo la yuxtaposición de dicho polinucleótido con uno o más promotores (por ejemplo, un promotor inducible, tal como T7lac) y con otros polinucleótidos o genes de interés – introducir el vector de expresión en una célula u organismo adecuados (por ejemplo, *Escherichia coli*), expresar el polipéptido en la célula u organismo transformado y eliminar el polipéptido recombinante expresado de esa célula u organismo. Para ayudar a dicha purificación, el vector de expresión se puede construir de modo que el polinucleótido adicionalmente codifique, por ejemplo, un marcador terminal que pueda ayudar en la purificación: por ejemplo, un marcador de restos de histidina para purificación de afinidad. Una vez purificado el polipéptido recombinante, el marcador de purificación se puede eliminar del polipéptido, por ejemplo, por corte proteolítico.

En una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende (o consiste esencialmente en) Blad o una variante activa del mismo, dicho polipéptido está preferentemente en forma parcialmente purificada, más preferentemente en forma purificada. Dicho polipéptido está preferentemente en forma parcialmente purificada, más preferentemente en forma purificada. Dicho polipéptido está parcialmente purificado cuando está presente en un ambiente carente de uno o más de otros polipéptidos a los que se asocia naturalmente y/o está representado por al menos aproximadamente el 10 % de la proteína total presente. Dicho polipéptido se purifica cuando está presente en un ambiente carente de todos o la mayoría de otros polipéptidos a los que se asocia naturalmente. Por ejemplo, Blad purificado significa que Blad representa al menos el aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos el aproximadamente 70 % al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al

menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 % o al menos aproximadamente el 99 % de la proteína total en una composición.

5 En una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende (o consiste esencialmente en) Blad o una variante activa del mismo, el contenido de proteína *Lupinus* puede consistir esencialmente en el glucooligómero que contiene Blad que comprende un polipéptido que comprende (o consiste esencialmente en) Blad o una variante activa del mismo.

10 Una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende (o que consiste esencialmente en) Blad también puede ser una formulación que comprende otro compuesto o compuestos añadidos a la composición por el experto en la materia. En realizaciones preferidas, dicha formulación es una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende (o que consiste esencialmente en) Blad y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

15 *Dianas microbianas*

La invención se refiere al uso de Blad como un compuesto antimicrobiano, es decir, para inhibir el crecimiento de o destruir microorganismos que son patógenos para seres humanos o animales. Dichos microorganismos incluyen, en particular, bacterias y hongos. Dichos microorganismos patógenos son capaces de provocar una enfermedad infecciosa o cualquier otra afección (por ejemplo, intoxicación alimentaria, alergia) en seres humanos y/o animales y pueden afectar o infectar, por ejemplo, los ojos, la piel, heridas, el tracto respiratorio superior, los pulmones, el tracto gastrointestinal, el tracto genitourinario, los riñones, el hígado, el sistema nervioso y/o el sistema cardiovascular (por ejemplo, el torrente sanguíneo). Dichos microorganismos patógenos pueden ser inherentemente patógenos o pueden ser oportunistas (es decir, no provocan enfermedad en un hospedador sano sino en un hospedador con un sistema inmunitario comprometido). Dichos microorganismos patógenos adicional o alternativamente pueden provocar afecciones al liberar compuestos que son tóxicos para seres humanos o animales.

Se puede usar Blad como un antimicrobiano contra patógenos bacterianos grampositivos y gramnegativo. Dianas bacterianas particularmente preferidas incluyen especies de *Pseudomonas* patógenas, tales como *P. aeruginosa*, *Pseudomonas oryzae* y *Pseudomonas plecoglossicida* (mucho más preferentemente *P. aeruginosa*), especies de *Listeria*, tales como *L. monocytogenes* y *Listeria ivanovii* (mucho más preferentemente, *L. monocytogenes*), especies de *Bacillus* patógeno, tales como *B. Subtilis*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus cereus* (mucho más preferentemente *B. Subtilis*), especies de *Staphylococcus* patógeno, tales como *S. aureus* (incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina [MRSA]), *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus schleiferi* y *Staphylococcus caprae* (mucho más preferentemente *S. aureus*), especies de *Salmonella* patógeno, tales como sub-especies de *Salmonella* entérica tales como *Salmonella arizonae*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella dublin*, *Salmonella typhisuis* y *Salmonella brandenburg* (mucho más preferentemente *S. enteritidis* o *S. typhi*) y especies de *Campylobacter* patógeno tales como *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* (mucho más preferentemente *C. jejuni*). En realizaciones preferidas, Blad se usa contra patógenos que pueden provocar inflamación y sepsis generalizadas (por ejemplo, *p. aeruginosa*), cólera (por ejemplo, *V. cholerae*), Meningitis (por ejemplo, *L. monocytogenes*, *Haemophilus influenzae* tipo b, *Neisseria meningitidis* o *Streptococcus pneumoniae*), neumonía (por ejemplo, *S. pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* o *S. aureus*), estreptococo (por ejemplo, *Streptococcus pyogenes*), tuberculosis (por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii* y *Mycobacterium microti*), tifoidea (*S. typhi*) o intoxicación alimentaria (por ejemplo, especies patógenas de uno de los siguientes géneros: *Listeria*, *Staphylococcus* y *Salmonella*).

Blad se puede usar como un antimicrobiano contra patógenos fúngicos unicelulares (levadura) y multicelulares (filamentosos, moho). Las dianas fúngicas particularmente preferidas incluyen especies de *Candida* patógena, tales como *C. albicans*, *Candida glabrata*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida dubliniensis*, especies de *Alternaria* patógenas, tales como *A. Alternata* y *Alternaria molesta*, especies de *Aspergillus* patógenas, tales como *A. Fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus clavatus*, especies de *Fusarium* patógenas, tales como *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides* y *Fusarium proliferatum*, especies de *Cryptococcus* patógenas, tales como *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus* y *Cryptococcus gattii* y especies de *Trichosporon* patógenas, tales como *Trichosporon ovoides*, *Trichosporon inkin*, *Trichosporon asahii*, *Trichosporon mucoides*, *Trichosporon asteroides* y *Trichosporon cutaneum* (todas previamente consideradas bajo el nombre general de *Trichosporon beigeli*) y *Trichosporon dermatis*, *Trichosporon dohaense* y *Trichosporon loubieri*. En realizaciones preferidas, Blad se usa contra patógenos que pueden provocar infección fúngica invasiva (IFI), que por lo general se define como una infección fúngica sistémica, generalizada y visceral que con frecuencia es grave y/o potencialmente mortal (a diferencia de enfermedades fúngicas superficiales, locales, benignas, autolimitantes). Los hongos particularmente preferidos que producen IFI incluyen especies patógenas de *Candida*, *Aspergillus* o *Alternaria* como se han definido anteriormente, preferentemente *C. albicans*, *A. Fumigatus* o *A. Alternata*, mucho más preferentemente *C. albicans* o *A. Fumigatus*.

El experto en la materia podrá identificar, a través de métodos habituales, una concentración adecuada con la que usar un polipéptido antimicrobiano que comprende (o consiste esencialmente en) Blad (o una variante activa del mismo) como antimicrobiano en cualquier entorno particular. Preferentemente, por ejemplo, Blad se usa a una concentración de al menos 1 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 20 µg/ml, al menos 50 µg/ml o al menos 100 µg/ml y hasta 500 µg/ml, hasta 600 µg/ml, hasta 1 mg/ml, hasta 2,5 mg/ml, hasta 5 mg/ml o hasta 10 mg/ml. Preferentemente la concentración de Blad seleccionada es de entre 10 µg/ml y 5 µg/ml, más preferentemente de entre 50 µg/ml y 2,5 mg/ml, más preferentemente de entre 100 µg/ml y 1 mg/ml, e incluso más preferentemente de entre 100 µg/ml y 600 µg/ml (tal como aproximadamente 250 µg/ml). Los inventores han proporcionado evidencia (véanse los ejemplos 4 y 5) de que Blad no es tóxico para el hospedador hasta al menos 400 µg/ml.

De manera sorprendente, los inventores han descubierto que una combinación de Blad con un agente quelante (por ejemplo, EDTA) produce un efecto antimicrobiano sinérgico. Por tanto, preferentemente, se usa un agente quelante para mejorar la actividad antimicrobiana de un polipéptido que comprende (o que consiste esencialmente en) Blad (o una variante activa del mismo) y el uso de dicho agente quelante puede disminuir la concentración de dicho polipéptido antimicrobiano requerido para lograr un nivel particular de actividad antimicrobiana. Un agente quelante (también conocido como un quelante, un quelador o un agente secuestrante) es cualquier compuesto que se une a un ion metálico para formar un complejo no covalente y reduce la actividad del ion. Los agentes quelantes adecuados incluyen carboxilatos de poliamino tales como EDTA (ácido etileno-diaminatetraacético) y EGTA (etilenglicol bis(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético). Preferentemente, se usa EDTA como el agente quelante, preferentemente a una concentración de al menos 10 µg/ml, al menos 50 µg/ml o al menos 100 µg/ml y hasta 500 µg/ml, hasta 1 mg/ml, hasta 5 mg/ml, hasta 10 mg/ml o hasta 20 mg/ml. Preferentemente, se usa EDTA a una concentración de entre 0,1 mg/ml y 1 mg/ml.

