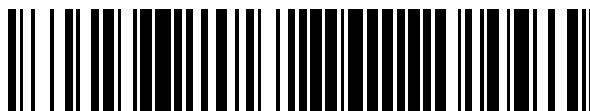


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 537**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2008 PCT/US2008/069776**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2009 WO09012143**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2008 E 08772520 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2176420**

54 Título: **Péptidos antimicrobianos derivados de virus**

30 Prioridad:

13.07.2007 US 959453 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.05.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER
EDUCATION (100.0%)
1st Floor Gardner Steel Conference Center, 130
Thackeray Avenue
Pittsburgh, PA 15260, US**

72 Inventor/es:

**MIETZNER, TIMOTHY A. y
MONTELARO, RONALD C.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 668 537 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 derivados de virus

El desarrollo de agentes antimicrobianos ha conducido a un descenso significativo en la morbilidad y la mortalidad por enfermedades infecciosas en este siglo. Esta importante contribución a la salud pública se ha debido en gran medida a la amplia utilización de antibióticos que se dirigen a rutas biosintéticas específicas de nutrientes, paredes celulares, ADN, ARN y proteínas que son únicos para la bacteria patógena. No obstante, en los últimos años la capacidad de gestionar enfermedades infecciosas se ha visto amenazada por la emergencia de cepas bacterianas que ya no son susceptibles a los agentes antimicrobianos actualmente disponibles (véase Files, 1999, *Chest* 115:3S-8S). El mantenimiento de la salud pública exige el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos necesarios para contrarrestar estas bacterias resistentes emergentes para que sigan existiendo procedimientos de gestión eficaz de la enfermedad infecciosa.

Un grupo heterogéneo de péptidos antimicrobianos derivados de anfitriones ha llamado la atención como posibles nuevos agentes terapéuticos (véase Hancock, R.E., 1999, *Drugs* 57:469-473). Estos péptidos juegan un papel importante en la inmunidad innata de vertebrados contra la infección. Por ejemplo, los péptidos antimicrobianos catiónicos constituyen tanto como 18% en peso de las proteínas neutrófilas totales. También se encuentran a elevadas concentraciones sobre las superficies dañadas de la mucosa. En general estos péptidos catiónicos derivados de anfitriones encajan en una de cuatro categorías estructurales: (i) estructuras en lámina β que están estabilizadas por múltiples enlaces disulfuro (*p. ej.*, defensina-1 humana), (ii) estructuras en bucle estabilizadas covalentemente (*p. ej.*, bactenecina), (iii) péptidos helicoidales ampliados, ricos en triptófano (Trp) (*p. ej.*, indolicidina), y (iv) hélices ∇ anfipáticas (*p. ej.*, las magaininas y las cecropinas) (véase Hwang y Vogel, 1998, *Biochemistry & Cell Biology* 76:235-246). Recientemente se ha descrito una nueva clase de péptidos antimicrobianos, las catelicidinas, que utilizan todos estos motivos estructurales y son claramente importantes en la defensa del anfitrión frente a la infección (Ganz y Lehrer, 1997, *Current Opinion in Hematology* 4:53-58).

Las catelicidinas son una colección notablemente diversa de péptidos que derivan de prepropéptidos que comparten un segmento propeptídico N-terminal altamente conservado que han sido descritos en seres humanos, ganado vacuno, ovejas, conejos, ratones, y cerdos (véase Hwang y Vogel, 1998, *Biochemistry & Cell Biology* 76:235-246). El segmento propeptídico conservado de aproximadamente 100 aminoácidos comparte similitud de secuencia con la proteína porcina catelina, un supuesto inhibidor de la cisteína proteasa, de ahí el nombre de la familia. El dominio C-terminal codifica un motivo peptídico antimicrobiano similar a uno de los descritos más arriba, dependiendo del anfitrión y el tejido con el que esté asociado. Las catelicidinas se almacenan en gránulos de neutrófilos en forma de propéptidos (que carecen de actividad antimicrobiana en esta forma), conduciendo la activación del neutrófilo a la escisión endoproteolítica mediada por elastasa y a la generación del péptido antimicrobiano C-terminal. La catelicidina humana, referida alternativamente como FALL-39, hCAMP18, LL-37, o CAMP, en su forma procesada (activa) es un péptido catiónico α -helicoidal anfípico de 37 aminoácidos (véase Zanetti, Gennaro y Romeo, 1995, *FEBS Letters* 374:1-5). La expresión de LL-37 ha sido detectada en neutrófilos humanos, células testiculares, epitelio respiratorio, y en queratinocitos en los sitios de inflamación.

Los péptidos catiónicos anfipáticos de la clase α -helicoidal demuestran concentraciones bactericidas mínimas (MBC) en el intervalo de $\mu\text{g/mL}$ (niveles equivalentes a otros agentes antimicrobianos) y son capaces de destruir una amplia gama de patógenos bacterianos gram-negativos y gram-positivos, incluyendo aquellos que son altamente resistentes a múltiples antibióticos (véase Hancock, R.E., 1999, *Drugs* 57:469-473). El mecanismo por medio del cual estos péptidos destruyen las bacterias se desarrolla en un procedimiento de dos etapas, primero uniéndose a la superficie bacteriana cargada negativamente y segundo dirigiendo estos péptidos unidos a la membrana bacteriana. La culminación de estos procedimientos da como resultado en última instancia la desorganización de la integridad estructural de las membranas bacterianas. Para los organismos gram-negativos, los péptidos antimicrobianos catiónicos tienen la ventaja añadida de unirse a lipopolisacáridos (LPS), destoxificando de ese modo su actividad endotóxica (véase Scott, Yan, y Hancock, 1999, *Infection & Immunity* 67:2005-2009). La señal de identidad de los péptidos antimicrobianos α -helicoidales catiónicos es su capacidad para plegarse en una estructura secundaria anfipática que presenta una cara hidrófila con una carga neta positiva de al menos +2. Numerosas combinaciones de secuencias de aminoácidos diferentes permiten que un péptido alcance esta estructura característica. La Patente de los Estados Unidos Núm. 5.504.190 de Houghten et al. describe péptidos catiónicos. Por consiguiente, se han descrito hasta la fecha cientos de péptidos α -helicoidales catiónicos anfipáticos derivados de anfitriones que muestran una homología de secuencia limitada a nivel de comparación de la secuencia primaria (véase Hwang y Vogel, 1998, *Biochemistry & Cell Biology* 76:235-246). Los autores de la presente invención plantean la hipótesis de que la diversidad de estos péptidos ha evolucionado para trabajar en un entorno específico y contra un subgrupo específico de patógenos microbianos.

Al contrario que los péptidos antimicrobianos derivados del anfitrión, que han evolucionado con el propósito expreso de destruir bacterias, se ha descrito una nueva clase de péptidos antimicrobianos derivados de segmentos discretos de la cola citoplásmica de la proteína transmembrana (TM) lentiviral que no han evolucionado para el mismo propósito que los péptidos derivados del anfitrión (véase Beary et al., 1998, *Journal of Peptide Research* 51:75-79; Comardelle et al., 1997, *AIDS Research & Human Retroviruses* 13:1525-1532; Miller et al., 1993, *AIDS Research*

& Human Retroviruses 9:1057-1066; Miller et al., 1993, *Virology* 196:89-1000; Tencza et al., 1995, *Virology* 69:5199-5202; Tencza et al., 1997, *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 41:2394-2398; Tencza et al., 1997, *AIDS Research & Human Retroviruses* 13:263-269; Yuan et al., 1995, *Biochemistry* 34:10690-10696). Estos péptidos son referidos como péptidos líticos lentivirales (LLP) siendo el LLP prototipo LLP1 (aminoácidos 828-856 del producto aislado viral de VIH-1 HXB2R Env). LLP1 deriva de los 28 residuos codificados por la porción C-terminal de la proteína TM de VIH-1 que, cuando se modela como una hélice α , demuestra un carácter anfipático con caras catiónicas e hidrófobas claramente delineadas. Entre los muchos péptidos antimicrobianos actualmente descritos en la bibliografía, LLP1 es el más homólogo estructuralmente a las magaininas y a la catelicidina humana, LL37.

LLP 1 se ha estudiado por sus propiedades de unión a calmodulina y antibacterianas. LLP1 se une a la calmodulina saturada con Ca^{2+} de la célula anfitriona con una afinidad casi nanomolar y esta propiedad se ha correlacionado con la inhibición de la activación de células T, sugiriendo que estos péptidos pueden amortiguar una respuesta inflamatoria (véase Beary et al., 1998, *Journal of Peptide Research* 51:75-79; Miller et al., 1993, *AIDS Research & Human Retroviruses* 9:1057-1066; Tencza et al., 1995, *Virology* 69:5199-5202; Tencza et al., 1997, *AIDS Research & Human Retroviruses* 13: 263-269; Yuan et al., 1995, *Biochemistry* 34:10690-10696). La actividad antibacteriana de LLP1 ha sido investigada supervisando diversos productos aislados bacterianos gram-negativos y -positivos. Este análisis demuestra que LLP1 tiene una actividad antibacteriana que es igual a, o más potente que la de la magainina-2. Estos productos aislados incluían las cepas resistentes a metilicina y Vancomicina así como otras cepas que eran altamente resistentes a múltiples antibióticos (véase Tencza et al., 1997, *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 41:2394-2398). La lisis de bacterias por LLP1 es rápida, esterilizando casi una suspensión de 1×10^5 unidades formadoras de colonias de *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus* en 60 segundos de exposición (véase Tencza et al., 1997, *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 41:2394-2398). Se piensa que el mecanismo de acción de LLP1 perturba las membranas bacterianas cargadas negativamente (Phalke, et al., Selective toxicity of engineered lentivirus lytic peptides in a CF airway cell model, *Peptides* (Agosto 2003) 24(8):1099-107), y en un grado menor, las membranas celulares de mamíferos neutras. La predilección del péptido por las membranas de células bacterianas sobre las de mamífero constituye la base de su toxicidad selectiva.

Los cambios de un solo aminoácido en LLP1 afectan profundamente a su unión a calmodulina y a su actividad antibacteriana (véase Tencza et al., 1995, *Virology* 69:5199-5202; Tencza et al., 1999, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44:33-41). En general, las sustituciones de aminoácidos en la secuencia de LLP1 parental de residuos alcalinos a residuos ácidos disminuyen tanto la unión a calmodulina como las actividades bactericidas. De un modo similar, la alteración de residuos hidrófobos individuales a residuos hidrófilos también disminuía ambas actividades. Además, la dimerización por medio de la formación de enlaces disulfuro de una sola Cys encontrada dentro de la secuencia parental de LLP1 aumentó significativamente su actividad para *S. aureus* (véase Tencza et al., 1999, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44:33-41). Finalmente, la disminución de la longitud del dímero de LLP1 a 21 residuos (péptido bis-TL1) redujo su actividad de lisis de glóbulos rojos sin reducir significativamente su actividad antibacteriana (véase Tencza et al., 1999, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44:33-41). Estos datos sugieren que la secuencia parental de LLP1 se puede modificar genéticamente para aumentar su potencia y selectividad. El potencial para esta modificación genética constituye la base para los compuestos, composiciones y métodos descritos en la presente memoria.

Compendio

Se describen en la presente memoria péptidos que tienen actividad antimicrobiana ("péptidos antimicrobianos"), composiciones que comprenden los péptidos y métodos de elaboración y uso de los péptidos como se reivindica en la presente memoria más adelante.

También se describen en la presente memoria métodos asociados para ayudar a comprender la invención, pero estos no forman parte de la invención reivindicada.

Los ejemplos o realizaciones descritos en la presente memoria que no entran en la definición de reivindicaciones no forman parte de la presente invención. Se describen los siguientes péptidos y solamente los péptidos de SEQ. ID 14, 15 y 16 son parte de la invención:

Estos péptidos antimicrobianos que derivan de, y son análogos de, la secuencia parental del péptido LLP1 correspondiente a los aminoácidos 828-856 del producto aislado viral de VIH-1 HXB2R Env han sido descritos e incluyen SA-5 (SEQ ID NO: 1), LSA-5 (SEQ ID NO: 2) y WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) (véase la Tabla 1 a continuación). La actividad antimicrobiana de los otros análogos del péptido LLP1 se ha descrito anteriormente (véase Tencza et al., 1999, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44:33-41, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.714.577 de Montelaro et al. y Patente de los Estados Unidos Núm. 5.945.507 de Montelaro et al.).

Los péptidos antimicrobianos son análogos de LLP1 que tienen modificaciones basadas en los siguientes principios: (i) optimización del carácter anfipático, (ii) sustitución de arginina (Arg) en la cara cargada y/o valina (Val) o triptófano (Trp) en la cara hidrófoba por otro aminoácido, y (iii) aumento de la longitud del péptido (referidos colectivamente en la presente memoria como péptidos LBU, p. ej. LBU-1 (SEQ ID NO: 4); LBU-2 (SEQ ID NO: 5); LBU-3 (SEQ ID NO: 6); LBU- 3.5 (SEQ ID NO: 7); LBU-4 (SEQ ID NO: 8); WLBU-1 (SEQ ID NO: 9); WLBU-2 (SEQ ID NO: 10); WLBU-3

(SEQ ID NO: 11); y WLBU-4 (SEQ ID NO: 12); véase la Tabla 1). Los péptidos LBU se apartan enormemente de LLP1 parental, por ejemplo, LBU-2 y LBU-3 se apartan de la secuencia de LLP1 parental en más de 90%.

Tabla 1

SA-5:	RVIRV VQRAC RAIRH IVRRI RQGLR RIL	(SEQ ID NO: 1)
LSA-5:	RVIRV VQRAC RAIRH IVRRI RQGLR RILRV V	(SEQ ID NO: 2)
WLSA-5:	RWIRV VQRWC RAIRH IWVRI RQGLR RWLRV V	(SEQ ID NO: 3)
LBU-1:	RVVVRV VRRVV RR	(SEQ ID NO: 4)
LBU-2:	RRWR RVRRV VRRW RVVRR VVRR	(SEQ ID NO: 5)
LBU-3:	VRW RRWR VVRRV VRRVR RVVRR WRW RRWR	(SEQ ID NO: 6)
LBU-3.5:	RRWR RVRRV VRRVV RWRR WRRV RRWR RWRV VRRW RR	(SEQ ID NO: 7)
LBU-4:	RVVVRV VRRVV RRVRR VVRRV VRVVR RVVRR VRRVV RRVVR VVRRV VRR	(SEQ ID NO: 8)
WLBU-1	RVVVRV VRRVVV RR	(SEQ ID NO: 9)
WLBU-2	RRWVR RVRRV WRW RVVRR WVRR	(SEQ ID NO: 10)
WLBU-3	VRRVW RRWR WRRW VRRVR RVVRR WRW RRWVR R	(SEQ ID NO: 11)
WLBU-4	RVVVRV VRRVW RRVRR VVRRV VRVVR RVVRR VRRVW RRVVR VVRRW RVV	(SEQ ID NO: 12)

5 Las secuencias de aminoácidos proporcionadas en la presente memoria se presentan, de izquierda a derecha, de su extremo N a su extremo C. Los péptidos análogos de LLP1 y los péptidos LBU tienen un espectro de actividad más amplio (*p. ej.*, la capacidad para destruir bacterias altamente resistentes) y una mayor potencia (*p. ej.*, actúan a concentraciones molares más bajas para destruir bacterias) cuando se comparan con los análogos de LLP1 descritos anteriormente. Los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria son altamente inhibidores de los microorganismos a concentraciones salinas fisiológicas, funcionan en presencia de fluido sinovial, y demuestra solamente una toxicidad mínima en modelos animales. Como resultado, los agentes antimicrobianos se pueden definir como agentes antimicrobianos selectivos. Se cree que los péptidos funcionan desorganizando las membranas bacterianas y son activos cuando se unen a una fase sólida. La capacidad de estos péptidos para mantener la actividad cuando se unen a una fase sólida es una ventaja significativa sobre los antibióticos convencionales ya que estos péptidos pueden ser útiles como recubrimientos, por ejemplo, sobre dispositivos estériles tales como prótesis o catéteres en los que sería ventajoso evitar la nucleación de la biopelícula bacteriana.

Se presentan varios péptidos antimicrobianos catiónicos modificados genéticamente (eCAP) adicionales. Estos péptidos ricos en arginina/triptófano se presentan en la siguiente Tabla 2. Varios de estos péptidos eCAP mostraron una actividad significativa en la reducción de la infectividad de las células por VIH-1.

Tabla 2

Péptido	Secuencia	Comentarios
WR6	RRWWRR	SEQ ID NO: 13
WR12	RWWRWRRWWRR	SEQ ID NO: 14
WR18	WRRWWRRWRRWWRRWWRR	SEQ ID NO: 15
WR24	RRWWRRWRRWWRRWWRRWWRRWWRR	SEQ ID NO: 16

Por lo tanto, de acuerdo con la presente descripción, se proporciona un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos RRWWRR (SEQ ID NO: 13). De acuerdo con la presente invención se proporciona un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: RWWRWRRWWRR (SEQ ID NO: 14); WRRWWRRWRRWWRRWRR (SEQ ID NO: 15); y RRWWRRWRRWWRRWWRRWWRR (SEQ ID NO: 16). También se proporcionan composiciones que comprenden los péptidos, incluyendo composiciones que comprenden cualquier excipiente o portador farmacéuticamente aceptable útil.

Asimismo se proporciona un método de neutralización de lentivirus, comprendiendo el método poner en contacto el virus con uno o más péptidos antimicrobianos seleccionados entre WR12 (SEQ ID NO: 14); WR18 (SEQ ID NO: 15); y WR24 (SEQ ID NO: 16) en una cantidad eficaz para neutralizar el virus con envoltura. En una realización, el lentivirus es un Virus de la Inmunodeficiencia Humana, tal como VIH-1. En una realización, los uno o más péptidos antimicrobianos se seleccionan entre WR12 (SEQ ID NO: 14); WR18 (SEQ ID NO: 15); and WR24 (SEQ ID NO: 16). El péptido antimicrobiano se puede administrar a un sujeto en una cantidad eficaz para prevenir o tratar una infección por lentivirus, previniendo o tratando de ese modo una infección por lentivirus en el sujeto. Se proporciona un método de destrucción de una bacteria *Bacillus anthracis*, en forma vegetativa. El método comprende poner en contacto la bacteria con uno o más péptidos antimicrobianos seleccionados entre SA-5 (SEQ ID NO: 1); LSA-5 (SEQ ID NO: 2); WLSA-5 (SEQ ID NO: 3); LBU1 (SEQ ID NO: 4); LBU-2 (SEQ ID NO: 5); LBU-3 (SEQ ID NO: 6); LBU-3.5 (SEQ ID NO: 7); LBU-4, (SEQ ID NO: 8); WLBU-1 (SEQ ID NO: 9); WLBU-2 (SEQ ID NO: 10); WLBU-3 (SEQ ID NO: 11); y WLBU-4, (SEQ ID NO: 12), WR6 (SEQ ID NO: 13); en una cantidad eficaz para destruir la bacteria. En un ejemplo, el péptido antimicrobiano es uno o ambos de WLBU-1 (SEQ ID NO: 9) y WLBU-2 (SEQ ID NO: 10). El péptido antimicrobiano se puede administrar a un sujeto en una cantidad eficaz para prevenir o tratar una infección por *B. anthracis*, previniendo o tratando de ese modo una infección por *B. anthracis*. Se proporciona un método de destrucción de un hongo de los géneros *Candida* o *Cryptococcus*. El método comprende poner en contacto el hongo con uno o más péptidos antimicrobianos seleccionados entre SA-5 (SEQ ID NO: 1); LSA-5 (SEQ ID NO: 2); WLSA-5 (SEQ ID NO: 3); LBU1 (SEQ ID NO: 4); LBU-2 (SEQ ID NO: 5); LBU-3 (SEQ ID NO: 6); LBU-3.5 (SEQ ID NO: 7); LBU-4, (SEQ ID NO: 8); WLBU-1 (SEQ ID NO: 9); WLBU-2 (SEQ ID NO: 10); WLBU-3 (SEQ ID NO: 11); y WLBU-4, (SEQ ID NO: 12), WR6 (SEQ ID NO: 13); en una cantidad eficaz para destruir el hongo. En una realización, el péptido antimicrobiano es uno o ambos de WLBU-1 (SEQ ID NO: 9) y WLBU-2 (SEQ ID NO: 10). En otro ejemplo, los péptidos antimicrobianos son WR6 (SEQ ID NO: 13); el péptido antimicrobiano se puede administrar a un sujeto en una cantidad eficaz para prevenir o tratar una infección por *Candida* o *Cryptococcus*, previniendo o tratando de ese modo una infección por *Candida* o *Cryptococcus*. En un ejemplo, el hongo es uno o más de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. galbrata*, y *C. lusitaniae*. Los péptidos antimicrobianos están anclados (normalmente covalentemente y normalmente mediante un enlace peptídico) a un elemento de translocación de membrana, tal como un dominio de transducción peptídico. Por lo tanto, de acuerdo con esta realización, se proporciona un compuesto que comprende un péptido antimicrobiano seleccionado entre SA-5 (SEQ ID NO: 1); LSA-5 (SEQ ID NO: 2); WLSA-5 (SEQ ID NO: 3); LBU1 (SEQ ID NO: 4); LBU-2 (SEQ ID NO: 5); LBU-3 (SEQ ID NO: 6); LBU-3.5 (SEQ ID NO: 7); LBU-4, (SEQ ID NO: 8); WLBU-1 (SEQ ID NO: 9); WLBU-2 (SEQ ID NO: 10); WLBU-3 (SEQ ID NO: 11); y WLBU-4, (SEQ ID NO: 12), WR6 (SEQ ID NO: 13); anclados a un dominio de translocación de membrana. El dominio de translocación de membrana puede ser un dominio de transducción peptídico. En una realización, el dominio de transducción peptídico comprende la secuencia de aminoácidos RRQRRTSKLMKR (SEQ ID NO: 17). En otro ejemplo, el péptido antimicrobiano es uno de WLBU-1 (SEQ ID NO: 8) y WLBU-2 (SEQ ID NO: 9). En un ejemplo específico, el compuesto tiene la secuencia de aminoácidos RRQRRTSKLMKRRRWRVRRVWRVRRWVRR (SEQ ID NO: 18). También se proporcionan las composiciones que comprenden el compuesto, incluyendo las composiciones que comprenden cualquier excipiente o portador farmacéuticamente aceptable útil.

Un sustrato en fase sólida comprende al menos un péptido seleccionado entre: WR12 (SEQ ID NO: 14); WR18 (SEQ ID NO: 15); WR24 (SEQ ID NO: 16). El sustrato en fase sólida puede ser un dispositivo protésico, tal como una articulación protésica, o un catéter o cánula. En un ejemplo, el péptido se selecciona entre uno o más de WR12 (SEQ ID NO: 14); WR18 (SEQ ID NO: 15); WR24 (SEQ ID NO 16).

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se puede comprender mejor con referencia a los dibujos adjuntos de los cuales:

- La Figura 1 muestra las secuencias de los LLP modificados genéticamente (eLLP) SA-5 (SEQ ID NO: 1), LSA-5 (SEQ ID NO: 2), y WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) con respecto a la secuencia de LLP1 parental.
- 5 La Figura 2 muestra las secuencias de los péptidos LBU y WLBU modificados genéticamente (SEQ ID NO: 4-12).
- La Figura 3 muestra la actividad del péptido WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) en comparación con LL37 contra *P. aeruginosa* en el análisis de dilución de caldo convencional que emplea tampón fosfato (condiciones de baja salinidad).
- 10 La Figura 4 demuestra la actividad del péptido WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) en comparación con LL37 contra *S. aureus* en el análisis de dilución de caldo convencional que emplea tampón fosfato (condiciones de baja salinidad).
- La Figura 5 muestra la actividad del péptido WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) en comparación con LL37 contra *P. aeruginosa* en el análisis de dilución de caldo convencional que emplea tampón fosfato que contiene NaCl 150 mM (condiciones salinas fisiológicas).
- 15 La Figura 6 muestra la actividad del péptido WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) en comparación con LL37 contra *S. aureus* en el análisis de dilución de caldo convencional que emplea tampón fosfato que contiene NaCl fisiológico.
- La Figura 7 demuestra en un modelo de dilución de caldo convencional que WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) es más activo que LSA-5 (SEQ ID NO: 2) contra *Burkholderia cepacia*, una bacteria notoriamente resistente a antibióticos asociada con la infección pulmonar por fibrosis quística avanzada.
- 20 La Figura 8 compara la capacidad de WLSA-5 25 μ M (SEQ ID NO: 3) o LL37 para destruir múltiples genovares de *B. cepacia*. En este experimento, se expuso un inóculo convencional de cada organismo a una única concentración (25 μ M) de WLSA-5 y LL37 y se determinó la reducción de las unidades formadoras de colonias.
- 25 La Figura 9 muestra la actividad antibacteriana de WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) contra *Pseudomonas aeruginosa* adherida a células epiteliales bronquiales humanas diferenciadas en comparación con LL37, el péptido antimicrobiano derivado del anfitrión encontrado en el fluido superficial de las vías respiratorias. Estos datos demuestran que WLSA-5 es activo en este modelo de infección pulmonar por fibrosis quística. Los círculos miden el % de Rte (% de cambio en la resistencia transepitelial). Los cuadrados miden las bacterias supervivientes.
- 30 La Figura 10 es un gráfico de barras que compara la actividad bactericida de LSA-5 (SEQ ID NO: 2) contra *S. aureus* a una dilución 1:4 de fluido sinovial humano (barras claras) y lo compara con la destrucción en tampón fosfato que contiene NaCl fisiológico. Los datos sugieren que los componentes del fluido sinovial limitan la actividad del péptido, pero que este todavía es activo a 128 μ M.
- 35 La Figura 11 demuestra que, en el modelo de sepsis de articulaciones de conejo, la administración de LSA-5 (SEQ ID NO: 2) a 50, 100 y 200 μ M aumenta significativamente la destrucción bacteriana.
- La Figura 12 ilustra que en el modelo de sepsis de articulación de conejo, LSA-5 (SEQ ID NO: 2) es funcional y casi tan eficaz como una concentración convencional de neomicina en la reducción de la carga bacteriana dentro de la articulación. Cuando se utilizaba combinado con neomicina, se observaba un descenso máximo en la carga bacteriana.
- 40 La Figura 13 muestra un gráfico de barras que ilustra que un ejemplo de los péptidos descritos en la presente memoria, LSA-5 (SEQ ID NO: 2), tiene actividad anti-VIH-1.
- La Figura 14 es una viñeta de la descripción que muestra un análisis basado en células para la medición de la actividad de diversos péptidos descritos en la presente memoria en la reducción de la infectividad por VIH-1.
- 45 La Figura 15 es un gráfico que muestra la actividad de los péptidos LBU en la inhibición de la infectividad por VIH-1 de células HeLa.
- La Figura 16 es un diagrama que muestra la CI_{50} y los valores de toxicidad para péptidos LBU.
- 50 La Figura 17 es un gráfico que muestra la actividad de péptidos WLBU que inhiben la infectividad por VIH-1 de células HeLa.

La Figura 18 es un diagrama que muestra la CI_{50} y los valores de toxicidad para péptidos WLBU.

La Figura 19 es un gráfico que muestra la actividad de péptidos WR en la inhibición de la infectividad por VIH-1 de células HeLa.

La Figura 20 es un diagrama que muestra la CI_{50} y los valores de toxicidad para péptidos WR.

5 La Figura 21 es una ilustración que demuestra que el péptido unido a una superficie puede actuar como un "alfiler que revienta un globo". El recubrimiento de superficies con estos péptidos puede ser útil en el control del crecimiento de bacterias u otros microbios que forman biopelículas sobre las superficies.

10 La Figura 22 ilustra cómo se realizó el experimento con WLBU-2 (SEQ ID NO: 10) unido a Affigel. Las columnas a las cuales se aplicaron las bacterias se muestran en el panel superior. El crecimiento bacteriano sobre un medio bacteriológico apropiado se muestra en el panel central. El hecho de que WLBU-2 se uniera covalentemente y no fuera capaz de difundir a través de una membrana de diálisis con un corte de masa molecular de 30.000 PM se muestra en el gráfico del panel inferior.

15 La Figura 23 muestra un análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de *P. aeruginosa* expuesta a material SCPC que no contiene WLBU-2 (SEQ ID NO: 10) (a) o que contiene WLBU-2 (b). Lo que resulta claro a partir de este análisis de la presencia de WLBU-2 en un material reabsorbible por el hueso es que el péptido catiónico, WLBU-2, recluta bacterias tales como *P. aeruginosa* hacia la superficie. Tras la unión, los datos de los autores de la presente invención indican que estos organismos empiezan a verter beta-galactosidasa al medio, un indicador de lisis de células bacterianas.

20 La Figura 24 es un gráfico que ilustra una disminución dependiente de la dosis en la formación de placas de virus infeccioso para el virus de la influenza estacional.

La Figura 25 es un gráfico que muestra la capacidad de WLBU-2 (SEQ ID NO: 10) para inactivar el virus de la influenza estacional en ratones por medio de la administración intranasal del péptido.

25 La Figura 26 es un gráfico que muestra la capacidad de WLBU-2 (SEQ ID NO: 10) para inhibir la forma vegetativa de *B. anthracis*.

La Figura 27 es una ilustración esquemática de un método no limitante de elaboración de WLBU-2 (SEQ ID NO: 10) utilizando la condensación de fragmentos. El concepto es que los fragmentos 1-4 se pueden añadir secuencialmente en cuatro etapas cuando esto llevaría 24 etapas si el péptido se elaborara utilizando la síntesis por etapas de un solo residuo.

30 Descripción detallada

Basándose en estudios del péptido lítico lentiviral 1 (LLP1) de la glicoproteína transmembrana de VIH-1 gp41 y otros péptidos derivados del anfitrión que muestran las propiedades antimicrobianas de los péptidos activos de membrana, resulta evidente que su actividad antimicrobiana está marcadamente influenciada por sus propiedades catiónicas, hidrófobas, y anfipáticas. A partir de estas observaciones se han decidido temas comunes tales como la composición de Arg de la cara catiónica de una hélice anfipática y la importancia del mantenimiento de una cara hidrófoba. Estos estudios sugieren que un péptido con estas propiedades estructurales se puede obtener de novo utilizando un subconjunto limitado de aminoácidos que están situados estratégicamente. Se diseñaron multímeros de un péptido unitario de base lítica (LBU) de seis residuos compuesto solamente por residuos de Arg, Val, y Trp alineados para formar hélices anfipáticas idealizadas. Los ensayos de destrucción bacteriana y los análisis de diroismo circular revelaron una fuerte correlación entre la actividad antibacteriana, la longitud del péptido, y la propensión a formar una hélice en un disolvente que imite el entorno de una membrana. Todos estos péptidos demostraron actividad antibacteriana. El péptido WLBU-2 de 24 residuos (SEQ ID NO: 10) era activo a concentraciones de NaCl fisiológicas contra *Staphylococcus aureus* y cepas mucoides y no mucoides de *Pseudomonas aeruginosa*. Adicionalmente, WLBU-2 (SEQ ID NO: 10) presentó la selectividad antibacteriana más alta de todos los péptidos evaluados utilizando un modelo de co-cultivo de *P. aeruginosa* y fibroblastos de piel humana primarios. Estos descubrimientos proporcionan información fundamental sobre el diseño de novo de un péptido antimicrobiano útil para la gestión de enfermedades infecciosas (Deslouches et al., 2005).

En cuanto al alcance de estos descubrimientos, se estableció un modelo murino de *P. aeruginosa*. La administración intravenosa de WLBU-2 (SEQ ID NO: 10) demostró protección contra una sensibilización letal de *P. aeruginosa* (Deslouches et al. 2007). Estos descubrimientos fueron muy sorprendentes puesto que toda la evidencia sugiere que los péptidos antimicrobianos solamente serían eficaces si se administraran tópicamente.

Desde que se informó sobre la actividad antibacteriana de LLP1 (véase Tencza et al., 1997, Antimicrobial Agents & Chemotherapy 41:2394-2398), se han preparado numerosos análogos de LLP1 diferentes (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.714.577 de Montelaro et al. y la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.945.507 de Montelaro et al. y Tencza et al., 1999, Journal of Antimicrobial Chemotherapy 44:33041) mediante la manipulación

de la secuencia parental para aumentar la potencia (*es decir*, aumento de su actividad de destrucción bacteriana molar) y la ampliación del espectro de actividad contra productos clínicos aislados. Esto se ha logrado optimizando las caras hidrófilas e hidrófobas de la α -hélice modelada. Se describen en la presente memoria tres péptidos antimicrobianos, que son análogos del péptido LLP1, SA-5 (SEQ ID NO: 1), LSA-5 (SEQ ID NO: 2) y WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) (véase la Tabla 1 más arriba). Además, se describen en la presente memoria péptidos antimicrobianos que son análogos de LLP1 que tienen modificaciones basadas en los siguientes principios: (i) optimización del carácter anfipático, (ii) sustitución con Arg en la cara cargada y Val en la cara hidrófoba, (iii) aumento de la longitud del péptido, y (iv) sustitución periódica de Val por Trp (referida colectivamente en la presente memoria como péptidos LBU, p. ej., LBU-1 (SEQ ID NO: 4); LBU-2 (SEQ ID NO: 5); LBU-3 (SEQ ID NO: 6); LBU-3.5 (SEQ ID NO: 7); LBU-4 (SEQ ID NO: 8); WLBU-1 (SEQ ID NO: 9); WLBU-2 (SEQ ID NO: 10); WLBU-3 (SEQ ID NO: 11); y WLBU-4 (SEQ ID NO: 12), véase la Tabla 1). Las composiciones de SA-5 (SEQ ID NO: 1), LSA-5 (SEQ ID NO: 2), WLSA-5 (SEQ ID NO: 3), LBU-4 (SEQ ID NO: 8) y WLBU-4 (SEQ ID NO: 12) se describen en las Figuras 1 y 2 con respecto a sus secuencias primarias cuando se modelan como una estructura de hélice α y se comparan con el péptido LLP1 parental.