Resultados

El polipéptido antimicrobiano que comprende (o que consiste esencialmente en) Blad (o una variante activa del mismo) se puede usar para inhibir el crecimiento de un microorganismo patógeno humano/animal (significando que tiene actividad microbiostática) y/o para destruir dicho microorganismo (significando que tiene actividad microbicida). El experto en la materia podrá identificar una dosis adecuada y/o concentración para obtener una inhibición de crecimiento particularmente deseado o destrucción del microorganismo.

Preferentemente, cuando se usa como un agente microbiostático, el polipéptido antimicrobiano reduce la tasa de destrucción en un 10 %, más preferentemente en un 50 %, más preferentemente en un 75 %, más preferentemente en un 90 %, más preferentemente en un 95 %, más preferentemente en un 98 %, más preferentemente en un 99 % e incluso más preferentemente en un 99,9 % en comparación con condiciones equivalentes en las que el polipéptido antimicrobiano no está presente. Mucho más preferentemente el polipéptido antimicrobiano evita cualquier crecimiento del microorganismo.

Preferentemente, cuando se usa como un agente microbicida, el polipéptido antimicrobiano destruye el 10 % de la población de los microorganismos, más preferentemente el 50 % de dicha población, más preferentemente el 75 % de dicha población, más preferentemente el 90 % de dicha población, más preferentemente el 95 % de dicha población, más preferentemente el 98 % de dicha población, más preferentemente el 99 % de dicha población e incluso más preferentemente el 99,9 % de dicha población en comparación con condiciones equivalentes en las que el polipéptido antimicrobiano no está presente. Mucho más preferentemente, el polipéptido antimicrobiano destruye toda la población del microorganismo.

Cuando se usan para prevenir o tratar una infección en o sobre un ser humano o animal el polipéptido antimicrobiano se usa preferentemente en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir una cantidad que proporcione un nivel de inhibición de crecimiento y/o destrucción de un microorganismo de modo que se consiga un nivel clínicamente detectable de prevención o abrogación de la infección. Preferentemente, la cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido antimicrobiano no es tóxica para el sujeto humano o animal. Se pretende que dicha cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido antimicrobiano sea terapéuticamente eficaz cuando se administre como parte de una composición que comprenda el polipéptido antimicrobiano.

De manera sorprendente, los inventores han descubierto que, a concentraciones similares (en masa), Blad es aproximadamente tan potente como la anfotericina B y más potente que el fluconazol contra *C. albicans* y *A. Fumigatus* (en términos de actividad fungicida o fungostática). Esto es un resultado sorprendente dada (i) la masa molecular mucho mayor de Blad en comparación con las moléculas orgánicas relativamente pequeñas de anfotericina B y fluconazol y (ii) la naturaleza no tóxica y comestible de Blad para seres humanos y otros animales.

Usos y métodos médicos

Como se ha analizado anteriormente los inventores proporcionan una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano definido para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia o profilaxis.

Los inventores también proporcionan la composición para su uso en un método de prevención o tratamiento de una infección en o sobre un sujeto humano o animal por un microorganismo.

Dicha composición se puede administrar por inyección (tal como intradérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraósea e intraperitoneal), entrega de partículas transdérmica, inhalación, por vía tópica, por vía oral o por vía transmucosa (tal como nasal, sublingual, vaginal o rectal).

Preferentemente, dicha composición comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica se puede formular como una preparación farmacéutica convencional. Esto se puede hacer usando químicas y metodologías de formulación farmacéutica convencionales, que están disponibles para los expertos en la materia. Por ejemplo, un polipéptido antimicrobiano que comprende Blad (o una variante activa del mismo) se puede combinar con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables para proporcionar una preparación líquida. También puede haber sustancias adyuvantes, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH y similares.

Los vehículos, diluyentes y sustancias adyuvantes en general son agentes farmacéuticos que se pueden administrar sin toxicidad indebida y que por sí mismos no inducirán una respuesta inmunitaria en el individuo que recibe la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, líquidos tales como agua, solución salina, polietilenglicol, ácido hialurónico, glicerol y etanol. También se pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácido mineral tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfato, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. También se prefiere, aunque no se requiere, que la preparación contenga un vehículo farmacéuticamente aceptable que sirva como estabilizador, particularmente ventajoso para una composición que comprende un polipéptido como Blad. Los ejemplos de vehículos adecuados que también actúan como estabilizadores para polipéptidos incluyen, sin limitación, calidades farmacéuticas de dextrosa, sacarosa, lactosa, trehalosa, manitol, sorbitol, inositol, dextrano y similares. Otros vehículos adecuados incluyen, una vez más sin limitación, almidón, celulosa, fosfatos de sodio o calcio, ácido cítrico, ácido tartárico, glicina, polietilenglicoles de peso molecular alto (PEG) y una combinación de los mismos.

Una vez formulada, la composición se puede administrar a un sujeto *in vivo* usando una diversidad de vías y técnicas conocidas. Por ejemplo, las preparaciones líquidas se pueden proporcionar como una solución, suspensión o emulsión inyectable y se pueden administrar por inyección parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraósea o intraperitoneal usando una aguja y jeringa convencionales o usando un sistema de inyección de chorro líquido. También se pueden administrar preparaciones líquidas por vía tópica a los ojos, a la piel, el cabello o el tejido mucoso (por ejemplo, nasal, sublingual, vaginal o rectal) o pueden proporcionarse en forma de una pulverización finamente dividida adecuada para la administración respiratoria o pulmonar. Otros modos de administración incluyen la administración oral, supositorios y técnicas de administración transdérmica activa o pasiva. En realizaciones preferidas, el polipéptido antimicrobiano se formula en una composición adecuada como una loción tópica, crema para manos, solución de colirio, champú o acondicionador.

El sujeto que necesita el polipéptido antimicrobiano puede ser cualquier individuo humano o animal. En realizaciones preferidas, el polipéptido antimicrobiano se puede usar para prevenir una infección en sujetos en riesgo particular de adquirir una infección por un microorganismo y/o para tratar una infección en sujetos en riesgo particular de ser incapaces de superar una infección microbiana sin intervención médica, tal como los jóvenes (tal como un individuo menor de 16 años, tal como un individuo menor de 5 años, 3 años, 2 años, 1 año, 6 meses o 1 mes), los ancianos (tal como un individuo mayor de 70 años, tal como un individuo mayor de 80 años o 90 años), aquellos con un sistema inmunitario comprometido (tales como aquellos con una inmunodeficiencia primaria, aquellos con una inmunodeficiencia adquirida (por ejemplo, aquellos con SIDA) y aquellos con un sistema inmunitario suprimido como resultado de un tratamiento tal como quimioterapia o pautas de fármacos inmunosupresores), aquellos que están críticamente enfermos o aquellos que pueden tener una exposición particularmente alta a microorganismos patógenos (por ejemplo, profesionales médicos).

Otros usos y métodos antimicrobianos

Los inventores también proporcionan el uso de una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende Blad o una variante activa del mismo para destruir o inhibir el crecimiento de, un microorganismo que es patógeno para un ser humano o un animal en un sitio que no está sobre o en el cuerpo humano o animal. A este extremo, también proporcionan un método de destrucción o inhibición del crecimiento de un microorganismo que es patógeno para un ser humano o un animal en un sitio que no está sobre o en el cuerpo humano o animal, comprendiendo dicho método administrar a dicho sitio una composición que comprende una cantidad eficaz de un polipéptido antimicrobiano que comprende Blad o una variante activa del mismo. Dicha cantidad eficaz es una cantidad que proporciona un nivel de inhibición de crecimiento y/o destrucción de un microorganismo de modo que se consiga un nivel detectable de prevención o abrogación de la colonización microbiana. Preferentemente, la cantidad eficaz del polipéptido antimicrobiano es no tóxico para el sujeto humano o animal. Se pretende que dicha cantidad eficaz del polipéptido antimicrobiano sea eficaz cuando se administre como parte de una composición que comprenda el polipéptido antimicrobiano.

En estas realizaciones, se pretende que el polipéptido antimicrobiano se use como un desinfectante para prevenir el crecimiento de y/o la destrucción de un microorganismo patógeno en un artículo que se debe ingerir por o colocar directamente sobre o en, un ser humano o animal o una superficie que necesita el mismo (por ejemplo, una superficie que puede, directa o indirectamente, tener contacto con un ser humano o animal) de modo que se reduzca el riesgo de:

- (i) que un ser humano o animal se infecte con dicho microorganismo patógeno; o
- (ii) que un ser humano o animal haga contacto con una toxina liberada por un microorganismo patógeno.