El péptido denominado SA-5 sustituye tres residuos de arginina por un residuo de glicina (Gly) y dos residuos de ácido glutámico (Glu) que modelan la cara hidrófila de la secuencia parental de LLP1, y una sustitución de prolina (Pro) a valina (Val) que modela la cara hidrófoba de esta secuencia. El fundamento que subyace a la generación de este péptido es la optimización del carácter anfipático catiónico de la secuencia de LLP1 original.

El péptido denominado LSA-5 contrasta con los informes previos que describen la potencia de los derivados truncados de LLP1 (véase Tencza et al., 1999, Journal of Antimicrobial Chemotherapy 44:33041) al investigar la actividad de los derivados de LLP de mayor longitud. LSA-5 amplía la longitud de la hélice α modelada en un giro y conserva el carácter catiónico, rico en Arg, anfipático.

Basándose en los estudios estructurales de Hwang y Vogel (Biochemistry & Cell Biology 76:235-246 (1998)), se ha demostrado que los residuos de Trp se intercalan de manera óptima en las membranas bacterianas. Sin embargo, el hecho de que el Trp se pueda intercalar en membranas biológicas no implica que los péptidos específicos que contienen Trp desorganicen selectivamente las membranas bacterianas. El péptido WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) se obtuvo reemplazando cuatro residuos en la cara hidrófoba de LSA-5 (SEQ ID NO: 2) por residuos de Trp.

Además, se describen en la presente memoria péptidos análogos a LLP que comprenden modificaciones basadas en los siguientes principios: (i) optimización del carácter anfipático, (ii) sustitución con Arg en la cara cargada y Val en la cara hidrófoba, (iii) aumento de la longitud del péptido, y (iv) sustitución periódica de Val por Trp. Los péptidos modificados de acuerdo con estos principios son referidos en la presente memoria como péptidos con Unidad de Base Lítica (LBU). Por ejemplo, los péptidos LBU-2 y LBU-3 se formularon como un polímero de residuos de Arg y Val diseñado para crear un carácter α -helicoidal anfipático máximo con una longitud de al menos 24 residuos.

Otros péptidos descritos en la presente memoria son péptidos ricos en Arg - Trp que tienen las siguientes secuencias: WR6: RRWWRR (SEQ ID: 13); WR12: RWWRRWRRWRR (SEQ ID NO: 14); WR18: WRRWRRWRRWRRWRR (SEQ ID NO: 15) y WR24: RRWWRRWRRWRRWRRWRRWRR (SEQ ID NO: 16). Estos péptidos, referidos como eCAP (péptidos antimicrobianos catiónicos modificados genéticamente) se basan en la serie de péptidos LBU, en donde todas las valinas son reemplazadas por triptófanos.

La actividad antimicrobiana de los péptidos descritos en la presente memoria se comenta más abajo en los ejemplos.

La actividad de los péptidos antimicrobianos SA-5 (SEQ ID NO: 1), LSA-5 (SEQ ID NO: 2), WLSA-5 (SEQ ID NO: 3), LBU-1 (SEQ ID NO: 4); LBU-2 (SEQ ID NO: 5), LBU-3 (SEQ ID NO: 6), LBU-3.5 (SEQ ID NO: 7), LBU-4 (SEQ ID NO: 8), WLBU-1 (SEQ ID NO: 9), WLBU-2 (SEQ ID NO: 10), WLBU-3 (SEQ ID NO: 11) y WLBU-4 (SEQ ID NO: 12) contra una gama de bacterias que incluye *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* resistente a meticilina, y *Pseudomonas aeruginosa* se resume en la Tabla 3 a continuación.

La Tabla 3 indica las MBC de péptidos expresadas en concentraciones milimolares (mM). Estos resultados demuestran la potencia antimicrobiana de estos péptidos antimicrobianos. La actividad de estos péptidos se compara favorablemente con otros péptidos antibacterianos que pueden tener una actividad igual o menor (como se indica por una concentración bactericida mínima más alta (MBC, véase el Ejemplo 2 de más abajo). La Tabla 3 también indica las MBC de péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria contra diferentes organismos y en diferentes condiciones salinas.

TABLA 3

Péptido	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>S. aureus</i> resistente a meticilina	
	NaCl 0 mM	NaCl 150 mM	NaCl 0 mM	NaCl 150 mM	NaCl 0 mM	NaCl 150 mM
LLP1	1000	1000	8000	16000	16000	-
SA-5	1000	1000	1000	-	-	-
LSA-5	800	800	1000	1000	150	-
WLSA-5	1000	1000	1000	1000	150	-
LBU-2	1500	800	1500	>100.000	-	-
LBU-3	1500	800	1500	1500	-	-
LBU-3.5	400	400	1000	600	1500	200
LBU-4	800	400	800	800	-	-
WLBU-1	400	2500	30,000	10,000	50,000	50,000
WLBU-2	200	100	1000	600	200	100
WLBU-3	1500	800	3,000	600	400	100
WLBU-4	1500	400	3,000	600	1500	200

5 Los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria muestran actividad antimicrobiana contra diversos microorganismos, y son análogos al péptido LLP1 correspondiente a los aminoácidos 828-856 del producto aislado viral de VIH-1 HXB2R Env TM. Los péptidos comprenden secuencias ricas en Arg, que, cuando se modelan para la estructura secundaria, presentan un elevado carácter anfipático y momento hidrófobo. Los péptidos son altamente inhibidores de microorganismos, pero significativamente menos tóxicos para las células de mamífero. Como resultado, estos péptidos se pueden caracterizar como agentes antimicrobianos selectivos. Adicionalmente, los péptidos descritos en la presente memoria incluyen análogos de péptidos LLP1 que comprenden modificaciones basadas en los siguientes principios: (i) optimización del carácter anfipático, (ii) sustitución de Arg en la cara cargada y/o Val o Trp en la cara hidrófoba, y (iii) aumento de la longitud del péptido, referidos colectivamente en la presente memoria como péptidos LBU.

15 Según se utiliza en la presente memoria, el término "antimicrobiano" hace referencia a la capacidad de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria para evitar, inhibir o destruir el crecimiento de microbios tales como bacterias, hongos, protozoos y virus. Según se utiliza en la presente memoria, el término "péptido" se refiere a un oligómero de al menos dos aminoácidos contiguos, unidos entre sí por un enlace peptídico. El término "destruir" y términos similares, hacen referencia a la capacidad de un péptido antimicrobiano para inhibir o eliminar el crecimiento de un microbio celular (p. ej., auto-replicante), tal como, sin limitación, una bacteria u hongo, por ejemplo, reduciendo numerosas unidades formadoras de colonias del microbio celular en un cultivo o colonia de bacterias, o para inhibir la tasa de crecimiento de una colonia o cultivo de células. Del mismo modo, en referencia a partículas de virus o viriones (p. ej., no auto-replicantes), el término "neutralizar" se refiere a una reducción de la infectividad de un único virión y a la infectividad global (p. ej., una reducción en el número de unidades infecciosas (UI) o unidades formadoras de placa (UFP)) de una muestra de partículas de virus. Los Ejemplos no limitantes de destrucción de bacterias u hongos, y neutralización de viriones, y de los métodos de ensayo para tal destrucción o neutralización se proporcionan en los Ejemplos más abajo.

El término "tratamiento" y términos similares, en el contexto de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria, hacen referencia a la acción y la capacidad de un péptido para reducir, eliminar, destruir, aliviar, y/o

- estabilizar una infección en un sujeto, tal como un paciente humano o veterinario. "Prevención" y términos similares en el contexto de la presente descripción hacen referencia a la administración de un péptido a un sujeto, antes o durante la exposición a un microbio con el objetivo de reducir o prevenir la infectividad del microbio en el sujeto. La administración de un péptido durante un período de incubación, o la sospecha de un período de incubación de un virus u otro microbio (p. ej., después de una posible exposición a VIH o rabia), es un uso preventivo de los péptidos descritos en la presente memoria. La idoneidad y la dosificación eficaz y el régimen de tratamiento para un péptido en el tratamiento o la prevención de una infección se determinan típicamente por medio de estudios de una población de sujetos estadísticamente relevante, y se determina en comparación con un placebo u otro control negativo.
- 5 Los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria son análogos estructurales y funcionales del péptido parental, LLP1, que muestra una toxicidad selectiva para los microorganismos. Según se utiliza en la presente memoria, el término "análogo" hace referencia a un péptido que contiene sustituciones, reordenamientos, deleciones, adiciones y/o modificaciones químicas en la secuencia de aminoácidos del péptido parental, y conserva las propiedades estructurales y funcionales del péptido parental. Estos también incluyen los LBU.
- 10 Los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria carecen de la homología de secuencia primaria significativa con péptidos distintos de LLP antimicrobianos conocidos (p. ej., magaininas o catelicidinas). Los péptidos son ricos en residuos cargados positivamente (Arg) y se prevé que formen parte de una hélice α anfipática. La hélice α anfipática confiere una actividad antimicrobiana única y potente a los péptidos descritos en la presente memoria. Las propiedades estructurales que definen ciertos péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria incluyen, entre otros, la capacidad para formar estructuras α -helicoidales anfipáticas tridimensionales (Eisenberg y Wesson, 1990, *Biopolymers* 29:171-177). La estructura α -helicoidal anfipática comprende residuos dispuestos de manera que 3,6 residuos de aminoácido completan una espira de la hélice. Basándose en esta disposición, derivada de las restricciones de plegamiento de las proteínas bien conocidas, se puede hacer una estimación del carácter anfipático mediante el examen de la secuencia de aminoácidos.
- 15 En un ejemplo, la optimización de este motivo α -helicoidal anfipático "ideal" es uno de los principios utilizados para generar los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria. En otro ejemplo, la sustitución de residuos de Arg en la cara hidrófila y de residuos de Trp o Val en la cara hidrófoba es uno de los principios utilizados para generar los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria. Los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria pueden contener adicionalmente Ala, Gly, Ile, o Phe y otros residuos de D- o L- aminoácidos que pueden ser tolerados dentro de la estructura α -helicoidal anfipática general. Estos residuos pueden conferir o facilitar una estructura, que aumenta la potencia y la selectividad de un péptido de una manera que solamente se puede determinar empíricamente. Algunos péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria contienen una Cys que, en virtud de su capacidad para formar un enlace disulfuro, pueden conferir un aumento de potencia a un péptido que contiene un residuo tal como un péptido dimérico con uniones disulfuro (p. ej., bis-eLLP). La posición de la Cys radica en la interfase de las caras hidrófila e hidrófoba de la estructura α -helicoidal anfipática cuando se modela como tal. La colocación de tales residuos de Cys no resultaría obvia para un experto en la técnica y debe ser determinada empíricamente. Esto puede ser logrado por un experto en la técnica sin experimentación indebida, p. ej., utilizando un modelado por ordenador de la estructura peptídica. Por ejemplo, se pueden utilizar programas de modelado por ordenador tales como "Helical Wheel" (Genetics Computer Group, Madison, Wis.) para diseñar los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria. En un ejemplo adicional, la longitud de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria se puede incrementar para mejorar su actividad antimicrobiana.
- 20
25
30
35
40
- Los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria son únicos en sus propiedades funcionales. La estructura única de los péptidos antimicrobianos confiere una elevada potencia a la vez que mantiene la selectividad para la bacteria. La potencia de los péptidos antimicrobianos se compara muy favorablemente con la de magainina o catelicidina. Los péptidos antimicrobianos destruyen rápidamente las bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas, demostrando un amplio espectro de actividad que incluye, pero no se limita a, bacterias gram-positivas tales como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* (incluyendo cepas sensibles a vancomicina (VSEF) y resistentes a vancomicina (VREF)), *Enterococcus faecium* (incluyendo cepas sensibles a vancomicina (VSEF) y resistentes a vancomicina (VREF)), *Staphylococcus aureus* (incluyendo cepas sensibles a meticilina (MSSA) y resistentes a meticilina (MRSA)), *Staphylococcus epidermidis* (incluyendo cepas sensibles a meticilina (MSSE) y resistentes a meticilina (MRSE)), *Staphylococcus salivarius*, *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium pseudodiphtheriae*, *Corynebacterium stratium*, *Corynebacterium* grupo G1, *Corynebacterium* grupo G2, *Streptococcus pneumonia* (incluyendo cepas resistentes a penicilina (PSRP)), *Streptococcus mitis* y *Streptococcus sanguis*; bacterias gram-negativas incluyendo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella sp.*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella typhimurium*, *Actinomyces* spp., *Porphyromonas* spp., *Prevotella melaninogenicus*, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, y *Campylobacter jejuni*. Las propiedades funcionales también incluyen una actividad antimicrobiana selectiva con una toxicidad mínima para las células de mamífero. Por lo tanto, basándose en las enseñanzas y las pautas de la presente memoria, un experto en la técnica puede diseñar fácilmente péptidos antimicrobianos que tengan una potencia y una selectividad deseadas.
- 45
50
55
60

Los análogos de péptidos antimicrobianos particulares y/u otros péptidos citolíticos están dentro del alcance de la presente invención. Los análogos conservan las propiedades estructurales y funcionales descritas en la presente memoria. En otro ejemplo de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria, se pueden utilizar D-aminoácidos en lugar de L-aminoácidos y pueden proporcionar una estabilidad metabólica mayor, ya que los péptidos que contienen D-aminoácidos son resistentes a las proteasas de mamífero, que generalmente escinden péptidos compuestos por L-aminoácidos. Por ejemplo, los análogos de cecropina que contienen D-aminoácidos muestran actividad antibacteriana (Merrifield et al., *Antimicrobial Peptides*, Ciba Foundation Symposium, Wiley, Chichester, 5-26, 1994). Los análogos de péptidos que son más largos que el péptido parental LLP1 se describen en la presente memoria. Estos péptidos pueden ser más potentes que la secuencia parental de LLP1 cuando se comparan sobre una base molar, y demuestran un espectro de actividad más amplio. Como se ha comentado anteriormente, la inclusión de un residuo de Cys en un péptido antimicrobiano es útil para facilitar la formación de enlaces disulfuro intramoleculares o intermoleculares que pueden estabilizar un péptido dimérico y mejora la potencia antimicrobiana contra ciertos patógenos microbianos tales como *S. aureus*.

Los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria pueden ser altamente activos en condiciones de alta concentración de sal y en fluidos biológicos (véase el Ejemplo 4 y las Figuras 3-6). La capacidad de los péptidos para mantener la actividad a concentraciones de NaCl fisiológicas permite que los péptidos muestren actividad antimicrobiana en los fluidos fisiológicos de anfitriones vertebrados.

Los péptidos descritos en la presente memoria se pueden sintetizar mediante métodos de síntesis de péptidos clásicos en fase lipídica o en fase sólida, incluyendo las químicas de Fmoc y t-Boc. En un ejemplo, se utilizan las técnicas en fase sólida de Merrifield, utilizando procedimientos manuales o automatizados conocidos por los expertos en la técnica, p. ej., como describen Miller et al. (*AIDS Research & Human Retroviruses* 7:511-519 (1991)), utilizando un modelo 200 Advanced Chemtech (Advanced Chemtech, Louisville, Ky.), o utilizando un sintetizador automatizado Millipore 9050+ (Millipore, Bedford, Mass.) con protocolos de síntesis Fmoc (véase Fontenot et al., 1991, *Peptide Research* 4:19-25), u otro instrumental disponible. Los péptidos sintéticos preparados mediante cualquier método se pueden purificar, por ejemplo, mediante cromatografía de filtración en gel y HPLC en columna de fase inversa.

En otro ejemplo, se utilizan métodos de condensación de fragmentos para concatenar fragmentos de péptidos más pequeños. Varios de los péptidos descritos en la presente memoria incluyen dos o más repeticiones de la misma subunidad. Se pueden utilizar métodos de síntesis en fase sólida para producir los péptidos, pero que son costosos en comparación con la producción de péptidos más pequeños y condensarlos a continuación para formar los péptidos concatenados. Se pueden utilizar otros métodos de ligación química para concatenar las subunidades. En un ejemplo de un método de condensación de fragmentos, los fragmentos de péptidos solubles que portan un grupo carboxilo libre y otros grupos no funcionales competitivos se pueden anclar a un grupo amino libre desprotegido de un fragmento peptídico unido a resina naciente utilizando la química de condensación. Este concepto se ilustra en la Figura 27 y se describe esencialmente en Chang WC et al., Eds. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Oxford University Press (2000), USA. Los péptidos también se pueden preparar mediante tecnología de ADN recombinante convencional utilizando mecanismos bien conocidos por los expertos en la técnica para el diseño de péptidos basado en nucleótidos (véase, p. ej., Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Nueva York, 1995). Se pueden utilizar la mutagénesis dirigida al sitio o la síntesis de oligonucleótidos, por ejemplo, para preparar análogos peptídicos a partir de péptidos parentales.

En un ejemplo, los péptidos antimicrobianos se anclan (p. ej., covalentemente) a un elemento de translocación de membrana, tal como un dominio de transducción de péptido (PTD). Se ha demostrado previamente que los PTD son capaces de translocar diversas macromoléculas al interior de una variedad de células (Mi, Z., Mai, J., Lu, X., y Robbins, P. D. Characterization of a class of cationic peptides able to facilitate efficient protein transduction in vitro and in vivo, *Mol Ther.* 2: 339-47, 2000; Shen, H., Mai, J. C., Qiu, L., Cao, S., Robbins, P. D., y Cheng, T. Evaluation of peptide-mediated transduction in human CD34+ cells, *Hum Gene Ther.* 15: 415-9, 2004; Dietz, G. P. y Bahr, M. Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach, *Mol Cell Neurosci.* 27: 85-131, 2004; Ziegler, A., Nervi, P., Durrenberger, M., y Seelig, J. The cationic cell-penetrating peptide CPP(TAT) derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence, *Biochemistry.* 44: 138-48, 2005; Guelen, L., Paterson, H., Gaken, J., Meyers, M., Farzaneh, F., y Tavassoli, M. TAT-apoptin is efficiently delivered and induces apoptosis in cancer cells, *Oncogene.* 23: 1153-65, 2004; Ribeiro, M. M., Klein, D., Pileggi, A., Molano, R. D., Fraker, C., Ricordi, C., Inverardi, L., y Pastori, R. L. Heme oxygenase-1 fused to a TAT peptide transduces and protects pancreatic beta-cells, *Biochem Biophys Res Commun.* 305: 876-81, 2003; Wheeler, D. S., Dunsmore, K. E., y Wong, H. R. Intracellular delivery of HSP70 using HIV-1 Tat protein transduction domain, *Biochem Biophys Res Commun.* 301: 54-9, 2003; Caron, N. J., Torrente, Y., Camirand, G., Bujold, M., Chapdelaine, P., Leriche, K., Bresolin, N., y Tremblay, J. P. Intracellular delivery of a Tat-eGFP fusion protein into muscle cells, *Mol Ther.* 3: 310-8, 2001; y Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F., y Divita, G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells, *Nat Biotechnol.* 19: 1173-6, 2001). Por lo tanto se cree que el anclaje de un elemento de translocación de membrana, tal como un PTD, a un péptido antimicrobiano potenciará la actividad del péptido antimicrobiano.

Según se utiliza en la presente memoria, un "elemento de translocación de membrana" es un compuesto, composición, complejo o molécula que se puede conjugar o anclar de otro modo, covalentemente, o de otro modo, a un segundo compuesto y que, cuando se pone en contacto con una célula, tiene la capacidad de ocasionar la translocación de un segundo compuesto a través de una membrana celular y al interior de la célula. En un ejemplo particular, el elemento de translocación de membrana es un "dominio de transducción de péptido" o "PTD" y es, en su sentido más amplio, un fragmento de péptido que, cuando se ancla a un polipéptido, tal como una proteína o enzima, facilita la internalización del polipéptido por una célula de mamífero. El mecanismo por el cual se cree que se produce la translocación de membrana es, sin ningún intento de estar limitado por esta teoría, un mecanismo independiente de la temperatura, no endocítico que se cree que implica la desestabilización de la membrana. Los PTD bien conocidos incluyen los PTD de tat de VIH y de antenapedia de *Drosophila*. Se han desarrollado análogos de PTD de tat sintéticos (Ho et al., (2001) *Cancer Research* 61:474-477; Mai, et al. (2002), Efficiency of Protein Transduction is Cell Type-dependent and is enhanced by Dextran Sulfate, *J. Biol. Chem.* 277(33):30208-218; y Shen, H., et al. *Hum. Gene Ther.* 15:415-419). También se ha demostrado que tramos de poli-arginina, por ejemplo y sin limitación 4-12 residuos de Arg, tramos de poli-lisina, por ejemplo y sin limitación 2-12 residuos de Lisina, y tramos de "poliIRQ" de 5-11 residuos (RR(QRR)1-3), como describen Mai, et al. (2002), *J. Biol. Chem.* 277(33):30208-218, son útiles como PTD. Un tramo rico en arginina y lisina, específicamente, un tramo que comprende una mayor parte de arginina y lisina también puede servir como un PTD. Un ejemplo no limitante de un PTD útil es: RRQRRTSKLMKR (SEQ ID NO: 17). De este modo, un ejemplo de un producto conjugado de PTD-antimicrobiano es RRQRRTSKLMKR - X (SEQ ID NO: 17), donde X es un péptido antimicrobiano como se describe en la presente memoria, incluyendo: SA-5 (SEQ ID NO: 1); LSA-5 (SEQ ID NO: 2); WLSA-5 (SEQ ID NO: 3); LBU-1 (SEQ ID NO: 4); LBU-2 (SEQ ID NO: 5); LBU-3 (SEQ ID NO: 6); LBU-3.5 (SEQ ID NO: 7); LBU-4 (SEQ ID NO: 8); WLBU-1 (SEQ ID NO: 9); WLBU-2 (SEQ ID NO: 10); WLBU-3 (SEQ ID NO: 11); WLBU-4, (SEQ ID NO: 12); WR6 (SEQ ID NO: 13). Como tal, suponiendo que X está anclado al PTD por un enlace peptídico, un péptido que comprende el PTD descrito más arriba y WLBU-2 tendría la secuencia de aminoácidos: RRQRRTSKLMKR-RRWVR RVRRV WRW RVRVR RVRVR (SEQ ID NO: 18), en la que el guión indica la unión de enlace peptídico entre el PTD y WLBU-2.

En un ejemplo, un péptido antimicrobiano, tal como cualquier polipéptido antimicrobiano descrito en la presente memoria, forma un complejo con un PTD por medio de un anclaje covalente. Un anclaje covalente típico entre el PTD y los péptidos antimicrobianos sería, sin limitación, un enlace peptídico común, aunque serían ciertamente adecuados otros métodos de anclaje covalente, con tal que el PTD tenga el efecto deseado de facilitar la translocación de la membrana celular de un péptido antimicrobiano, y por lo tanto cargar la célula elegida como diana. En un ejemplo, el PTD se ancla al péptido antimicrobiano por medio de un espaciador de di-glicina (Mai, et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277(33):30208-218). Se pueden utilizar otros métodos de entrecruzamiento para anclar el PTD y el péptido antimicrobiano. También se encuentra disponible en el mercado un gran número de químicas de conjugación de proteínas (véase *en general*, Cross-Linking reagents, Technical Handbook, 2005, Pierce Biotechnology, Inc.). Se pueden emplear muchos reactivos bi-funcionales o poli-funcionales, tanto homo- como heterofuncionales (tales como los descritos en el catálogo de Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.), como grupo conector. El acoplamiento se puede efectuar, por ejemplo, a través de grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo o residuos carbohidratados oxidados.

El complejo de PTD-péptido antimicrobiano se puede preparar mediante procedimientos de síntesis de polipéptidos bien conocidos o mediante una construcción genética recombinante adecuada para la producción recombinante del complejo de PTD-péptido antimicrobiano, que se puede preparar y suministrar a una célula anfitriona para la producción de la proteína deseada. Las células anfitrionas adecuadas para la producción recombinante de la proteína deseada incluyen células bacterianas, de levadura, de insecto y de mamífero como es ampliamente conocido. La proteína recombinante puede ser producida en un cultivo por lotes, o en un cultivo continuo en un biorreactor.

En un ejemplo, se ancla un ácido nucleico que contiene un marco de lectura abierto (ORF) que codifica un péptido antimicrobiano, en marco, con un ácido nucleico que contiene una secuencia que codifica un PTD para producir un ORF que codifica un PTD-péptido antimicrobiano funcional. Los métodos para el anclaje (ligación) de un ácido nucleico que codifica PTD a un ácido nucleico que codifica un péptido antimicrobiano son conocidos en la técnica, si no una cuestión de simple elección de diseño de un experto en el campo de la biología molecular. Los vectores que contienen casetes de expresión se encuentran ampliamente disponibles para la expresión de genes en diversas células anfitrionas, tales como células de *E. coli*, *S. cerevisiae*, insecto y mamífero, tales como células de Ovario de Hámster Chino (CHO).

Por "expresión" se quiere significar el flujo global de información de un gen (sin limitación, una unidad genética funcional para la producción de un producto génico, típicamente codificado por ADN o ARN, para algunos virus, y que comprende un promotor transcripcional, y otros elementos que actúan en *cis*, tales como elementos de respuesta y/o potenciadores, una secuencia expresada que codifica típicamente una proteína (marco de lectura abierto u ORF) o ARN funcional/estructural, y una secuencia de poliadenilación), para producir un producto génico (típicamente una proteína, opcionalmente modificada post-traduccionalmente o un ARN funcional/estructural). Por "expresión de genes bajo el control transcripcional de", o alternativamente "sujeto a control por" una secuencia designada, se quiere significar la expresión génica de un gen que contiene la secuencia designada conectada operablemente (anclada funcionalmente, típicamente en *cis*) al gen. La secuencia designada puede ser la totalidad o

parte de los elementos transcripcionales (sin limitación, promotores, potenciadores y elementos de respuesta), y puede regular y/o afectar totalmente o parcialmente a la transcripción de un gen. Un "gen para la expresión de" un producto génico establecido es un gen capaz de expresar ese producto génico establecido cuando se coloca en un entorno adecuado - esto es, por ejemplo, cuando se transforma, transfecta o transduce a una célula, y se somete a condiciones adecuadas para su expresión. En el caso de un promotor constitutivo, "condiciones adecuadas" significa que típicamente solo se necesita que el gen sea introducido en una célula anfitriona. En el caso de un promotor inducible, "condiciones adecuadas" significa que se administra al sistema de expresión una cantidad del respectivo inductor (p. ej., célula) eficaz para ocasionar la expresión del gen.

Como se ha indicado anteriormente, se puede preparar un polipéptido de péptido antimicrobiano-PTD por medio de químicas de síntesis de proteínas convencionales. El polipéptido de péptido antimicrobiano-PTD también se puede preparar mediante condensación de fragmentos en la que una proteína PTD y una o más unidades de base lítica se anclan mediante condensación. De esta manera, se puede fabricar fácilmente una variedad de polipéptidos de péptido antimicrobiano-PTD diferentes a partir de bloques de construcción básicos. Del mismo modo, se evitan el coste y el tiempo requeridos para la síntesis de polipéptidos base por base mediante concatenación de las subunidades pre-fabricadas.

Las secuencias de aminoácidos de los péptidos se pueden confirmar e identificar mediante análisis de la composición de aminoácidos así como degradación de Edman manual y automatizada y determinación de los aminoácidos, análisis mediante HPLC, o espectrometría de masas. El aminoácido N-terminal de los péptidos puede contener un grupo amino libre o puede estar acetilado, y el aminoácido C-terminal del péptido puede estar amidado, lipidado o puede comprender un grupo carboxilo libre. Otras modificaciones de los extremos del péptido conocidas por los expertos en la técnica se encuentran dentro del alcance de la invención.

El carácter crítico de residuos de aminoácido particulares en un péptido se puede someter a ensayo alterando o reemplazando el residuo de interés. Por ejemplo, el requerimiento de un residuo de Cys, que puede estar implicado en la formación de enlaces disulfuro intramoleculares o intermoleculares, se puede someter a ensayo mediante mutagénesis de la Cys a otro aminoácido, por ejemplo, tirosina, que no puede formar semejante enlace. Se puede alterar químicamente una Cys con el fin de prevenir la formación de un enlace disulfuro, por ejemplo, mediante reducción y carboxiamidación, en las que se añade un grupo amida al átomo de azufre de la cisteína (Creighton, T. E., ed., *Protein Structure: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1989). Por otra parte, se puede mantener un residuo de Cys en un péptido en estado oxidado (esto es, en forma de un enlace disulfuro) con el fin de evaluar si tales enlaces están implicados en la actividad antimicrobiana de un péptido. Semejante oxidación se puede realizar, por ejemplo, por medio de un procedimiento de oxidación con aire (Ellman, G. L., *Arch. Biochem.* 82: 70-77, 1959), o por medio de oxidación con DMSO (Tam et al., *J. Am. Chem. Soc.* 113: 6657-6662, 1991). De un modo similar, los residuos de Trp se pueden sustituir en la cara hidrófoba (p. ej., el péptido WLSA-5 (SEQ ID NO: 3)).

El modelado por ordenador es útil para diseñar los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria basándose en sus propiedades estructurales preferidas. Un método convencional conocido en la técnica para la predicción de la estructura helicoidal anfipática a partir de una secuencia lineal es el algoritmo de Eisenberg (Eisenberg et al., *Biopolymers* 27: 171-177, 1990) y es útil para el modelado de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria. Las secuencias peptídicas se analizan para determinar la estructura secundaria pronosticada, el momento hidrófobo, y el carácter anfipático utilizando programas asequibles para el experto en la técnica (p. ej., se pueden obtener de internet). Se pueden utilizar estos programas que generalmente utilizan algoritmos que son predictivos de la estructura secundaria (Chou et al., *Adv. Enz.* 47: 45-146, 1978; Gamier et al., *J. Mol. Biol.* 120: 97, 1978) o del momento hidrófobo (Eisenberg et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:140-144, 1984).

La concentración de péptido se puede cuantificar utilizando un análisis colorimétrico con ninhidrina convencional (véase el Ejemplo 1 más abajo). Se genera una curva patrón utilizando un patrón de Leu mediante la lectura de la absorbancia espectrofotométrica a 570 nm de volúmenes crecientes de la provisión de partida de leucina combinada con reactivos de ninhidrina disponibles en el mercado (Dupont) en un espectrofotómetro. Las lecturas de las muestras de péptidos se comparan con la curva patrón de leucina para cuantificar la cantidad de péptido de cada muestra. Alternativamente, si el péptido contiene Trp en su secuencia, se puede determinar la concentración de péptido mediante espectroscopía de UV utilizando un coeficiente de extinción molar a 280 nm = 5500 Lmol⁻¹cm⁻¹).

El efecto de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria sobre la viabilidad de las células procarióticas y eucarióticas se puede analizar mediante cualquier método que determine la supervivencia después del tratamiento o la exposición a los péptidos. Para el escrutinio, se utilizan análisis de dilución de caldo bacteriano convencionales y se pueden comparar con análisis de lisis de glóbulos rojos (véase Tencza et al., 1999, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44:33-41). Sin embargo, en última instancia esta comparación de toxicidad selectiva se debe realizar cuando las células tanto procarióticas como eucarióticas se exponen al péptido en condiciones idénticas. Adicionalmente, también se puede someter a ensayo el efecto de los péptidos antimicrobianos sobre la viabilidad de otros patógenos, incluyendo levaduras, micoplasmas y virus.

Las propiedades antibacterianas de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria se pueden determinar, p. ej., a partir de un análisis de lisis bacteriana (Ejemplo 1), así como mediante otros métodos,

incluyendo, entre otros, análisis de inhibición del crecimiento (Blondelie et al., *Biochemistry* 31:12688, 1992), análisis de viabilidad bacteriana basados en fluorescencia (p. ej., Molecular Probes BacLight), análisis de citometría de flujo (Arroyo et al., *J. Virol.* 69: 4095-4102, 1995), y otros análisis convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

- 5 La determinación de las propiedades antifúngicas de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria se puede realizar mediante mecanismos bien conocidos por los expertos en la técnica (Selitrennikoff, C., Screening for Antifungal Drugs, en *Biotechnology of Filamentous Fungi*, Finkelstein et al., eds., Butterworth-Heinemann, Boston, 1992, véase también el Ejemplo 10, más abajo. La determinación de las propiedades antivirales de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria se puede realizar mediante mecanismos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo mediante la capacidad del péptido para inhibir la formación de placa viral en análisis *in vitro* reconocidos en la técnica convencionales (p. ej., Wild et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10537-10541, 1992, véanse también los Ejemplos 5 y 8 a continuación).