En realizaciones preferidas, el polipéptido antimicrobiano se usa dentro o en un alimento para prevenir el crecimiento de un microorganismo patógeno humano/animal en o dentro de ese alimento o para destruir un microorganismo patógeno humano/animal ya presente en o dentro de ese alimento. De esta manera, el polipéptido antimicrobiano se puede usar para reducir el riesgo de que un ser humano o animal se infecte con un microorganismo patógeno o de que un ser humano o animal ingiera una toxina liberada por un microorganismo patógeno, como resultado de ingerir ese alimento. En estas realizaciones se prefiere particularmente que dicho microorganismo patógeno sea capaz de provocar una intoxicación alimentaria (por ejemplo, directamente o a través de una toxina liberada). Por alimento se quiere decir cualquier sustancia líquida o sólida destinada al consumo por razones de nutrición o placer. La composición que comprende el polipéptido antimicrobiano se puede mezclar, por ejemplo, con otros componentes del alimento durante la preparación del alimento o se puede aplicar, por ejemplo, a la superficie del alimento (por ejemplo, como una película líquida o una pulverización). Los alimentos particulares considerados en estas realizaciones incluyen agua, bebidas gaseosas tales como zumos de frutas, bebidas alcohólicas, carne cruda, carne de ave cocinada, huevos, leche, crema, helado, queso, vegetales crudos y frutas, alimentos procesados (en particular pertinentes para, por ejemplo, *L. monocytogenes*, *V. cholerae*, especies patógenas de *Staphylococcus*, especies de *Salmonella* y especies patógenas de *Campylobacter*) y nueces y alimentos con almidón tales como pan, arroz y patatas (en particular pertinentes para especies patógenas de *Aspergillus*).

En una realización preferida alternativa, el polipéptido antimicrobiano se usa dentro o sobre un dispositivo o instrumento médico – cualquier dispositivo colocado en o dentro del cuerpo para realizar una función diagnóstica, terapéutica o quirúrgica – tal como un tejido corporal artificial, marcapasos, endoprótesis vasculares, armazones proteicos (scaffolds), válvulas, termómetros, jeringas, agujas hipodérmicas, equipo de monitorización, ventiladores, desfibriladores cardíacos, máquinas de corazón pulmón, unidades de EEG y ECG, dispositivos de ultrasonido, taladros, sierras, cuchillos, bisturíes, lengüetas, tijeras, grapas y puntos y similares. De esta manera, el polipéptido antimicrobiano se puede usar para prevenir la infección de un cuerpo que hace contacto con un dispositivo o instrumento durante un procedimiento médico.

En realizaciones preferidas alternativas, el polipéptido antimicrobiano se usa sobre una superficie que necesita el mismo (por ejemplo, una superficie que, directa o indirectamente, puede hacer contacto con un ser humano o animal). La superficie a la que el polipéptido antimicrobiano se puede aplicar se puede ubicar dentro de un medio ambiente donde:

- (a) un examen médico, diagnóstico o tratamiento se ha de realizar;
- (b) un alimento se ha de preparar o de lo contrario se ha manipular o almacenar;
- (c) un lavado personal y/o sanitización se ha de realizar; y/o
- (d) una persona en riesgo particular de

- (i) adquirir una infección por un microorganismo; y/o
- (ii) ser incapaz de evitar una infección microbiana sin intervención médica;

se sitúa (y ejemplos de dichas personas se han descrito anteriormente).

Los ejemplos de dichas superficies incluyen cualquiera dentro de una fábrica industrial de alimentos y baldas/bancos dentro de un supermercado.

La superficie a la que se puede aplicar el polipéptido antimicrobiano puede ser un suelo o pared de un edificio (o una sala del mismo) o una superficie de un artículo dentro de dicha sala o edificio.

Los edificios particulares previstos incluyen hospitales y otros edificios sanitarios, escuelas y otros centros de cuidado de niños, edificios para el cuidado de ancianos, restaurantes y otros comedores, lugares para la preparación, el procesamiento y/o el almacenamiento de alimentos (por ejemplo, mercados, tiendas de alimentación, supermercados y fábricas industriales de alimentos) y viviendas privadas. Las salas particulares previstas incluyen todas aquellas dentro de un entorno sanitario, especialmente quirófanos, departamentos de accidentes y urgencias, salas de cuidados intensivos y de pacientes, así como cocinas, baños, aseos, restaurantes y salones de preparación/procesamiento de alimentos.

Ejemplos

En los siguientes ejemplos BLAD denota el glucooligómero que contiene Blad de origen natural que comprende el polipéptido Blad de 20 kD, purificado como en Ramos et al. (1997) *Planta* 203(1): 26-34: véanse las partes “*Plant material and growth conditions*” y “*Purification of proteins*” de la sección *Materials and Methods* de ese documento.

Definiciones:

CMI – Concentración mínima inhibidora: la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo.

CMF/CMB – Concentración mínima fungicida/bactericida (o concentración mínima letal): la concentración más baja de un agente antimicrobiano necesario para destruir el 99,9 % del inóculo inicial después de 24 horas en una serie normalizada de condiciones.

Curvas de tiempo-destrucción: La determinación de la “destrucción” de un aislado con el tiempo por uno o más agentes antimicrobianos en condiciones controladas se conoce como el método de tiempo-destrucción. Es un método en caldo en el que la velocidad de destrucción de un inóculo fijo se determina muestreando tubos o frascos que contienen control y agente microbiano (organismo, no fármaco), a ciertos intervalos de tiempo y determinando el recuento de colonias supervivientes (ufc/ml) al sembrar por extensión cada muestra en una placa de agar.

Ejemplo 1 – Actividad bactericida de BLAD.

CMI y CMB de BLAD para diversas especies bacterianas (usando medio de Mueller-Hinton):

Especie bacteriana	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32-256	128-256
<i>Listeria monocytogenes</i>	8	> 512
<i>Bacillus subtilis</i>	4	> 512
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	> 512
<i>Salmonella thyphimurium</i>	64	128

Curvas de tiempo-destrucción para BLAD con (A) *Listeria monocytogenes* y (B) *Pseudomonas aeruginosa*: véase la figura 1.

Contra *L. monocytogenes* y *P. aeruginosa*, BLAD es bacterioestático a 100 µg/ml y bactericida a 250 µg/ml.

Datos de halo de inhibición para BLAD contra (A) *Staphylococcus aureus*, (B) *Bacillus subtilis*, (C) *Pseudomonas aeruginosa* y (D) *Listeria monocytogenes*: véase la figura 2.

El crecimiento de todas las especies bacterianas sometidas a ensayo en PCA se inhibió con cantidades crecientes de BLAD en los discos de tratamiento, de 20 µg (discos derechos inferiores) a 100 µg (discos izquierdos inferiores) y a 200 µg (discos superiores) (incubación 24 horas – los efectos se observaron durante varios días).

Ejemplo 2 – Actividad fungicida de BLAD.

CMI y CMF de BLAD para especies de *Candida* (usando medio RPMI)

Especie <i>Candida</i>	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)
<i>Candida albicans</i>	16-32	256
<i>Candida dubliniensis</i>	32-64	256
<i>Candida glabrata</i>	1-2	> 512
<i>Candida lusitaneae</i>	32-64	> 512
<i>Candida parapsilosis</i>	32	> 512
<i>Candida tropicalis</i>	16-32	> 512

CMI y CMF de BLAD para especies de *Candida* (usando medio PDB a pH 7,5)

Especie <i>Candida</i>	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)
<i>Candida albicans</i>	2-4	4-8
<i>Candida dubliniensis</i>	2-4	8
<i>Candida glabrata</i>	2	16-64
<i>Candida lusitaneae</i>	2-4	8-32
<i>Candida parapsilosis</i>	2-4	64
<i>Candida tropicalis</i>	4	4-16

CMI y CMF de BLAD para diversos hongos filamentosos (usando medio RPMI)

Especie fúngica	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)
<i>Alternaria sp.</i>	64	> 512
<i>Aspergillus fumigatus</i>	32	> 512
<i>Aspergillus niger</i>	32-64	> 512
<i>Botrytis cinerea</i>	128	512
<i>Colletotrichum acutatum</i>	64	> 512
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	64	> 512
<i>Fusarium oxysporum</i>	64	> 512
NB – CMI para <i>Cryptococcus neoformans</i> medida a 0,25 – 1,0 µg/ml.		