15 Los análisis para la inhibición del crecimiento de una diana microbiana se pueden utilizar para obtener un valor de concentración bactericida mínima (MBC) para el péptido, es decir, la concentración de péptido requerida para destruir 99,9% (disminución de 3 unidades logarítmicas) de la muestra microbiana que se está sometiendo a ensayo. Este valor es bien conocido por los expertos en la técnica como representativo de la eficacia de un agente antimicrobiano particular (p. ej., un antibiótico) contra un organismo o grupo de organismos particulares. En análisis para detectar la MBC de un péptido, la inhibición del crecimiento de una población bacteriana también se puede medir con referencia al número de unidades formadoras de colonias (ufc) después de la exposición al péptido con respecto a un experimento de control sin el péptido.

20 Otro parámetro útil en la identificación y medición de la eficacia de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria es la determinación de la cinética de la actividad antimicrobiana de un péptido. Semejante determinación se puede llevar a cabo realizando cualquiera de los análisis descritos en la presente memoria y determinando la actividad antimicrobiana como una función del tiempo. En un ejemplo preferido, los péptidos presentan cinéticas que dan como resultado la destrucción eficaz de un microorganismo.

25 Los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria presentan una toxicidad selectiva para microorganismos diana y una toxicidad mínima para las células de mamífero. La determinación de la toxicidad de los péptidos descritos en la presente memoria sobre las células de mamífero se puede realizar utilizando análisis de cultivo de tejidos. Para las células de mamífero, tales métodos de análisis incluyen, *entre otros*, análisis de exclusión de azul tripán o MTT (véase Moore et al., 1994, *Peptide Research* 7:265-269). Cuando un tipo de célula específico puede liberar un metabolito específico tras los cambios en la permeabilidad de la membrana, ese metabolito específico puede ser analizado, p. ej., la liberación de hemoglobina tras la lisis de los glóbulos rojos (véase Srinivas et al., 1992, *Journal of Biological Chemistry* 267:7121-7127). Además, la alteración de la resistencia transepitelial (Rte) de una monocapa de células que ha formado uniones estrechas puede ser verificada (véase la Figura 9). Los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria se someten a ensayo preferiblemente contra células primarias, p. ej., utilizando células epiteliales bronquiales humanas (HBE) en cultivo polarizado, u otros cultivos de células primarias utilizados de manera rutinaria por los expertos en la técnica. También se pueden utilizar líneas celulares transformadas permanentemente, p. ej., también se pueden utilizar células Jurkat para demostrar esta prueba de concepto.

30 En la determinación del potencial terapéutico de un péptido antimicrobiano, una MBC más baja para muestras bacterianas, fúngicas, protozoarias, o virales con respecto a la observada para células de mamífero define la ventana terapéutica y refleja la toxicidad antimicrobiana selectiva del agente. La caracterización de la actividad antimicrobiana de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria se puede llevar a cabo utilizando cualquier microorganismo que pueda ser cultivado y analizado, como antes, incluyendo bacterias, hongos, protozoos o virus.

35 Se pueden llevar a cabo análisis antibacterianos para los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria para determinar la actividad destructiva de bacterias hacia microorganismos tanto gram-positivos como gram-negativos. *E. coli* y *P. aeruginosa* son ejemplos de organismos gram-negativos. *S. aureus* se puede utilizar como modelo de microorganismo gram-positivo, y esto representa una diana clínica significativa ya que la mayoría de las cepas son refractarias a la mayoría de los tratamientos antibióticos sistémicos. Se puede utilizar *S. aureus* resistente a metilicina como organismo modelo resistente a antibióticos. Se puede analizar *E. faecalis*, y en particular, los productos aislados resistentes a vancomicina encontrados en entornos clínicos, p. ej., hospitales. *S. marcescens* es una fuente de infecciones oftálmicas y otras infecciones tópicas, y se puede analizar fácilmente. Los péptidos se pueden utilizar en el tratamiento de infecciones del oído externo (otitis externa), o en el tratamiento de enfermedades transmitidas sexualmente tales como las causadas por *Neisseria gonorrhoeae*. Otros patógenos bacterianos, encontrados a menudo extracelularmente sobre superficies mucosales, que pueden ser dianas para los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, Estreptococos del Grupo B, *Gardnerella vaginalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter spp.*, *Haemophilus aegyptius*, *Haemophilus influenzae*, *S. epidermidis*, *Propionibacterium acnes*, y patógenos orales tales como *Actinomyces spp.*, *Porphyromonas spp.*, y *Prevotella melaninogenicus*. Otros patógenos microbianos

también pueden ser dianas para estos péptidos y estos patógenos microbianos, y las infecciones que éstos causan, son conocidos por los expertos en la técnica.

Mycoplasma spp. pertenece a las clase Mollicutes, eubacterias que parecen haber evolucionado regresivamente mediante reducción del genoma a partir de ancestros gram-positivos. A diferencia de las bacterias clásicas, no tienen pared celular pero en su lugar están unidos por una membrana, y pueden ser susceptibles a ciertos péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria. Se pueden realizar análisis antimicoplasma para someter a ensayo la actividad antimicoplasma de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria. Los micoplasmas patógenos humanos incluyen *Mycoplasma pneumoniae* (un patógeno respiratorio), *Mycoplasma hominis* (un patógeno urogenital) y *Ureaplasma urealyticum* (un patógeno urogenital). Los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la infección por micoplasma. Adicionalmente, la contaminación por micoplasmas es un problema frecuente en el cultivo de células *in vitro* y es muy difícil de eliminar eficazmente. Por lo tanto, los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria pueden ser útiles en la eliminación selectiva de la contaminación por micoplasma en cultivos de tejidos.

Ciertos hongos son susceptibles a los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria, incluyendo miembros de la importancia médica de los géneros *Candida* y *Cryptococcus*. Las membranas de hongos contienen ergosterol, que no se encuentra en las células humanas. Esta diferenciación puede ser aprovechada en aplicaciones terapéuticas con el fin de diseñar péptidos antimicrobianos, que inhiban selectivamente los hongos, sin que interfieran en la función de las membranas humanas o de mamífero. Se encuentran precedentes para un mecanismo direccionamiento antifúngico selectivo de membrana, por ejemplo, en la utilización del agente antifúngico, anfotericina B, que se une a ergosterol y forma poros en la membrana (Goodman et al., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Macmillan Publishing, Nueva York, 1985). Todos los hongos pueden ser considerados dianas potenciales de estos péptidos, incluyendo, pero no limitados a, dermatofitos, levaduras, hongos dimórficos, y mohos filamentosos. Los patógenos fúngicos específicos que pueden ser dianas para los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, los géneros *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Candida*, *Cryptococcus*, y *Trichophyton*, *Sporothrix schenckii* y *Aspergillus fumigatus*, así como otros patógenos fúngicos conocidos por los expertos en la técnica.

Los virus tanto con ADN como con ARN son dianas potenciales de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria. En una realización particular, un virus con envoltura puede ser susceptible al efecto antiviral de los péptidos debido a su capacidad para elegir como diana y alterar las estructuras de la membrana. Si bien todos los virus son dianas potenciales, los virus con envoltura, tales como poxvirus, herpesvirus, rabdovirus, hepadnavirus, baculovirus, ortomixovirus, paramixovirus, retrovirus, togavirus, bunyavirus y flavivirus, por ejemplo, pueden ser particularmente susceptibles a los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria. De acuerdo con la invención, el virus es un lentivirus, tal como VIH-1. También se describe un virus del herpes, tal como HSV; o un ortomixovirus, tal como un virus de influenza. En una realización, el virus es VIH-1. La propagación de este virus sobre la superficie de la mucosa podría ser manipulada mediante la administración tópica de un péptido antimicrobiano descrito en la presente memoria, tal como un péptido sintético que sea activo contra VIH-1 y otros patógenos de enfermedades transmitidas sexualmente. Véase el Ejemplo 5 más abajo. En otro ejemplo, el virus es un ortomixovirus, por ejemplo un virus de influenza, que se muestra en el Ejemplo 8, más abajo, por ser neutralizado por un péptido antimicrobiano como se describe en la presente memoria tanto en un análisis de hemaglutinación como mediante la infectividad en ratones.

Adicionalmente, el esclarecimiento del mecanismo de los péptidos y sus dianas bioquímicas puede proceder del uso de mutantes isogénicos de bacterias, hongos, micoplasma y virus que tienen alterado el contenido citoplásmico y/o de la membrana de la pared externa. Los péptidos antimicrobianos pueden someterse a ensayo específicamente frente a estos mutantes para identificar diseños específicos que sean óptimamente inhibidores de constituyentes particulares de las membranas.

Los péptidos descritos en la presente memoria pueden ser útiles para la inhibición o el tratamiento de una infección microbiana particular, tal como, infección pulmonar por fibrosis quística (véase el Ejemplo 3 más abajo), sepsis de articulaciones (véase el Ejemplo 4 más abajo), infecciones oculares, enfermedad periodontal, ETS, otitis externa, infecciones cutáneas, infecciones por quemaduras, infecciones vaginales, Candidiasis, y úlceras de pie diabético.

Además, los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria pueden ser útiles para inhibir la colonización microbiana. Por ejemplo, los péptidos pueden ser suministrados profilácticamente o expresados por células eucarióticas *in vivo*, por medio de transfección utilizando vectores virales. La expresión continuada de los péptidos en las células y la secreción a su entorno pueden interferir en la colonización de microbios y evitar la infección microbiana. Esto puede ser particularmente útil para prevenir infecciones asociadas con fibrosis quística suministrando los péptidos antimicrobianos a las células epiteliales de las vías respiratorias. Los péptidos pueden inhibir la colonización de bacterias implicadas en la fibrosis quística. Las células que expresan los péptidos pueden combatir continuamente la colonización de una gama de microbios patógenos.

En el tratamiento de la fibrosis quística u otras enfermedades de las vías respiratorias (p. ej., enfermedades o afecciones infecciosas), se puede administrar un péptido antimicrobiano descrito en la presente memoria por medio

de aerosol en una cantidad y con un régimen de dosificación eficaces para prevenir y/o tratar una infección microbiana, tal como una infección por un agente bacteriano, fúngico o viral. En un ejemplo, la forma de dosificación comprende uno o más péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria en solución salina hipotónica, que se utiliza comúnmente para ablandar el esputo en pacientes con fibrosis quística. En el tratamiento de la fibrosis quística, también se puede utilizar una forma de dosificación combinada que comprende los péptidos junto con otro agente terapéutico para el tratamiento de la fibrosis quística. Otros agentes activos que se pueden combinar con el péptido incluyen, sin limitación, desoxirribonucleasa (ADNasa, tal como dornasa alfa (p. ej., Pulmozyme), una ADNasa humana), N-acetilcisteína, albuterol y bromuro de ipratropio. Los péptidos o las formas de dosificación combinada se pueden envasar típicamente en una forma de dosificación en cualquier dispositivo de aerosolización/nebulización útil que se encuentre disponible. Los péptidos o formas de dosificación combinada pueden ser líquidos o sólidos en polvo, por ejemplo liofilizadas. Se conoce en las técnicas farmacéuticas un gran número de dispositivos de aerosolización adecuados y son apropiados para el suministro a las vías respiratorias de los péptidos antimicrobianos solos o combinados con uno o más agentes activos adicionales.

La evaluación de un péptido antimicrobiano para la inhibición o el tratamiento de una infección microbiana particular también puede implicar el uso de modelos animales de infección que son reconocidos por los expertos en la técnica por ser relevantes para tales infecciones en un ser humano u otro mamífero. El Ejemplo 3 de más abajo describe un modelo de cultivo celular de infección por fibrosis quística en el que se puede someter a ensayo la toxicidad selectiva de los péptidos. El Ejemplo 4 de más abajo describe un modelo animal de sepsis de las articulaciones que se puede utilizar para evaluar péptidos antimicrobianos.

Las ventajas de la utilización de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria como antibióticos incluyen la probabilidad de que pueda ser más difícil para un microorganismo desarrollar un mecanismo de resistencia contra un antibiótico que se dirija a una estructura de membrana. El hecho de que otros patógenos microbianos no hayan sido expuestos nunca a estos agentes (en contraste con los antibióticos convencionales) es una ventaja adicional. A la vista de las propiedades indicadas anteriormente de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria, se contempla que puedan ser utilizados en el tratamiento de un proceso infeccioso en un anfitrión causado por un microorganismo.

La administración sistémica de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria puede inducir una respuesta inmunogénica en un anfitrión. Por lo tanto, los mecanismos conocidos en la técnica, tales como el encerado con polietilenglicol, se pueden emplear para reducir la inmunogenicidad de los péptidos cuando se administran sistémicamente.

En el contexto del suministro de los péptidos descritos en la presente memoria para prevenir o tratar una infección, una "cantidad eficaz" de un agente terapéutico dado, compuesto, *etc.*, es una cantidad eficaz para lograr un objetivo profiláctico o terapéutico deseado en un paciente. En el contexto de la prevención o el tratamiento de una infección por un agente infeccioso, tal como un agente bacteriano, fúngico o viral, esto significa que cualquier infección es prevenida y/o aliviada por el agente en comparación con un control negativo (sin el péptido). El estado de cualquier enfermedad o afección se puede controlar mediante cualquier método adecuado conocido por los expertos en medicina, incluyendo, sin limitación, los métodos descritos en la presente memoria.

Asimismo se proporcionan en la presente memoria superficies a las que se han anclado uno o más péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria. La superficie puede ser cualquier superficie (p. ej., sustrato) a la que se pueda anclar un péptido, incluyendo: plásticos (composiciones poliméricas); cerámicas u otros materiales compuestos inorgánicos, incluyendo hueso artificial o sustitutos dentales; metales; vidrio; telas y fibras (p. ej., tejidas, no tejidas, fibras, suturas, *etc.*), o combinaciones de materiales, tales como metales recubiertos de polímeros. Por superficie, se quiere significar cualquier sitio del material al cual se puede anclar un péptido, incluyendo superficies externas, tales como superficies visibles, y superficies internas, tales como las superficies interiores de poros, intersticios o matrices. El péptido se puede anclar directamente a la superficie o a través de un grupo de conexión que puede ser cualquier grupo útil. Los péptidos comprenden una amina N-terminal así como un grupo carboxilo C-terminal. Se considera que estos dos grupos son "grupos activos" ya que se pueden utilizar para conectar con otro compuesto, tal como un polímero o conector. Otros ejemplos no limitantes de grupos activos incluyen OH, SH, CN, epóxido, así como una miríada de otros grupos que se pueden utilizar para conectar compuestos químicos. Como se ha indicado anteriormente, los péptidos se pueden conectar directamente al sustrato si el sustrato tiene grupos amina o carboxilo reactivos, tales como amidoésteres y ésteres de N-hidroxisuccinimida para el grupo amina y carbodiimidias para el grupo carboxilo. Más típicamente, el péptido se conecta a una superficie por medio de un conector. Se encuentra disponible un gran número de conectores (véase p. ej., CROSSLINKING REAGENTS: Technical Handbook, núm. 1601361 (03/06), Pierce Biotechnology, Inc. (Thermo Scientific)). Se pueden utilizar compuestos poliméricos, incluyendo copolímeros, como conectores por ejemplo, polimerizando monómeros sobre una superficie mediante cualquier química útil, incluyendo la condensación, la polimerización de radicales, *etc.*

Las superficies se pueden derivatizar con el péptido mediante cualquier método útil. Las siguientes son meramente ilustrativas. Se puede conectar vidrio con un péptido recubriendo primero el vidrio con un siloxano (p. ej., siloxano (silicona, que comprende un grupo activo pendiente de la cadena principal de siloxano (Si-O)_n, incluyendo, sin limitación organosiloxanos, carboxisiloxanos, carboxiglicolestersiloxanos, y aminosiloxanos) y anclando con

5 posterioridad los péptidos a través de un conector adecuado. Alternativamente, se puede derivatizar el vidrio que tiene un grupo haluro, tal como el resultante del tratamiento con o la incorporación de un haluro de silicio, tal como bromuro de silicio, mediante un método de polimerización de radicales, tal como polimerización de radicales por transferencia de átomos (ATRP), para proporcionar un conector y grupos activos a los cuales se puede anclar el péptido. Se pueden recubrir metales con una composición de recubrimiento adecuada, por ejemplo uno o más polímeros o copolímeros, que comprenden grupos activos a los cuales se puede anclar un péptido o conector. Las cerámicas y otros compuestos inorgánicos se pueden derivatizar con un péptido, por ejemplo, mediante el método de inmersión descrito en el ejemplo de más abajo, o recubriendo el material con una composición que proporciona grupos activos.

10 Se espera que cualquier polipéptido (péptido) descrito en la presente memoria que muestre actividad antimicrobiana (*véanse*, por ejemplo, los enumerados en el Ejemplo 4, Tabla 3) conserve su actividad antimicrobiana en la conjugación con una superficie (p. ej., sustrato en fase sólida). Por lo tanto, los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria son útiles como recubrimientos sobre: dispositivos implantados, tales como prótesis, p. ej., articulaciones y miembros protésicos. Los péptidos también pueden ser útiles como recubrimientos sobre órganos artificiales y matrices para los mismos, así como lentes intraoculares.

15 Los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria pueden tener un único grupo amino y un grupo sulfhidrilo libre. Estos grupos funcionales permiten el anclaje específico a una superficie derivatizada. Por ejemplo, se puede utilizar la química de la N-hidroxisuccinimida (NHS) para anclar una superficie apropiadamente derivatizada al grupo amino N-terminal del péptido. Alternativamente, se podría entrecruzar una superficie derivatizada con grupos carboxilo libres con el grupo sulfhidrilo libre del residuo de Cys del péptido utilizando éster de m-maleimidobencil-N-hidroxi-succinimida (MBS, Pierce Chemical, Rockford, IL). Otros métodos para el acoplamiento de péptidos a superficies derivatizadas son conocidos por los expertos en la técnica.

20 Los péptidos antimicrobianos también pueden ser absorbidos o adsorbidos sobre o en un material. Por ejemplo, un hidrogel, tal como un implante intraocular puede comprender uno o más péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria con el fin de evitar la infección. Los péptidos antimicrobianos pueden ser absorbidos en o sobre una venda, y opcionalmente secados o liofilizados. Las matrices para la modificación de tejidos, tales como matrices naturales preparadas a partir de colágeno y/u otro componente de la matriz extracelular se pueden tratar con los péptidos antimicrobianos antes de la implantación o la siembra con células. Otros ejemplos de artículos que se pueden beneficiar de tener una superficie o contenido antimicrobianos son o serían reconocidos por un experto en la técnica, incluyendo sin limitación: vendas; suturas; grapas; dispositivos médicos para el contacto con un sujeto o una célula, tejido, fluido corporal, biopsia u órgano de un sujeto; artículos para la manipulación y el tratamiento de fluidos corporales ex vivo o in vitro, tales como recipientes para sangre, suero o plasma, filtros, matraces, conductos, botes, tubos, fuentes y placas para el cultivo de tejidos, tubos de centrífuga, pipetas y puntas desechables de las mismas, columnas de cromatografía y medios de cromatografía, tales como agarosa o esferas poliméricas etc. y como se describe en otra parte en esta descripción; prendas de vestir y artículos de seguridad, tales como trajes protectores, uniformes, guantes, gafas y artículos protectores tales como máscaras respiratorias; y utensilios para comer desechables o no desechables, incluyendo tetinas u otras válvulas para su uso en biberones o vasos anti-goteo y artículos para servicio alimenticio (p. ej., cubertería de plata, cristalería, cuencos, etc.), que serían especialmente útiles para el servicio de sujetos inmunocomprometidos.

25 Adicionalmente, se proporciona en la presente memoria un complejo de péptido-carga, en donde los péptidos descritos en la presente memoria se pueden anclar a una carga para permitir el suministro de la carga a un microorganismo diana. La carga puede comprender un factor que tiene una actividad antimicrobiana y puede mejorar la potencia o incrementar la actividad antimicrobiana de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria se pueden entrecruzar con enzimas antibacterianas tales como lisozimas o antibióticos, tales como penicilina, para incrementar su potencia. Otros métodos para el anclaje de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria a una carga son bien conocidos en la técnica.

30 Se proporcionan métodos para la eliminación de un proceso infeccioso mediante la administración de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria a un paciente durante un tiempo y en unas condiciones que promuevan la curación. En un aspecto particular, la elevada potencia y la rápida actividad bactericida de estos péptidos hacen de ellos candidatos atractivos para su uso en terapias preventivas, tales como esterilización de heridas antes de la sutura, así como esterilización del instrumental antes de su utilización en procedimientos quirúrgicos u otros procedimientos invasivos. Su especificidad microbiana hace que los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria sean particularmente útiles en la inhibición del crecimiento microbiano no deseado en cultivos de tejidos, especialmente aquellos utilizados para la producción de proteínas recombinantes o vectores para su uso en terapia génica. En otro ejemplo, los péptidos se pueden utilizar en formulaciones combinados con uno o más fármacos distintos para facilitar el suministro de un fármaco a una célula anfitriona o microorganismo (p. ej., véase el Ejemplo 4, Figura 12).

35 Se proporcionan composiciones fisiológicas que contienen uno o más de los péptidos antimicrobianos como ingrediente activo que se puede administrar a un anfitrión en una cantidad terapéuticamente eficaz, una cantidad del

péptido (o combinaciones de péptidos) suficiente para minimizar o eliminar el microorganismo diana de un cultivo celular, o un individuo anfitrión.

Las composiciones fisiológicas contienen una dosificación terapéuticamente eficaz de al menos uno de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria, junto con un portador farmacéuticamente aceptable. También se proporcionan métodos para el tratamiento de una infección microbiana en un anfitrión utilizando los péptidos antimicrobianos y las composiciones descritas en la presente memoria. Semejante tratamiento comprende la administración de una composición fisiológica en una cantidad terapéuticamente eficaz a un individuo que necesita semejante tratamiento. Las composiciones se pueden administrar parenteralmente por vía intramuscular o intravenosa pero también podrían ser útiles cuando se administraran mediante aerosolización, administración subcutánea, oral, tópica e intranasal. Preferiblemente, las composiciones fisiológicas que contienen los péptidos descritos en la presente memoria se aplican tópicamente para la eliminación de infecciones superficiales causadas por microorganismos. Cuando se utiliza en una composición farmacéutica tópica, el péptido ingrediente activo se puede utilizar a una concentración de 0,001 20% (p/v) de la composición.+++

Cuando se aplican tópicamente, las composiciones del péptido se pueden combinar con otros ingredientes, tales como portadores y/o coadyuvantes. Los péptidos también se pueden anclar covalentemente a un portador proteico, tal como albúmina, o a un implante prostético con el fin de minimizar la difusión de los péptidos. No existen limitaciones sobre la naturaleza de tales otros ingredientes, excepto que deben ser farmacéuticamente aceptables, eficaces para la administración pretendida y no pueden degradar los ingredientes activos de las composiciones. Cuando una composición que comprende un péptido antimicrobiano descrito en la presente memoria se aplica a un sitio de infección tópica, puede actuar como irritante (lo que estimularía el flujo de células captadoras). Las composiciones del péptido también pueden estar en forma de pomadas o suspensiones, preferiblemente combinadas con colágeno purificado. Las composiciones del péptido también se pueden impregnar en parches transdérmicos, emplastos y vendas, preferiblemente en una forma líquida o semi-líquida.

Los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria también se pueden administrar sistémicamente para promover la curación de un proceso infeccioso. Cuando se aplican sistémicamente, las composiciones del péptido se pueden formular en forma de líquidos, píldoras, comprimidos, grageas o similares, para la administración entérica, o en forma líquida para inyección parenteral. Los péptidos (o productos conjugados de péptido-proteína) se pueden combinar con otros ingredientes tales como portadores y/o coadyuvantes conocidos por los expertos en la técnica. No existen limitaciones sobre la naturaleza de tales otros ingredientes, excepto que deben ser fisiológicamente aceptables, eficaces para su administración pretendida y no pueden degradar los ingredientes activos de las composiciones. Las formas fisiológicas adecuadas para inyectables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos la forma de solución última debe ser estéril y fluida. Los portadores típicos conocidos en la técnica incluyen un medio disolvente o de dispersión que contiene, por ejemplo, soluciones acuosas tamponadas con agua (*es decir*, tampones biocompatibles), etanol, poliol tal como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, mezclas adecuadas de los mismos, tensioactivos o aceites vegetales. La esterilización se puede lograr mediante un mecanismo reconocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, filtración o adición de agentes antibacterianos o antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico o timerosal. Adicionalmente, se pueden incorporar agentes isotónicos tales como azúcares, por ejemplo, a las composiciones sujeto. La producción de soluciones inyectables estériles que contienen los péptidos sujeto se logra incorporando estos compuestos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos ingredientes enumerados más arriba, según se requiera, seguido de esterilización, preferiblemente esterilización por filtración.

Cuando los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria se administran oralmente, las composiciones fisiológicas de los mismos que contienen una dosificación eficaz del péptido también pueden contener un diluyente inerte, un portador comestible, asimilable y similares, estar en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, ser comprimidas en comprimidos, o pueden estar en un elixir, suspensión, jarabe, o similar. Los péptidos sujeto se componen de ese modo para una administración conveniente y eficaz en cantidades farmacéuticamente eficaces con un portador farmacéuticamente aceptable adecuado en una dosificación terapéuticamente eficaz.

La cantidad eficaz precisa que se va a utilizar en los métodos descritos en la presente memoria para controlar una infección puede ser determinada sin experimentación indebida por parte de los expertos en la técnica que conocen la naturaleza de la actividad de los antibióticos y la naturaleza de un proceso infeccioso. La cantidad de un péptido antibiótico (tal como los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria) que se debe utilizar puede variar con la magnitud de la infección y el microorganismo que se vaya a tratar. La cantidad de un péptido antimicrobiano descrito en la presente memoria por unidad de volumen de medicamento combinado para la administración también puede ser determinada sin experimentación indebida por los expertos en la técnica. No obstante, se puede establecer generalmente que los péptidos deben estar presentes preferiblemente en una cantidad de al menos aproximadamente 1,0 nanogramos por mililitro de composición combinada, más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 1,0 miligramos por mililitro. Las dosificaciones sistémicas también dependen de la edad, el peso y las condiciones del paciente y de la ruta de administración. Por ejemplo, una dosificación adecuada para la administración a humanos adultos puede oscilar entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal. La dosificación preferida puede oscilar entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente

5,0 mg por kilogramo de peso corporal. Según se utiliza en la presente memoria, un portador fisiológicamente aceptable incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, y similares. El uso de tales medios y agentes es bien conocido en la técnica.

- Debido a que las composiciones de péptidos antimicrobianos descritas en la presente memoria se diseñan para eliminar un proceso infeccioso en marcha, pueden estar indicadas y ser preferidas una aplicación continua o una reaplicación periódica de las composiciones. A menos que se indique de otro modo, se pueden utilizar los mecanismos convencionales de química orgánica sintética, química de proteínas, biología molecular, microbiología, tecnología de ADN recombinante, y farmacología, que están dentro del conocimiento práctico de la técnica, para poner en práctica cualquier ejemplo de los métodos, composiciones y compuestos descritos en la presente memoria.
- Tales mecanismos se explican a fondo en la bibliografía (véase, p. ej., Scopes, R. K. *Protein Purification: Principles and Practices*, 2ª edición, Springer-Verlag, 1987; *Methods in Enzymology*, S. Colwick y N. Kaplan, editores, Academic Press; Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Nueva York, 1995; Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 17ª ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985).
- Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Diseño y síntesis de eLLPS.

Diseño de eLLPs. Utilizando los principios descritos más arriba, se diseñaron secuencias peptídicas para la síntesis basada en la alteración de los residuos de la secuencia de LLP1 parental para crear una cara hidrófila rica en Arg y una cara hidrófoba más idealizada de una estructura α -helicoidal anfipática pronosticada. En un caso, WLSA-5 (SEQ ID NO: 3), se incluyeron residuos de Trp para incrementar la potencia y el espectro de actividad (Figura 1). Para LBU-2 (SEQ ID NO: 5) y LBU-3 (SEQ ID NO: 6), se diseñaron una estructura α -helicoidal anfipática idealizada que consistía en residuos de Arg y residuos de Val en las caras hidrófila e hidrófoba, respectivamente, y se describen en la Figura 2.

Síntesis de péptido. Los péptidos se sintetizaron como se ha descrito previamente (véase Miller, Jaynes y Montelaro, *AIDS Research & Human Retroviruses* 7:511-519 y Fontenot et al., *Peptide Research* 4:19-25) utilizando un Advanced Chemtech modelo 200 (Advanced Chemtech, Louisville, Ky.) o un sintetizador de péptidos automatizado Millipore 9050+ (Millipore, Bedford, Mass.) con protocolos de síntesis Fmoc. Después de la escisión y la desprotección, los péptidos sintéticos fueron caracterizados y purificados por medio de HPLC de fase inversa sobre columnas Vydac C18 o C4 (The Separations Group, Hesperia, Calif.). La identidad de cada péptido se confirmó mediante espectrometría de masas (University of Pittsburgh Protein & Peptide Core Facility).

Cuantificación de péptido. Se determinaron las concentraciones de péptido mediante análisis cuantitativo con ninhidrina. Brevemente, a las muestras que contenían 5-60 nmoles de péptido, se les añadieron Reactivos de Ninhidrina A, B, y C preparados como describen Sarin et al., (*Analytical Biochemistry* 117:147-157). Paralelamente se preparó una solución patrón de leucina, calibrada mediante análisis de la composición de aminoácidos rutinario, que consistía en 0-60 nmoles de leucina para generar una curva patrón. Se cuantificó el color púrpura formado tras la incubación a 100°C durante 10 m mediante dilución en isopropanol/agua 1:1, se transfirió a pocillos por triplicado de una placa de 96 pocillos, y se midió la Abs₅₇₀ en un lector de placas con micropocillos (Dynatech, Chantilly, Va.). La concentración de un péptido se determinó mediante comparación con la curva patrón y se corrigió por el número de grupos amino libres que estaban asociados con cada péptido.

Ejemplo 2: Evaluación de péptidos utilizando análisis de lisis bacteriana *in vitro*

Muestras de ensayo. Los péptidos utilizados para este estudio se describen y se preparan como se ha indicado anteriormente. El panel de productos aislados bacterianos utilizados para estos experimentos incluía productos aislados clínicos tanto gram-positivos como gram-negativos. Un producto aislado bacteriano dado se preparó como se describe más abajo y se expuso a un péptido antimicrobiano dado como se describe más abajo.

Análisis de lisis bacteriana. Los análisis de lisis bacteriana se llevaron a cabo de una manera similar a la descrita previamente (Lehrer, R. I., M. E. Selsted, D. Szklarek, y F. J. 1983. *Infect. Immun.* 42: 10-4, 1983; Miller, M. A., R. F. Garry, J. M. Jaynes, y R. C. Montelaro, *AIDS Res Hum Retroviruses* 7:511-519, 1991). Las suspensiones bacterianas se cultivaron en Caldo Luria-Bertani hasta la fase de crecimiento semi-logarítmica y se lavaron mediante dos ciclos de centrifugación y suspensión en tampón fosfato 10 mM. La Abs₆₀₀ de la suspensión se ajustó con tampón fosfato 10 mM de manera que, tras la dilución, se tratarían 5-10x10⁵ ufc/mL en el análisis. Las bacterias se incubaron durante 1 h con diluciones a la mitad de los péptidos (100 μ M a 100 nM) en placas de 96 pocillos utilizando tampón fosfato 10 mM, pH 7,2, como diluyente. Las diluciones 1:10 de las bacterias se realizaron hasta 1: 1 000; se diseminó una alícuota de 100 μ l de cada condición sobre la superficie de placas de agar soja tratadas con tripsina (Difco, Detroit, Mich.) que se incubaron durante la noche. Se contaron las colonias de bacterias supervivientes (ufc, unidades formadoras de colonias) y se compararon con los controles no tratados para determinar la cantidad de destrucción inducida por los péptidos en cada condición. El log de la destrucción se define

como el log de la razón de ufc presentes antes y después del tratamiento con el péptido. La concentración bactericida mínima, MBC, es la concentración de péptido a la cual se logra 99,9% (tres unidades log) de la destrucción (Pearson et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 18: 699-708, 1980).

5 Resultados. Se utilizaron productos aislados clínicos gram positivos (*S. aureus*) y gram negativos (*P. aeruginosa*) representativos como bacteria índice para inspeccionar los péptidos descritos en la presente memoria. Las curvas de destrucción de LL37 y WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) para *S. aureus* y *P. aeruginosa* se muestran en las Figuras 3 y 4. Estos resultados fueron representativos de los otros péptidos descritos en la presente memoria. Este análisis demostró que los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria eran tan eficaces en la destrucción de la bacteria índice como el péptido antimicrobiano derivado del anfitrión, LL37.

10 Una limitación de muchos péptidos antimicrobianos derivados del anfitrión es su disminución de actividad a una concentración de NaCl fisiológica (150 mM). Véase Friedrich et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43:1542-1548. Los péptidos WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) y LL37 se sometieron a ensayo frente a dos cepas índice a NaCl fisiológico. Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 5 y 6. Los resultados de estos experimentos demostraron que WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) no estaban influenciados por el NaCl del mismo modo que LL37 cuando se utilizó *S. aureus* como bacteria de ensayo. La destrucción de *P. aeruginosa* no resultó afectada por la inclusión de NaCl para cualquier péptido. Estos análisis sugieren que los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria no son tan sensibles a la presencia de iones como los péptidos antimicrobianos derivados del anfitrión. La actividad de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria se comparó con una lista ampliada de productos aislados bacterianos clínicos. Estos se resumen en la Tabla 2 comparando sus MBC en tampón fosfato solo (baja concentración de sal) y tampón fosfato que contiene NaCl 150 mM (condiciones fisiológicas). La inspección de esta tabla conduciría a un experto en la técnica a concluir que la actividad de los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria se compara favorablemente con los péptidos antimicrobianos derivados del anfitrión ya que se refiere al espectro y la potencia de la actividad antimicrobiana.