- 5 Curva de tiempo-destrucción (A) y curva de crecimiento (B) para BLAD con *Candida albicans* en medio PDB: véase la figura 3.
- Contra *C. albicans*, BLAD es fungiestático a 10 µg/ml y fungicida a 100 µg/ml.
- 10 Curva de crecimiento para BLAD con *Candida albicans* en medio PDB a pH 7: véase la figura 4.
- Contra *C. albicans*, BLAD y anfotericina B son fungiestáticos a 10 µg/ml. A 100 µg/ml fluconazol meramente retrasa el crecimiento.
- 15 Datos de halo de inhibición para (A y B) BLAD y (C) anfotericina B o fluconazol contra *Candida albicans*: véase la figura 5.
- El crecimiento de *C. albicans* en agar de dextrosa de patata (PDA) pH 7,5 se inhibió con cantidades crecientes de BLAD en los discos de tratamiento, de 20 µg (A, disco inferior) a 50 µg (B, disco inferior) a 100 µg (B, disco superior) y a 200 µg (A, disco superior) (3 días de incubación). Esto se compara muy favorablemente con la inhibición lograda con 20 µg de anfotericina B (C, disco superior) y 25 µg fluconazol (C, disco inferior).
- 20 Datos de halo de inhibición para BLAD contra *Cryptococcus neoformans* en (A) PDA y (B) PDA pH 7,5 (incubación de 3 días): véase la figura 6.
- 25 El crecimiento de *C. neoformans* se inhibió en ambos medios con cantidades de BLAD en aumento en los discos de tratamiento, aunque con mayor eficacia en PDA. I – discos superiores 200 µg, discos inferiores 10 µg; II – discos izquierdos superiores 50 µg, disco derecho superior 20 µg, disco inferior 100 µg.
- 30 Datos de halo de inhibición para BLAD contra *Aspergillus fumigatus* en (A) medio Mueller-Hinton (regla M44-A), (B) PDA o (C) PDA pH 7,5 (incubación de 3 días): véase la figura 7.
- El panel izquierdo muestra placas vistas desde arriba; el panel derecho muestra placas vistas desde abajo.
- 35 El crecimiento de *A. Fumigatus* se inhibió en todos los medios con cantidades de BLAD crecientes en los discos de tratamiento, aunque con mayor eficacia en PDA pH 7,5. I – discos superiores 200 µg, discos inferiores 10 µg; II – discos izquierdos superiores 50 µg, disco derecho superior 20 µg, disco inferior 100 µg.
- Datos de halo de inhibición para (A y B) BLAD y (C) anfotericina B o fluconazol contra *Aspergillus fumigatus* en PDA pH 7,5 (incubación de 6 días): véase la figura 8.
- 40 El crecimiento de *A. Fumigatus* en PDA pH 7,5 se inhibió con cantidades de BLAD crecientes en los discos de tratamiento, de 20 µg (A, disco inferior) a 50 µg (B, disco inferior) a 100 µg (B, disco superior) y a 200 µg (A, disco superior). Esto se compara muy favorablemente con la inhibición conseguida con 10 mg de anfotericina B (C, disco superior) y 100 mg de fluconazol (C, disco inferior). Se observaron resultados muy similares para *Trichosporon cutaneum* (datos no mostrados).
- 45 Ejemplo 3 – Efecto sinérgico de EDTA con BLAD con respecto a la actividad bactericida/fungicida contra patógenos humanos.
- 50 Curvas de tiempo-destrucción de BLAD y/o EDTA con (A) *Listeria monocytogenes*, (B) *Pseudomonas aeruginosa* y (C) *Candida albicans*: véase la figura 9.
- Contra *L. monocytogenes* ni BLAD 10 µg/ml ni EDTA 0,1 mg/ml inhiben el crecimiento, sino que una combinación de los dos es bacterioestática. Contra *P. aeruginosa*, BLAD a 50 µg/ml o EDTA a 1 mg/ml inhiben el crecimiento (es decir, ambos son bacterioestáticos) sino que una combinación de los dos es bactericida. Contra *C. albicans*, BLAD 10 µg/ml o EDTA 0,1 mg/ml inhiben el crecimiento (es decir, ambos son fungiestáticos), sino que una combinación de los dos es fungicida.
- 55

Ejemplo 4 – Estudio de toxicidad dérmica de BLAD en cobayas.

El estudio confidencial se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Técnica de Lisboa, a nombre del Instituto Superior de Agronomía (18 de julio de 2006 – 1 de agosto de 2006) usando la Guía de OECD para someter a ensayos productos químicos, N.º 402, Toxicidad Dérmica Aguda. El estudio se realizó de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio y el bienestar animal.

La toxicidad dérmica aguda de BLAD se evaluó después de la exposición a dosis única en cobayas, que se aceptan ampliamente como animales adecuados para estudios de toxicidad dérmica. BLAD se aplicó a la piel limpia en dos grupos de 10 animales cada uno, con dosificación a 200 µg/ml y 400 µg/ml respectivamente. Después de la exposición, los animales se mantuvieron en observación durante un periodo de 15 días, durante el cual se registraron la masa corporal, la morbilidad y la mortalidad.

Materiales y Métodos –

1. Materiales

Artículo de ensayo: se suministró BLAD a 5 mg/ml (líquido opaco de color amarillento, 0-4 °C) y se almacenó a -80 °C.

Animales: cobayas albinas; cepa: Dunkin Hartley (HsdPoc: DH) de Harlan Iberica, Barcelona.

Número de animales usados: 30; peso corporal: 400-449 g; edad: 6 semanas.

Alojamiento: los animales se colocaron de manera individual en cajas de polietileno con virutas de madera esterilizadas (Lignocel).

Condiciones ambientales:

a) Fotoperiodo: ciclos de luz/oscuridad durante 12 horas en 12 horas.

b) Ambiente controlado: una temperatura promedio 19/22 °C y una humedad promedio del 60 %.

Adaptación: los animales se mantuvieron en condiciones ambientales del ensayo durante siete días antes del comienzo del ensayo.

Alimento: Dieta Global 2014, Dieta de mantenimiento de roedores suministrada por Harlan Iberica, Barcelona, agua a demanda.

2. Métodos

Administración: los animales se afeitaron 48 horas antes del ensayo y solo los animales que no tenían lesiones en la piel se llevaron adelante en el estudio. Una alícuota de 1 ml (a 200 µg/ml o 400 µg/ml) se aplicó a la piel afeitada de cada animal.

Diseño del estudio: los 30 animales del estudio se dividieron en cuatro grupos, dos grupos de diez animales cada uno y dos grupos con cinco animales cada uno. Un grupo de diez animales se expuso a BLAD a 200 µg/ml (grupo de ensayo 1) y otro grupo de diez animales se expuso a BLAD a 400 µg/ml (grupo de ensayo 2). Los dos grupos de cinco animales sirvieron como controles: un grupo se expuso a agua (alícuota de 1 ml) mientras otro grupo no se sometió a ninguna administración, sino que se manipuló como todos los demás grupos.

Resultados: después de la exposición los animales se observaron a diario durante 15 días para registrar cualquier signo de morbilidad o incluso muerte. En términos de morbilidad, se puso atención particular a la posible aparición de lesiones en la piel en el sitio de exposición y a signos posibles de toxicidad general tales como cambios en los patrones de comportamiento normal. El peso corporal se evaluó de manera individual antes de la exposición y al final del periodo de ensayo.

Resultados –

A ninguna concentración de BLAD hubo signos de ningún cambio físico en el área de administración dérmica ni cambios en el comportamiento general o de bebida/comida. No se produjeron reacciones ni muerte tras la administración de BLAD. El aumento de la masa corporal fue similar en todos los grupos (y fue coherente con el aumento esperado de animales en desarrollo de esa edad joven).

Conclusiones – BLAD a concentraciones de hasta 400 µg/ml (y posiblemente mayor) no muestra toxicidad dérmica.

Ejemplo 5 – Estudio de toxicidad oral de BLAD en ratas albinas.

El estudio confidencial se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Técnica de Lisboa, a nombre del Instituto Superior de Agronomía usando la Guía de OECD para someter a ensayos productos químicos, N.º 401, Toxicidad Oral Aguda. El estudio se realizó de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio y el bienestar animal.

La toxicidad oral aguda de BLAD se evaluó después de exposición a dosis única en ratas, que se aceptan ampliamente como animales adecuados para estudios de toxicidad oral. Se administró BLAD por sonda en dos grupos de 10 animales cada uno, con dosificación a 200 µg/ml y 400 µg/ml respectivamente. Después de la exposición, los animales se mantuvieron en observación durante un periodo de 15 días, durante el cual se registraron la masa corporal, la morbilidad y la mortalidad. Después del periodo de observación, los animales se sacrificaron y se les practicó la necropsia.

Materiales y Métodos –

1. Materiales

Artículo de ensayo: se suministró BLAD a 5 mg/ml (líquido opaco de color amarillento, 0-4 °C) y se almacenó a -80 °C.

Animales: *Rattus norvegicus*; cepa: Wistar Hannover adquirido por el vivero de la Facultad de Medicina Veterinaria de Lisboa de Harlan Iberica, Barcelona.

Número de animales usados: 30; peso corporal: 250-300 g; edad: 10 semanas.

Alojamiento: los animales se colocaron de manera individual en cajas de polietileno con virutas de madera esterilizadas (Lignocel).

Condiciones ambientales:

a) Fotoperiodo: ciclos de luz/oscuridad durante 12 horas en 12 horas.

b) Ambiente controlado: una temperatura promedio de 19/22 °C y humedad promedio del 60 %.

Adaptación: los animales se mantuvieron en condiciones ambientales del ensayo durante siete días antes del comienzo del ensayo.