Ejemplo 3: Modelo de toxicidad selectiva en cultivo celular de fibrosis quística

25 Preparación de células bacterianas. Se obtuvieron productos aislados de *Burkholderia cepacia* y *P. aeruginosa* de laboratorios de microbiología clínica y se analizaron utilizando el método de dilución del caldo descrito en el Ejemplo 2.

30 Preparación de células eucarióticas. Se prepararon cultivos de células primarias diferenciadas de células epiteliales bronquiales humanas (HBE) (CF y no CF) en una interfase aire-líquido en medios libres de antibiótico. Véase Zabner, J. et al., 1996, *J. Virol.* 70:6994-7003. Estos filtros se incubaron con *P. aeruginosa* seguido de lavado para eliminar las bacterias no adherentes. A continuación se expusieron filtros individuales al péptido a concentraciones crecientes. Con el fin de liberar bacterias viables, se añadió tripsina/EDTA y estas preparaciones se cultivaron en placa sobre medios bacteriológicos convencionales para cuantificar la supervivencia bacteriana. Se controlaron células preparadas de un modo similar para determinar la toxicidad del péptido midiendo la resistencia transepitelial. La ventaja de este modelo es que puede medir la toxicidad selectiva del péptido para la bacteria versus las células anfitrionas en condiciones idénticas.

35 Resultados. Se sometieron a ensayo LLP-1 y sus derivados, SA-5 (SEQ ID NO: 1), LSA-5 (SEQ ID NO: 2) y WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) para determinar su actividad bactericida contra patógenos típicamente asociados con enfermedades de las vías respiratorias CF, a saber, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, y *B. cepacia*. Se utilizaron concentraciones de sal bajas (tampón fosfato 10 mM (PB)) y fisiológicas (PB 10 mM que contenía NaCl 150 mM) como condiciones variables a las cuales se sometió a ensayo la actividad del péptido utilizando el análisis de dilución de caldo convencional descrito en el Ejemplo 2. Se generaron curvas de destrucción similares a las demostradas en las Figuras 3-6 y se determinaron los valores de MBC como se ha descrito anteriormente. Los valores de MBC para *S. aureus* y *P. aeruginosa* se resumen en la Tabla 2. De los péptidos sometidos a ensayo, WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) mantuvo su actividad en condiciones de baja salinidad y de salinidad fisiológica frente a estas dos cepas índice.

40 Se sometió a ensayo WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) y se comparó con LSA-5 (SEQ ID NO: 2) para determinar la actividad contra *B. cepacia*, un patógeno bacteriano importante asociado con enfermedades de las vías respiratorias CF. Como se muestra en la Figura 7, WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) fue significativamente más activo que LSA-5 (SEQ ID NO: 2) frente a *B. cepacia*. Generalmente se ha informado que este organismo es resistente a la actividad de la mayoría de los péptidos antimicrobianos de manera que el descubrimiento de WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) demostró una actividad *in vitro* significativa. Para someter a ensayo si esta actividad era específica para el producto aislado clínico de *B. cepacia* probado en la Figura 7 o aplicable generalmente a diversos productos aislados de *B. cepacia*, se diseñó un estudio de inspección. Para este estudio se obtuvo una colección de genovares de *B. cepacia* bien caracterizados y se sometió a ensayo para determinar la susceptibilidad a la destrucción por WLSA-5 25 µM (SEQ ID NO: 3). Esto se comparó con el péptido antimicrobiano del anfitrión, LL37, a una concentración idéntica. Los datos mostrados en la Figura 8, se representan como el número de microorganismos supervivientes después del tratamiento en estas condiciones. Los resultados demostraron que WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) era igual o mejor que LL-37 en la destrucción de todas las cepas bacterianas dentro de esta colección. Este descubrimiento sugiere que WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) puede ser eficaz cuando se administra en un entorno de CF en el que *B. cepacia* es el principal agente etiológico que precipita la enfermedad pulmonar en pacientes con CF.

Basándose en los descubrimientos *in vitro* anteriores, se sometió a ensayo WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) en un escenario que evaluaba más precisamente su toxicidad selectiva. Para este análisis, se estableció un modelo de cultivo celular de adherencia bacteriana que utilizaba diferentes células epiteliales primarias de las vías respiratorias humanas diferenciadas. Estas células se expusieron a un inóculo convencional de *P. aeruginosa* y las bacterias y las células epiteliales cultivadas simultáneamente se trataron con diferentes concentraciones de péptido de ensayo. La capacidad del péptido para destruir bacterias se controla como una función de bacterias viables asociada con las células epiteliales después de la exposición al péptido. Con el fin de evaluar la toxicidad de las células epiteliales, se llevaron a cabo mediciones de la resistencia transepitelial. Las células epiteliales de las vías respiratorias diferenciadas en cultivo forman uniones estrechas que son refractarias a la corriente eléctrica a menos que la monocapa esté comprometida por un evento tal como la lesión de la célula epitelial. De este modo, la medición de la resistencia transepitelial se puede utilizar como una medida sensible de la toxicidad de un péptido. La Figura 9 representa los resultados de un experimento en el que se añadieron concentraciones crecientes de WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) a *P. aeruginosa* y células epiteliales unidas en cultivo simultáneo. Se demostraron una disminución en la viabilidad bacteriana y un incremento en la resistencia transepitelial (Rte) como una función de la concentración de péptido. Una disminución en los recuentos bacterianos en dos órdenes de magnitud dio como resultado un cambio en la resistencia transepitelial de menos de 50%. Además, el efecto de WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) sobre la resistencia trans-epitelial fue transitorio y no significativamente diferente de LL-37. Estos datos sugieren que WLSA-5 (SEQ ID NO: 3) demuestra una toxicidad bacteriana selectiva en un entorno de CF.

Ejemplo 4: Modelo de artritis séptica en articulación de ratón

Los autores de la presente invención han demostrado que LSA-5 (SEQ ID NO: 2) es muy activo contra *S. aureus* (Tabla 2) y *S. epidermidis in vitro*, dos causas comunes de infecciones en las articulaciones, y puede funcionar en presencia de fluidos biológicos tales como los derivados de la sinovia de la articulación (Figura 10), aunque la presencia de fluido sinovial deteriora claramente la actividad de LSA-5 (SEQ ID NO: 2). Los autores de la presente invención han ampliado estos descubrimientos para un modelo animal de artritis séptica. En este estudio se indujo la sepsis de la articulación inoculando en la rodilla de un conejo blanco New Zealand de 2,5 Kg 1 x 10⁵ unidades formadoras de colonias de un producto aislado de *S. aureus* clínico, una cepa resistente a la penicilina pero sensible a la meticilina, cefalosporinas, y clindamicina. Utilizando este modelo, se controlaron los síntomas de la artritis séptica (*p. ej.*, degradación de la sinovia) y se puede utilizar la capacidad de los agentes antimicrobianos para limitar la degeneración de la post-infección en la articulación. En esta solicitud se deja que la infección bacteriana se establezca durante 1h. En este punto, se accedió a la articulación y se administraron intraarticularmente concentraciones crecientes de LSA-5 (SEQ ID NO: 2) (0, 50, 100, y 200 µM) en tampón fosfato (PB). La concentración de bacteria asociada con el fluido articular se estableció a tiempo 0 y 1 h después de la instilación de LSA-5 (SEQ ID NO: 2) cultivando en placa diluciones de fluido sinovial sobre agar LB. Los resultados de este experimento demostraron una disminución dependiente de la dosis en las unidades formadoras de colonias en comparación con la articulación no tratada con péptido cuando se examinó después de 1 h (Figura 11).

Con el fin de demostrar que dosis sucesivas de LSA-5 (SEQ ID NO: 2) pueden ser eficaces para limitar la carga bacteriana en este modelo de conejo, se evaluó la administración de dos tratamientos con péptidos de LSA-5 150 µM (SEQ ID NO: 2) a tiempo 0 y 1 h. La medición de la carga bacteriana 1 h después del tratamiento demostró un descenso significativo en las articulaciones tratadas con péptido cuando se comparó con la de articulaciones tratadas con tampón fosfato en ausencia de péptido. Esto se comparó con múltiples infecciones de una neomicina al 0,35% convencional o una combinación de neomicina y LSA-5 (SEQ ID NO: 2). La administración de cada una de estas formulaciones se realizó intraarticularmente a tiempo 0,1, y 2 h. Los resultados de este experimento demostraron que cuando se comparan con grupos tratados con LSA-5 (SEQ ID NO: 2) o neomicina sola, se recuperaron sustancialmente menos bacterias de la articulación tratada con la combinación de LSA-5/neomicina (Figura 12). Además, en todos estos experimentos con animales no se observó toxicidad adversa cuando el péptido se administró solo. Estos datos imitan la infección crónica asociada con artritis séptica y sugieren que el tratamiento tóxico puede ser inicialmente eficaz.

Una aplicación potencialmente importante para los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria es en lo que se refiere a la artritis séptica es su actividad cuando se unen a un sustrato en fase sólida tal como una articulación protésica. Para abordar esto, se ancló covalentemente el grupo amino terminal de LSA-5 (SEQ ID NO: 2) a una resina Affigel™ 15 (BioRad, Hercules, CA). Este soporte sólido permeable se colocó en una pequeña columna y se expuso a 1 mL de suspensión de x 10⁶ bacteria/mL. Se dejó que la solución pasara por gravedad a través de la columna y el eluyente se recogió y se cuantificó para determinar el número de bacterias viables. Como control negativo, se preparó una columna idéntica excepto que no se ancló ningún péptido antimicrobiano en lugar de LSA-5 (SEQ ID NO: 2). Los resultados se resumen en la Tabla 3 a continuación y demuestran que las suspensiones de *P. aeruginosa* o *S. aureus* se habían esterilizado completamente mediante la exposición a la columna. Por el contrario, no se observó una reducción de las bacterias viables después de la exposición a la columna de control sin péptido antimicrobiano. Además, la misma columna de LSA-5 (SEQ ID NO: 2) se pudo exponer repetidamente a suspensiones bacterianas y mantuvo la actividad hasta durante 6 pases. Estos datos sugieren la posibilidad de que las articulaciones protésicas puedan ser recubiertas con los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria para inhibir la nucleación de la formación de biopelícula observada en la cirugía de remplazo de articulaciones que conduce a la artritis séptica.

Tabla 3

	Entrada de bacterias			
	<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
Péptido	LSA-5	Control	LSA-5	Control
Recuento bacteriano antes de la exposición de la columna	1x10 ⁶	1x10 ⁶	1x10 ⁶	1x10 ⁶
Recuento bacteriano del eluyente	0	1x10 ⁶	0	1x10 ⁶

Ejemplo 5: Supresión de la infectividad por VIH-1

5 Basándose en la observación de que los péptidos descritos en la presente memoria eran activos contra ciertas membranas de las células eucarióticas (p. ej., demostración de la lisis de eritrocitos) se creía que ciertos péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria podían ser activos en la supresión de la infectividad por VIH-1. La prueba de este concepto se obtuvo estudiando la capacidad de un péptido LLP1, LSA-5 (SEQ ID NO: 2) para inhibir la infectividad de VIH-1 similar a la mostrada previamente para péptidos antimicrobianos catiónicos derivados del anfitrión (Wachinger, M., et al. (1998) *Journal of General Virology* 79: 731-40; Wachinger, M., T. Saermark y V. Erfle (1992) *FEBS Letters* 309:235-41; Robinson, W.E., Jr., B. McDougall, D. Tran y M.E. Selsted (1998) *Journal of Leukocyte Biology* 63:94-100; Yasin, B. et al. (2000) *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 19:187-94).

15 En este Ejemplo se obtuvieron monocitos de sangre periférica humana (PBMC) a partir de voluntarios sanos y se mantuvieron en cultivo a una concentración de 1×10^5 células viables por mL de medio. Estas células se estimularon mediante la adición de fitohemaglutinina (PHA). Para esto se añadió un título normalizado de viriones de VIH-1 purificado (cepa IIIB) a PBMC para generar una señal de antígeno p24 de 14.000 pg/mL cinco días después de la exposición al virus.

20 Con el fin de someter a ensayo si el péptido LLP, LSA-5 (SEQ ID NO: 2) era capaz de suprimir la actividad del VIH-1, se incubó LSA-5 a concentraciones que oscilaban entre 0,1 y 100 μ M con el título de virus convencional determinado como más arriba durante 30 min. Los viriones que sobrevivieron a la exposición al péptido se aislaron mediante ultracentrifugación a 100.000 x g durante 60 min. Se utilizaron péptidos virales para infectar PBMC estimuladas con PHA preparadas como se ha descrito anteriormente. Cinco días después de la infección se determinó el nivel de antígeno p24 y se comparó con un control no tratado con péptido. Los datos se expresaron como la razón de antígeno p24 asociado con células infectadas por VIH-1 tratadas con péptido vs. no tratadas con péptido para obtener un valor referido como porcentaje de supresión.

30 Como se muestra en la Figura 13, los viriones tratados con LSA-5 solo a 100 μ M redujeron la infectividad de VIH-1 casi en 100%. A 10 μ M, la infectividad de VIH-1 se redujo en 75%. A 1 y 0,1 μ M hay una caída de esta actividad inhibitoria de LSA-5. Los experimentos no descritos en la presente memoria empleando otros péptidos descritos por esta invención demuestran que aquellos péptidos que se observaba que tenían una elevada actividad hemolítica para los glóbulos rojos eran más activos sobre una base molar contra los viriones de VIH-1 que aquellos con una baja actividad hemolítica. Estos datos demuestran que los péptidos LLP de la presente invención son activos contra virus con envoltura, y particularmente contra el VIH-1, y pueden ser modificados para aumentar su potencia en este entorno.

Ejemplo 6: Actividad antiviral de eCAPS:

35 La actividad antibacteriana de LLP se puede modular por medio de la longitud de los péptidos, así como por su contenido en Arg y Trp. El presente Ejemplo evalúa la actividad anti-VIH de los péptidos LBU, WLBU y WR (eCAP).

40 Los análisis se llevaron a cabo para medir la infección por VIH de células indicadoras HeLa en presencia de concentraciones crecientes de péptidos. La Figura 14 proporciona un esquema general del análisis. Los péptidos se prepararon en medios a concentraciones que oscilaban entre 0 y 50 μ M. Las células HeLa se inocularon con VIH-1. Después de 2 días, las células se lisaron y se midió la actividad β -galactosidasa como una función de la infectividad de VIH-1. Las mediciones se compararon con un control positivo para determinar CI_{50} (la concentración inhibitoria de péptido requerido para reducir la infectividad viral de 50%).

Materiales y Métodos

Las células indicadoras HeLa se colocaron sobre una placa de 96 pocillos y se permitió que se adhirieran durante 24 horas. Los péptidos se prepararon en medios a concentraciones que oscilaban entre 0 y 50 μM . Los medios para cada pocillo se remplazaron por péptido de continuación de medios. Se inoculó la cepa NL4.3 de VIH-1 en cada pocillo y se permitió que las placas se incubaran durante 48 horas a 37°C. Las células se lisaron y se añadió 4-metilumbeliferil-beta-D-glucuronido (MUG) como sustrato para la β -galactosidasa. La fluorescencia generada se leyó en un fluorómetro.

Resultados

La Figura 15 muestra gráficamente los resultados de la inhibición de la infectividad viral por la serie de péptidos LBU (LBU1, LBU2, LBU3 y LBU4 (SEQ ID NO: 4, 5, 6 y 8, respectivamente)). La Figura 16 presenta una comparación de la CI_{50} de cada péptido con la concentración cuando se observa toxicidad visual.

Las Figuras 17 y 18 muestran la CI_{50} y los niveles de toxicidad para los péptidos WLBU (WLBU 1, WLBU-2, WLBU3 y WLBU4 (SEQ ID NO: 4, 5, 6 y 8, respectivamente)).

Las Figuras 19 y 20 muestran la CI_{50} y los niveles de toxicidad de los péptidos WR (WR6, WR18 y WR24 (SEQ ID NO: 13, 15 y 16, respectivamente)). Los péptidos WR, que tenían residuos de triptófano adicionales, mostraron una mayor actividad antiviral con una longitud creciente.