Alimento: Dieta Global 2014, Dieta de mantenimiento de roedores suministrada por Harlan Iberica, Barcelona, agua *ad libitum*.

2. Métodos

Administración: una alícuota de 1 ml (a 200 µg/ml o 400 µg/ml) se aplicó a cada animal por intubación oral (oro-esofágica), comúnmente conocida como sonda. La administración se realizó con una sonda de metal apropiada para la especie de animal utilizada. Los animales se sometieron a ayuno durante 18 horas antes de la administración y se alimentaron 3 horas después de la administración.

Diseño del estudio: los 30 animales del estudio se dividieron en cuatro grupos, dos grupos de diez animales cada uno y dos grupos con cinco animales cada uno. Un grupo de diez animales se expuso a BLAD a 200 µg/ml (grupo de ensayo 1) y otro grupo de diez animales se expuso a BLAD a 400 µg/ml (grupo de ensayo 2). Los dos grupos de cinco animales sirvieron como controles: un grupo se expuso a agua (alícuota de 1 ml) mientras otro grupo no se sometió a ninguna administración, sino que se manipuló como todos los demás grupos.

Resultados: después de la administración, los animales se observaron a diario durante 15 días para registrar cualquier signo de morbilidad o incluso muerte. El peso corporal se evaluó de manera individual antes de la exposición y al final del periodo de ensayo. Después del periodo de observación, los animales se sacrificaron (por asfixia en una atmósfera saturada con dióxido de carbono) para la examinación post-mortem posterior.

Resultados –

A ninguna concentración de BLAD hubo signos de ningún cambio físico en el área de administración dérmica ni cambios en el comportamiento general o de bebida/comida. No se produjeron reacciones secundarias ni muerte tras la administración de BLAD. El aumento de la masa corporal fue similar en todos los grupos (y fue coherente con el aumento esperado de animales en desarrollo de esa edad joven). La observación de la necropsia/macrocópica de los órganos de la cavidad torácica y abdominal no reveló ningún cambio.

Conclusiones – BLAD a concentraciones de hasta 400 µg/ml (y posiblemente mayores) no muestra toxicidad oral.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende la secuencia Blad que se muestra en la SEQ ID NO: 4 o una variante activa de la misma, para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia o profilaxis, en la que dicha variante activa tiene actividad antimicrobiana y comprende una secuencia que tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 60 % con cualquiera de la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la SEQ ID NO: 4 que tenga al menos 100 aminoácidos de longitud.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en un método de tratamiento o prevención de una infección en o sobre un sujeto por un microorganismo.
3. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprende adicionalmente:
 - un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. y/o
 - un agente quelante.
4. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la que el sujeto tiene un sistema inmunitario comprometido o está críticamente enfermo.
5. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 en la que el microorganismo es una bacteria o un hongo.
6. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 en la que:
 - la bacteria es una especie patógena de uno de los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Listeria*, *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Salmonella*, y/o
 - el hongo es una especie patógena de uno de los siguientes géneros: *Candida*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cryptococcus* y *Trichosporon*.
7. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 en la que el hongo puede provocar infecciones fúngicas invasivas y es preferentemente *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* o *Alternaria alternata*.
8. Uso de una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende la secuencia Blad que se muestra en la SEQ ID NO: 4 o una variante activa de la misma, en el que dicha variante activa tiene actividad antimicrobiana y comprende una secuencia que tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 60 % con cualquiera de la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la SEQ ID NO: 4 que tenga al menos 100 aminoácidos de longitud; para destruir, o inhibir el crecimiento de, un microorganismo que es patógeno para un ser humano o un animal en un sitio que no está en o sobre el cuerpo humano o animal.
9. Un uso de acuerdo con la reivindicación 8 en el que:
 - dicha composición se usa para desinfectar, con respecto a un microorganismo patógeno humano o animal, un artículo que se ha de ingerir por, o colocar directamente sobre o en, un ser humano o animal, o una superficie que necesita el mismo, y/o
 - dicha composición comprende adicionalmente un agente quelante.
10. Un uso de acuerdo con la reivindicación 9 en el que dicho artículo es un alimento o un dispositivo o instrumento médico.
11. Un uso de acuerdo con la reivindicación 9 en el que dicha superficie se sitúa dentro de un ambiente donde:
 - (a) un examen médico, diagnóstico o tratamiento se ha de realizar;
 - (b) un alimento se ha de preparar o de lo contrario se ha manipular o almacenar;
 - (c) un lavado personal y/o sanitización se ha de realizar; y/o
 - (d) una persona en riesgo particular de
 - (i) adquirir una infección por un microorganismo; y/o
 - (ii) ser incapaz de evitar una infección microbiana sin intervención médica;
 se sitúa.
12. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que el microorganismo es una bacteria o un hongo.

13. Un uso de acuerdo con la reivindicación 12 en el que:

- la bacteria es una especie patógena de uno de los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Listeria*, *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Salmonella* y/o
- el hongo es una especie patógena de uno de los siguientes géneros: *Candida*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cryptococcus* y *Trichosporon*.

5

14. Un uso de acuerdo con la reivindicación 13 en el que el hongo puede provocar una infección fúngica invasiva y es preferentemente *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* o *Alternaria alternata*.

10 15. Un método de destrucción, o inhibición del crecimiento de, un microorganismo que es patógeno para un ser humano o animal en un sitio que no está sobre o en el cuerpo humano o animal, comprendiendo dicho método administrar a dicho sitio una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende la secuencia

15 Blad que se muestra en la SEQ ID NO: 4 o una variante activa de la misma, en el que dicha variante activa tiene actividad antimicrobiana y comprende una secuencia que tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 60 % con cualquiera de la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la SEQ ID NO: 4 que tenga al menos 100 aminoácidos de longitud.

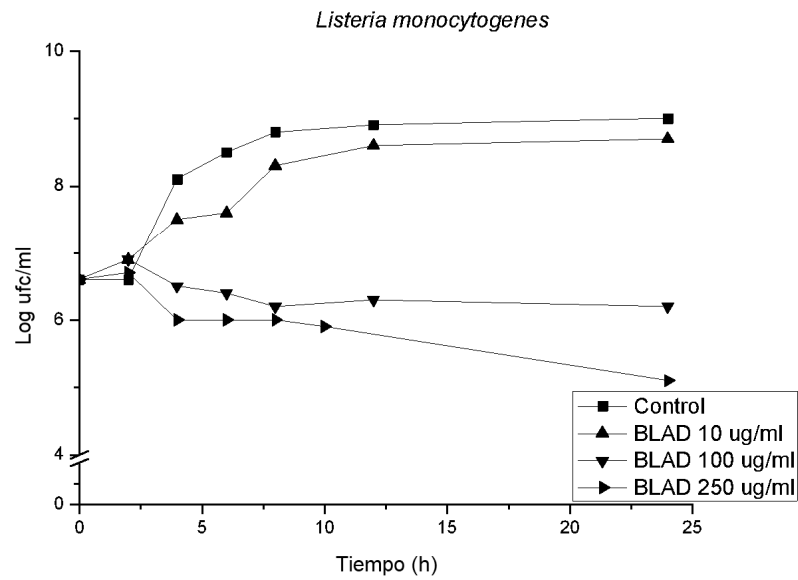
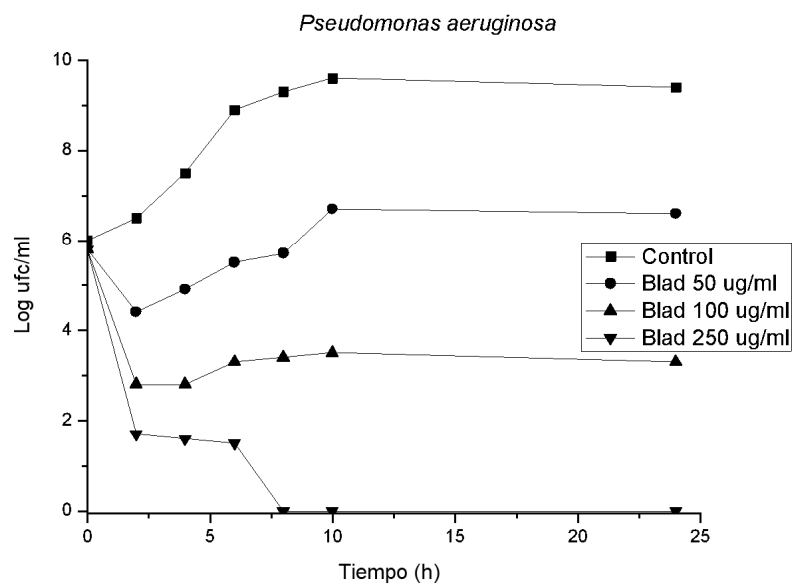
Figura 1**A****B**

Figura 2

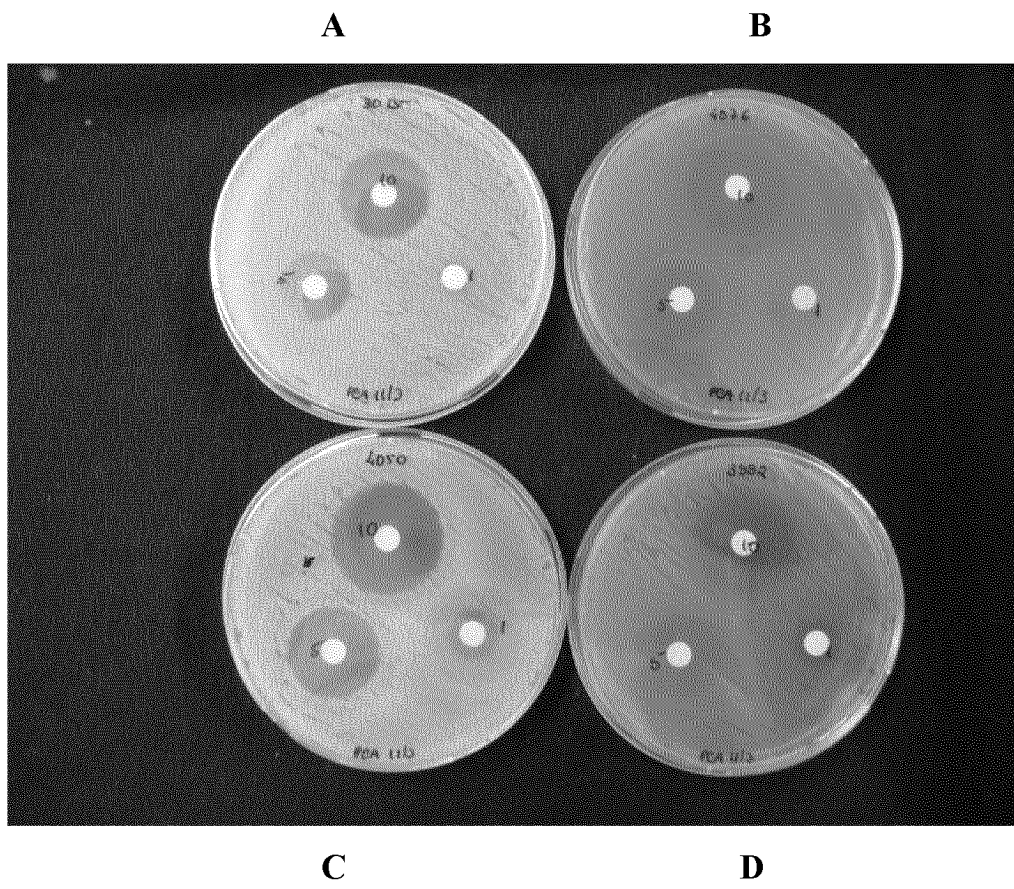
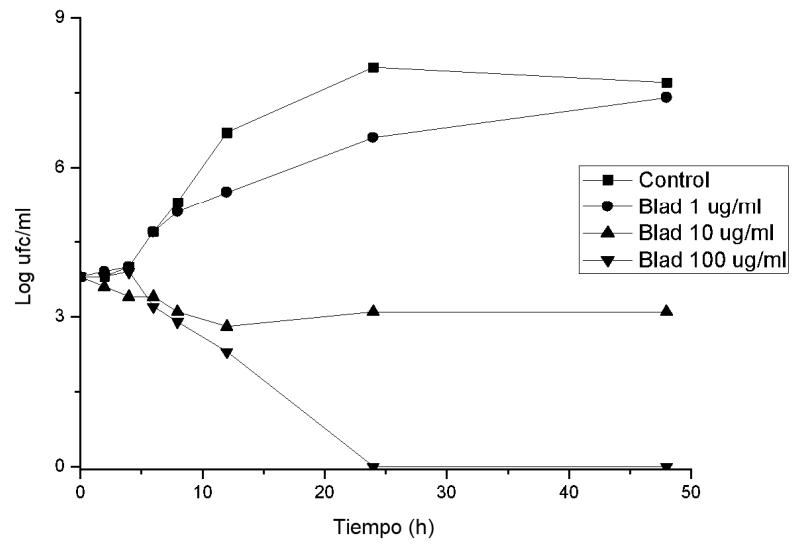


Figura 3

A



B

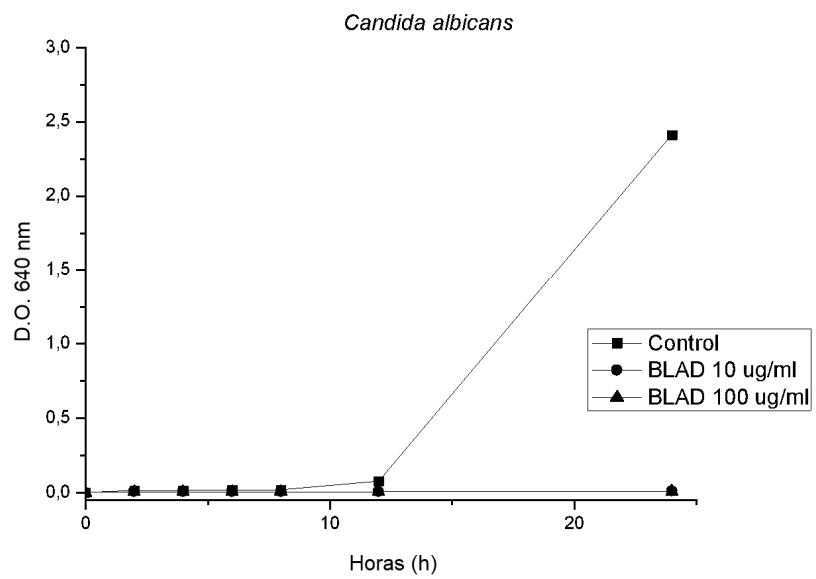


Figura 4

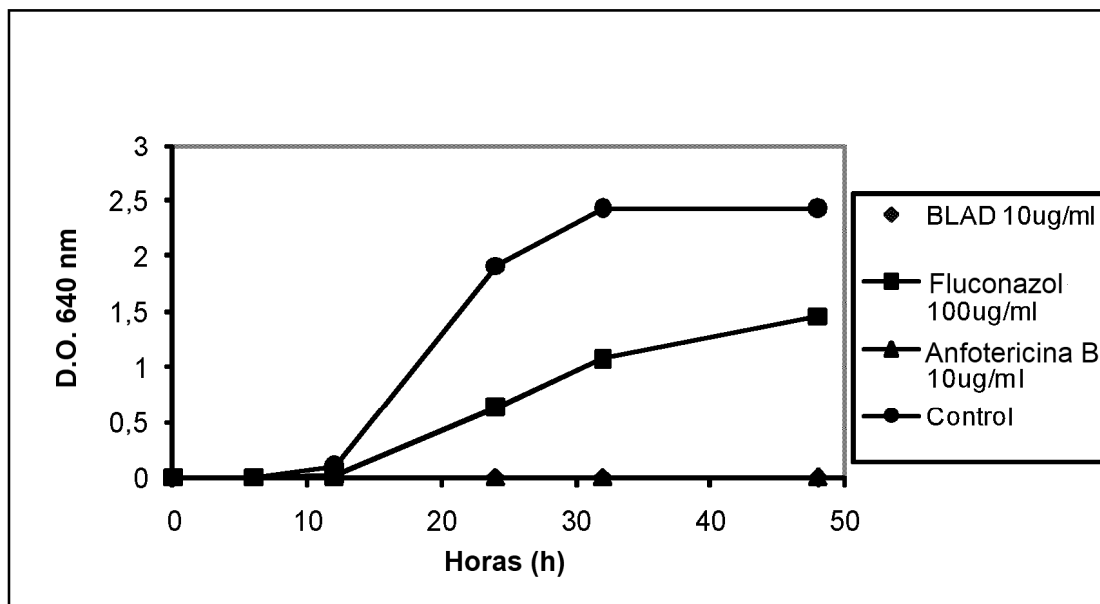


Figura 5

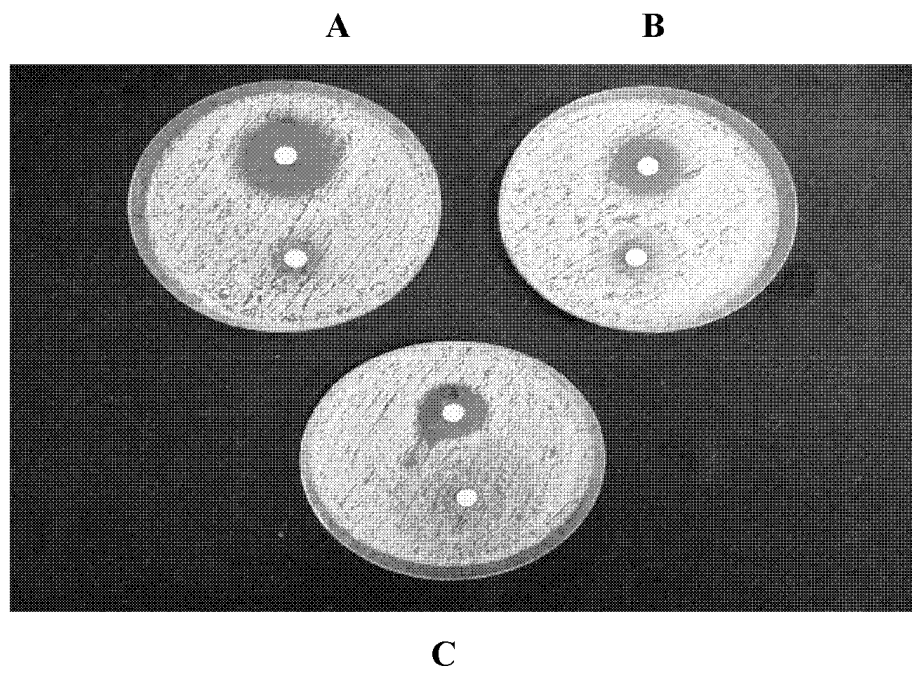


Figura 6

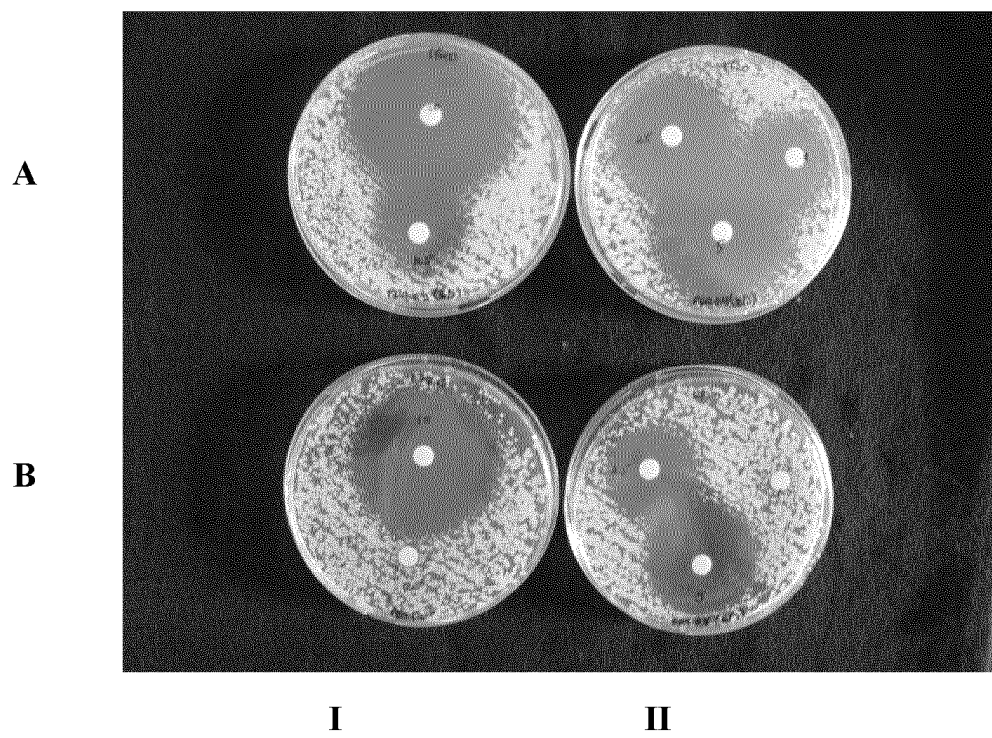


Figura 7

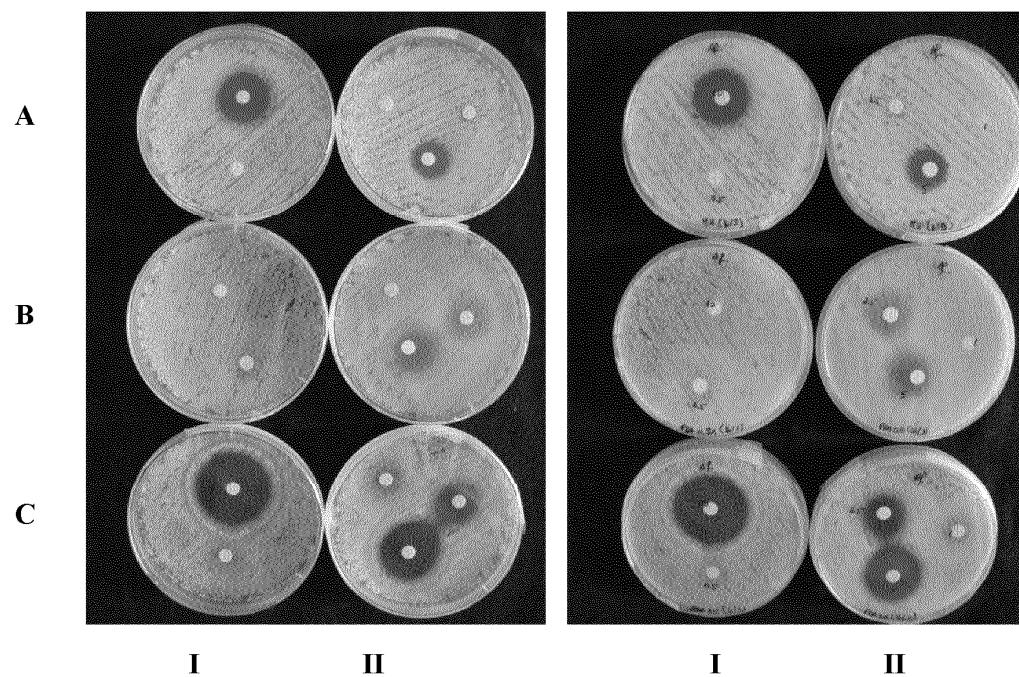


Figura 8

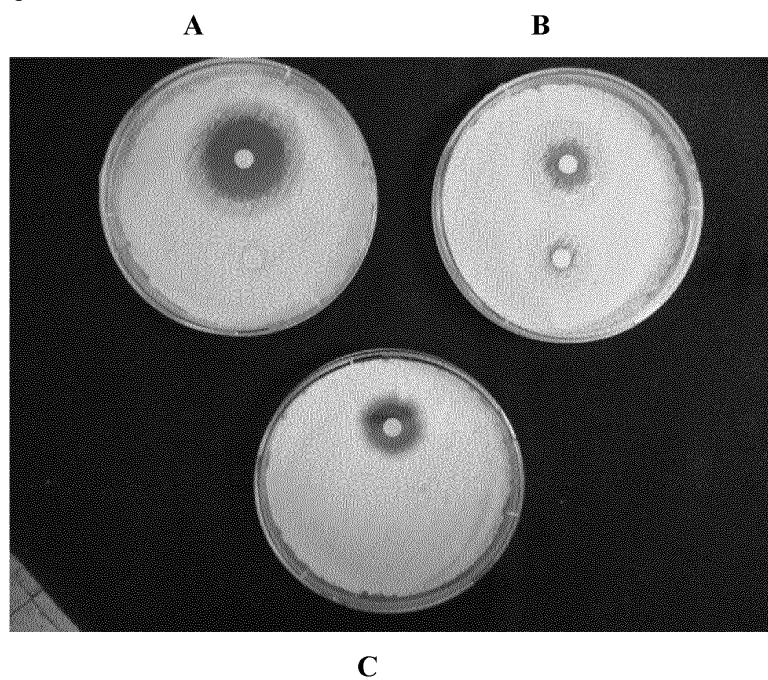
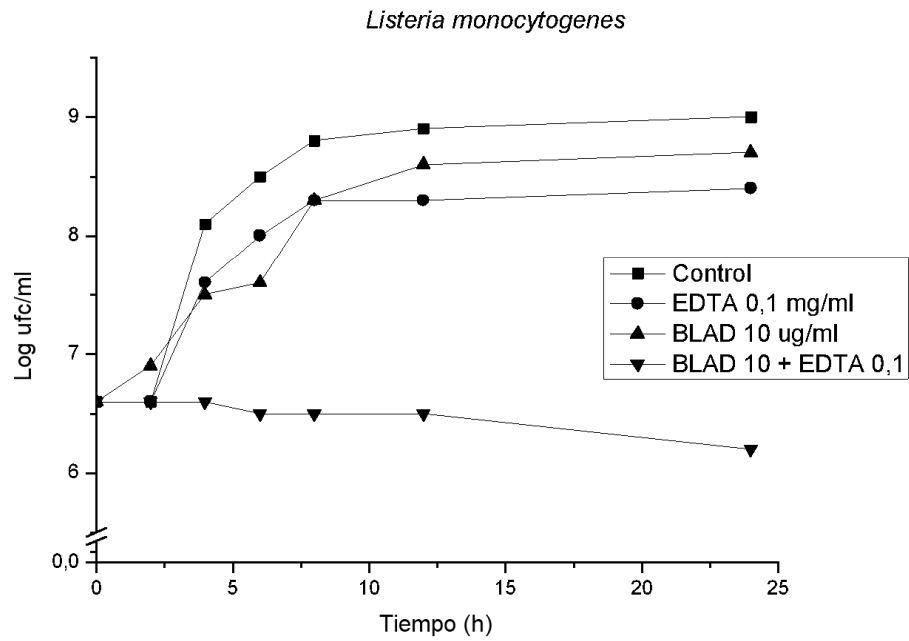
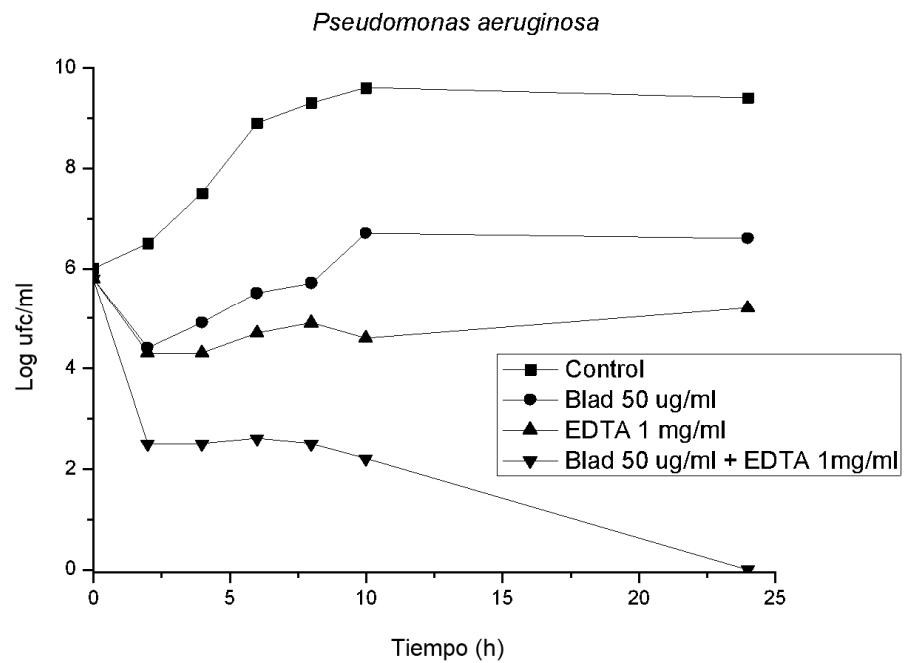


Figura 9**A****B**

C

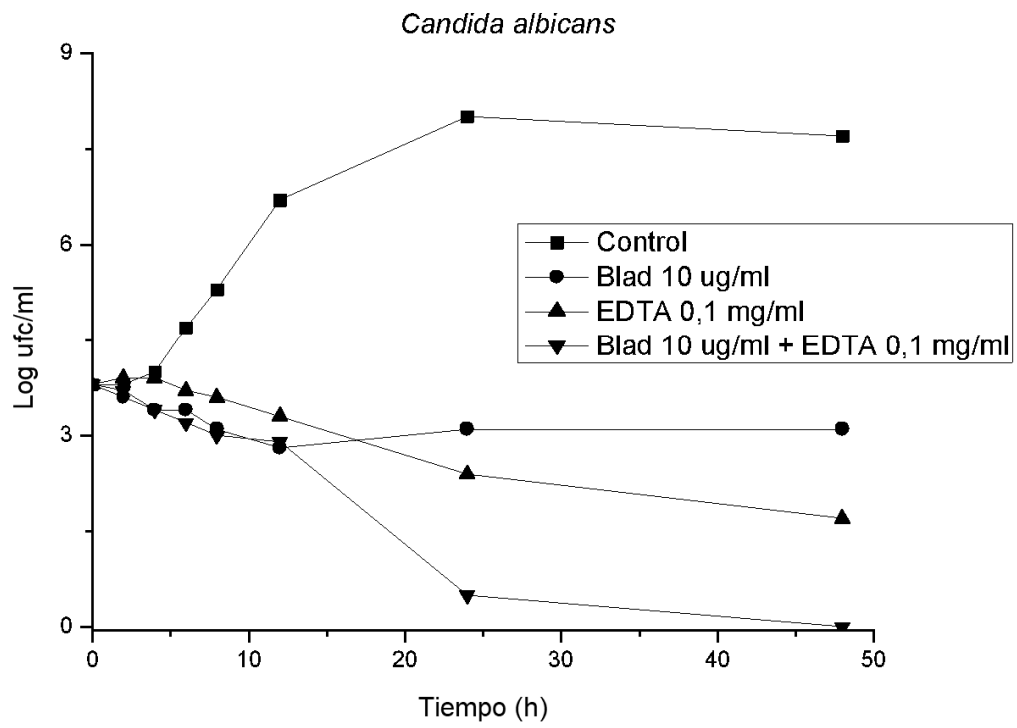


Figura 10

```

1 gatggcgatg aatgaacact gcgtttgctg gctttgatga aaatcgagtg caacctaat
61 taatcaataa tgggtaagat gagagtgagg tttccaacgt tagtgttggt actaggaata
121 gtattcctca tggcagtgtc aattggtatt gcttatggag aaaaagatgt gctaaaagagt
181 catgagaggg ctgaggaaaag agaacaagag gcttggaac ctaggagaca acgacctcaa
241 agtagaaggg aagagagaga gcaagagcaa gacgagggtt ctccctcata cccacgcagg
301 cagagtgggt atgagaggag acaataccat gagaggagtg agcagaggga agagagagag
361 caagaacaac aacaagggtt ccctcatatc tcacgtagac aaaggaaccc ttatcacttc
421 agctctcaaa gattccaaac tctttacaaa aataggaatg gcaaaatccg tgtgctcgag
481 aggtttgacc aaagaaccaa tagacttgag aatctccaaa actaccgcat tgttgagtgc
541 caatcaaaac ctaacactct cattctccct aacactctg atgctgacta cgtcctcggt
601 gtactcaatg gttagagccac aatcacgata gtaaaccttg atagaagaca agcatataac
661 cttgagtatg gcgatgctct cagaatccca gctggctcaa ctcatatat ccttaacccg
721 gatgacaacc agaagcttag agtagtcaag ctgcgaatac ccatacaaaa tcctgggtac
781 ttttatgatt tctatccatc gagtactaaa gaccaacaat cctacttcag tggcttcagc
841 aggaacactt tagaggccac ctccaatact cgttatgaag agatacaaa gattatttta
901 gggaaatgagg atgagcaaga atatgaggaa caaaggcgtg ggcaagagca gacgaccaa
961 gacgaggggg tgatagtgat agttcaaa gaaacagatcc aaaaattgac aaaaacacgt
1021 caatcttcat caggaaaaga caaacctct gattctggcc ccttcaactt gagaaagcaat
1081 gagcccatat attcaaaaca gtatgggaac ttctatgaaa tcaactccaga tagaaacccct
1141 caagttcagg atttgaatat ctctctcacc tataaaaaa ttaacgaggg agctttgttg
1201 ttgccacact ataactcaaa ggccatatat gtagtcgtgg ttgatgaagg agaaggaaat
1261 tatgaactgg taggtattcg agatcaaaa cgacaacaag atgagcaaga agagaaagag
1321 gaagaagtga taaggtatag tgctagatta tcagaagggtg acatttttgt aattccagca
1381 ggttatccaa ttcccatcaa tgcttccctca aatcttcgct tgcttggtat tggcatcaat
1441 gctgatgaaa accagaggaa ttctctcgca ggttctaaa acaatgtgat aaggcagtta
1501 gatagagcag tgaatgagct cacattccct ggttctgctg aagatatatga gagattaatc
1561 aaaaaccaac aacagtctta ctttgcaaat ggtcagcctc acaacaaca acaacaaca
1621 agtgagaagg agggaaaggcg tggaagaagg ggttcatttc ttccattttg agcacttttt
1681 actaagctgt tttaaaagct actatcatgt aagagctcat agtgagctac tgagagaata
1741 ataaaactaa agttggacct ttgtactaat atgtttaata aaaaaaaaa a

```

Figura 11

```

1  cgtagacaaa ggaaccctta tcacttcagc tctcaaagat tccaaactct ttacaaaaat
61  aggaatggca aaatccgtgt gctcgagagg tttagaccaa gaaccaatag acttgagaat
121 ctccaaaact accgcattgt tgagttccaa tcaaaacctt gagccacaaat cctccctaaa
181 cactctgatg ctgactacgt cctcgttgta ctcaatggta gagccacaaat cagcatagta
241 aaccctgata gaagacaagc atataaccctt gagtatggcg atgctctcag aatcccagct
301 ggctcaactt catataatcc taaccgggat gacaaccaga agcttagagt agtcaagctc
361 gcaataccca tcaacaatcc tggctacttt tatgatttct atccatcgag tactaaagac
421 caacaatcct acttcagtgg cttcagcagg aacacttttag aggccacctt caatactcgt
481 tatgaagaga tacaaggat tatttttagg aatgaggat

```