Ejemplo 7 - Péptidos como antimicrobianos potentes trabados a una superficie sólida: Implicaciones para dispositivos médicos

Los dispositivos médicos son una parte integrante del manejo terapéutico; ya que la importancia de estas herramientas es que portan consigo un riesgo significativo de infección microbiana. El anclaje bacteriano a un dispositivo médico invasivo típicamente es establecido por medio de un único microorganismo en multiplicación, que conduce a la posterior formación de biopelícula. Hasta la fecha las medidas preventivas no han tenido un impacto significativo sobre la reducción de las infecciones. En este Ejemplo, se logra el acoplamiento covalente bidireccional de un péptido antimicrobiano catiónico modificado, WLBU-2 (SEQ ID NO: 10), a diversas superficies biológicas (véase, la Figura 21 para una ilustración esquemática de este procedimiento). Estas superficies incluyen (i) una matriz de gel basada en carbohidratos, (ii) una esfera compleja de plástico polimérico, y (iii) un nanocompuesto de sílice-fosfato de calcio asociado con la reconstrucción ósea. Se ha demostrado que las superficies conjugadas con WLBU-2 conservan una actividad antimicrobiana potente relacionada con la adherencia superficial bacteriana. Este Ejemplo proporciona una prueba de principio de que los materiales de laboratorio de recubrimiento covalente y de regeneración de hueso, así como las superficies de cualquier dispositivo que se puede insertar, implantar, etc. en o sobre un sujeto (p. ej., un paciente), con los péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria tienen un potencial para disminuir las consecuencias infecciosas. Estos descubrimientos tienen importantes consecuencias para el dispositivo médico y el componente de manejo del paciente de la tecnología para el cuidado de la salud de los autores de la presente invención.

Las propiedades activas sobre la membrana de los péptidos antimicrobianos podrían conducir a una disminución de la adherencia y al subsiguiente desarrollo de la formación de la biopelícula bacteriana sobre los dispositivos médicos. Las implicaciones de semejante actividad antimicrobiana activa en la superficie tendrían un impacto significativo sobre la industria de los dispositivos médicos. Por ejemplo, cualquier dispositivo médico que se introduzca en un sujeto se puede beneficiar de esta actividad, incluyendo, sin limitación: catéteres intravenosos, cánulas, puertos de diálisis, grapas, suturas, implantes de hueso artificial o dentales, articulaciones protésicas, válvulas cardíacas, estents, marcapasos cardíacos y derivaciones de líquido cefalorraquídeo, que se han vuelto esenciales en el campo de la medicina y en cada caso presentan riesgo de infecciones. En cada uno de estos, la nucleación con progresión a formación de biopelícula sobre el dispositivo médico se considera la base para la infección sistémica (von Eiff, C., Jansen, B., Kohnen, W. & Becker, K. Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs* 65, 179-214 (2005) y Falagas, M.E., Fragoulis, K., Bliziotis, I.A. & Chatzinikolaou, I. Rifampicin-impregnated central venous catheters: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Antimicrob Chemother* 59, 359-369 (2007)). Como resultado, la interrupción de la nucleación potencial sobre un dispositivo interrumpirá la progresión natural a una enfermedad.

Materiales y métodos:

Preparación de bacterias. Se inoculó caldo Luria (LB) con una colonia de *P. aeruginosa* (cepa PA01) y se incubó durante la noche a 37°C con movimiento oscilante. A la mañana siguiente, se transfirieron 5 mL del cultivo durante la noche a 20 mL de caldo LB y se incubaron durante otras 2 horas a 37°C con movimiento oscilante. Se sedimentaron 10 mL del segundo cultivo de incubación y se suspendieron en 10 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a un pH de 7,8. Se leyó la A_{600} de la solución bacteriana suspendida, y se diluyó adicionalmente a una concentración con una $A_{600}=0,001$ en PBS. La cepa de *S. aureus* utilizada en este estudio ha sido descrita en publicaciones previamente (Deslouches, B. et al. De novo generation of cationic antimicrobial peptides: influence of length and tryptophan substitution on antimicrobial activity. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 316-322 (2005)) y se preparó de una manera idéntica a la descrita para la cepa de *P. aeruginosa* anterior.

5 WLBU-2 N terminal acoplado a esferas de Affigel. Se añadió una cantidad calculada de solución de partida de WLBU-2 a 10mL de resina de Affigel (Affigel 10 - NHS Chemistry, 10 representa un "conector de 10 carbonos" que se ancla al grupo amino libre de WLBU2 (SEQ ID NO: 10), Bio-Rad Laboratories) extraída de la suspensión para obtener una concentración total 10 μ M en la suspensión. Se separó una muestra de la solución de partida de WLBU-2 (SEQ ID NO: 10) para la posterior comparación. Se siguió el protocolo de fabricación en condiciones acuosas a la temperatura ambiente durante 2 h. Se separó una muestra del sobrenadante y se utilizó para el análisis de acoplamiento con WLBU-2 (SEQ ID NO: 10). Después del anclaje satisfactorio de WLBU-2 (SEQ ID NO: 10) a esferas de Affigel (cuentas de Affigel-WLBU-2), se generó una columna de 3 cm. La columna se lavó con PBS antes de hacer circular una suspensión bacteriana de PA01 preparada como se ha descrito previamente. La suspensión resultante se cultivó en placa, se incubó durante la noche a 37°C y se determinaron las ufc.

10 Análisis de WLBU-2 (SEQ ID NO: 10) acoplado a esferas de Affigel. Se controló el grado de acoplamiento de WLBU-2 a las esferas de Affigel por medio de análisis HPLC de fase inversa de los medios de reacción antes y después de la conjugación. El análisis se llevó a cabo utilizando un sistema de cromatografía Waters Alliance 2695 y un Detector de Absorbancia Dual Waters 2487. Las muestras se inyectaron sobre una columna Phenomenex Gemini 5 μ C-18 (250 x 4,6 mm) y se hicieron eluir con disolvente A (TFA al 0,1% en H₂O) y disolvente B (TFA al 0,08% en acetonitrilo) a una velocidad de flujo de 1 mL/min. La detección de picos a 220 nm estuvo seguida de la adquisición de datos y la integración utilizando un paquete de programas Waters Empower. La composición de aminoácidos de las esferas de agarosa generó un alto grado de ruido de fondo como describen Palace *et al.* (Palace, G.P., Fitzpatrick, R., Tran, K.V., Phoebe, C.H., Jr. & Norton, K. Determination of amino acids in diverse polymeric matrices using HPLC, with emphasis on agars and agaroses. *Biochim Biophys Acta* 1472, 509-518 (1999)). Para estimar la tasa de sustitución, se compararon los picos de la HPLC de las muestras obtenidas antes y después del acoplamiento.

15 WLBU-2 (SEQ ID NO: 10) C terminal acoplado a esferas Tentagel. Se sintetizaron esferas Tentagel con WLBU-2 en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 433A utilizando la química de Fmoc convencional y ciclos de FastMoc 0,25 mM. La elongación de la cadena se realizó por etapas sobre resina TentaGel S NH₂ (Peptides International) utilizando derivados de aminoácidos protegidos con Fmoc (Peptides International) que contenían grupos protectores de la cadena lateral. La eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales se completó utilizando condiciones de escisión de TFA (TFA:Triisopropilsilano:H₂O) convencionales. Esto implicó el tratamiento de las resinas peptídicas con la totalidad de las cadenas laterales protegidas con reactivos de escisión a una concentración de 20 ml/gm durante 4 h a la temperatura ambiente. Las esferas WLBU-2 TentaGel se filtraron a continuación a través de un embudo Buchner, se lavaron con TFA puro y se secaron a vacío. Las esferas secas se suspendieron en N,N-dimetilformamida (DMF), se lavaron inicialmente con DMF seguido de diclorometano y se dejaron secar al aire.

20 Análisis de WLBU-2 carboxi terminal (SEQ ID NO: 10) acoplado a esferas Tentagel. Una vez completada la hidrólisis de las esferas Tentagel con WLBU-2, las muestras se secaron completamente a vacío. Las muestras se suspendieron en acetonitrilo al 60%/TFA al 0,1% en H₂O y se sometieron a sonicación durante 20 minutos. El sobrenadante se secó a vacío y se suspendió en HCl 20 mM, seguido de derivatización con carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo) utilizando el kit de análisis Waters AccQ-Tag. Las muestras se analizaron mediante cromatografía utilizando condiciones de gradiente convencionales. La detección de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 250 nm se utilizó para obtener los picos de integración.

25 Unión de WLBU-2 (SEQ ID NO: 10) a nanocompuesto de sílice-fosfato de calcio. Se preparó SCPC bioactivo poroso reabsorbible con la composición química calentando a 850°C (este procedimiento es esencialmente como se describe en El-Ghannam, A, K Ahmed, y M Omran, Nanoporous Delivery System to Treat Osteomyelitis and Regenerate Bone: Gentamicin Release Kinetics and Bactericidal Effect, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* Mayo 2005;73(2):277-84). Se colocaron razones apropiadas de componentes de fosfato dicálcico y silicio en botellas de polietileno y se mezclaron en un mezclador giratorio durante 24 h. El lote se humedeció con NaOH 0,1 y se colocó en un molde Teflon. Las muestras se dejaron secar a temperaturas ambiente y a continuación se trataron térmicamente (Thermolyne 30400, Barnstead International, Dubuque, IA) a 850°C durante 1 h. La temperatura de calentamiento se seleccionó basándose en los resultados de los análisis térmicos diferenciales referidos previamente (El-Ghannam, A. & Omran, M. Nanoporous Delivery System to Treat Osteomyelitis and Regenerate Bone: Gentamicin Release Kinetics and Bactericidal Effect. *Journal of Biomedical Materials Research. Parte B, Applied Biomaterials* 73, 277-284 (2005)). Se trituró cerámica SCPC, se tamizó y se sumergió en un fluido corporal simulado (suero bovino) a 37°C durante 16 h. Después de la inmersión las muestras se secaron y se analizaron la química y la morfología de la superficie por medio de análisis espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) y microscopía electrónica de barrido-rayos X de dispersión de energía (SEM-EDX), respectivamente. Las partículas de SCPC se cargaron con WLBU-2 utilizando el método de inmersión (p. ej., como se describe en El-Ghannam, et al. *Journal of Biomedical Materials Research. Parte B, Applied Biomaterials* 73, 277-284 (2005)) y se secaron.

30 Lixiviación de péptido. Para evaluar la posible lixiviación del péptido que es responsable de la actividad antimicrobiana de CAP unido, se utilizó un sistema de migración de proteína Transwell. Se preparó la bacteria como antes para lograr una A₆₀₀=0,001 en PBS. Se pesaron individualmente 10 miligramos de esferas Tentagel así como

esferas Tentagel-WLBU-2. Se establecieron pocillos por triplicado en una placa de 96 pocillos añadiendo 600 μ L de la solución bacteriana para todos los siguientes grupos. El primer grupo tenía una suspensión bacteriana añadida al compartimento inferior y esferas recubiertas Tentagel-WLBU-2 añadidas al compartimento superior del inserto. El segundo grupo tenía suspensión bacteriana añadida al compartimento inferior y esferas Tentagel colocadas en el compartimento superior del inserto. El tercer grupo tenía esferas Tentagel a las que se le había añadido suspensión bacteriana. El cuarto grupo tenía esferas recubiertas Tentagel-WLBU-2 a las que se le había añadido suspensión bacteriana. Inicialmente, la placa se dejó reposar en una cámara a 37°C, pero fue ahí donde no hubo diferencia entre los cuatro grupos. Se incorporó una simple agitación al protocolo y se obtuvieron los resultados descritos. La placa se agitó en una cámara a 37°C y con posterioridad cada grupo se cultivó en placa para someter a recuento las ufc después de incubar durante la noche en una cámara a 37°C. Para evaluar el efecto de la agitación, se utilizó un grupo de control que consistía en suspensión PA01 sola como momento inicial para el crecimiento bacteriano.

Resultados y discusión

Actividad de WLBU-2 (SEQ ID NO: 10) unido a una matriz de gel basada en carbohidrato por medio del grupo amino libre: Se utilizó Affigel, una matriz de gel basada en carbohidrato, para acoplar WLBU-2 por medio del grupo amino primario sobre el extremo N. Se determinó que la tasa de conjugación a la resina Affigel en suspensión era de 98,9% del WLBU-2 disponible mediante HPLC y se estimó que la concentración calculada de péptido unido era de 20 μ g/mL de resina. Con el fin de someter a ensayo las propiedades antimicrobianas conservadas por WLBU-2 anclado a las superficies, se filtró la cepa PA01 de *Pseudomonas aeruginosa* a través de una columna de Affigel sin ningún efecto significativo sobre el posterior crecimiento de PA01. Un inóculo idéntico se filtró a través de una columna de Affigel-WLBU-2 y muy pocas colonias sobrevivieron después de una incubación durante la noche (Figura 22). La columna de Affigel-WLBU-2 siguió siendo eficaz en dos ensayos adicionales con idénticos resultados. No obstante, con un ensayo adicional se observó una supervivencia bacteriana diez veces mayor, indicando que la unión en la columna Affigel-WLBU-2 se había saturado. La actividad de la columna Affigel-WLBU-2 se restableció con un simple lavado con metanol (datos no mostrados).

Actividad de WLBU-2 (SEQ ID NO: 10) unido a una esfera de plástico polimérico complejo por medio del extremo carboxilo. Intentando demostrar la fijación de un péptido por cualquier extremo, se construyó sintéticamente WLBU-2 sobre una esfera de plástico polimérico por medio del grupo carboxilo libre. El análisis de las esferas Tentagel indicó que la tasa de sustitución era de 390 mg/g resina. Como se representa en la Figura 22, las esferas recubiertas con WLBU-2 fueron capaces de destruir la cepa PA01. El grupo de comparación con esferas Tentagel solas no reveló ninguna diferencia en la supervivencia de *P. aeruginosa* cuando se comparó con un grupo de control.

Para determinar que la destrucción bacteriana no era simplemente el resultado de la lixiviación de WLBU-2 se utilizó un sistema de soporte permeable Transwell. Las esferas de Tentagel-WLBU-2 colocadas en el compartimento superior no afectaron al crecimiento de PA01 en el compartimento inferior cuando se compararon con un grupo de control (Figura 22). Las esferas Tentagel en suspensión con PA01 no tuvieron efecto sobre el crecimiento de PA01, mientras las esferas de Tentagel-WLBU-2 fueron capaces de esterilizar la suspensión de PA01. Estos datos demuestran que es la interacción física entre el WLBU-2 acoplado y PA01 la que es necesaria para la propiedad antimicrobiana. También demuestra que las propiedades antimicrobianas no son atribuibles a WLBU-2 no acoplado.

Actividad de WLBU-2 (SEQ ID NO: 10) unido a un complejo de nanocompuesto de sílice-fosfato de calcio asociado con una reconstrucción ósea. Se ha propuesto un nuevo nanocompuesto de sílice-fosfato de calcio poroso bioactivo reabsorbible (SCPC) que tiene la capacidad de estimular la regeneración ósea y la resorción de material de injerto *in vivo* (El-Ghannam, A. et al., *Journal of Biomedical Materials Research. Parte B, Applied Biomaterials* 73, 277-284 (2005)). Se evaluó la actividad antimicrobiana de WLBU-2 incorporado covalentemente a SCPC. Se llevó a cabo la comparación de SCPC frente a material compuesto de SCPC-WLBU-2 añadiendo 1 mg de cualquiera de estas preparaciones a un tubo Eppendorf de 1,5 mL que contenía 1×10^6 de la cepa PA01 de *P. aeruginosa* en 1 mL de PBS. Cuando se aplicó la incubación estática (es decir sin agitación) a SCPC-WLBU-2 se logró una destrucción mínima después de 1 h (no mostrado). No obstante, cuando se incluía agitación en el protocolo, la suspensión bacteriana se esterilizó por completo (Figura 23). Esto refuerza que el contacto entre el WLBU-2 acoplado y la bacteria es necesario para una destrucción eficaz. Se utilizó la microscopía electrónica de barrido (SEM) para evaluar visualmente estas esferas. Utilizando las suspensiones bacterianas idénticas, resultó sorprendente observar que ninguna bacteria se había anclado a la superficie de SCPC (Figura 22A). No obstante, el material SCPC-WLBU-2 tenía bacterias asociadas a la superficie incluso aunque el crecimiento bacteriano fuera negativo (Figura 23). En los datos no mostrados, los autores de la presente invención determinaron que estas bacterias estaban siendo lisadas debido a que se estaba liberando β -galactosidasa (una enzima bacteriana intracelular) al tampón (véase, Phadke, S.M. et al. Selective toxicity of engineered lentivirus lytic peptides in a CF airway cell model. *Peptides* 24, 1099-1107 (2003)). Estos datos apoyan la afirmación de los autores de la presente invención de que el péptido cargado positivamente recluta las bacterias en la superficie de la esfera, dando como resultado la lisis de las bacterias.

Los dispositivos tales como articulaciones protésicas, válvulas cardíacas protésicas, estents, marcapasos cardíacos, catéteres intravenosos (IVC) y derivaciones de fluido cefalorraquídeo se han vuelto esenciales en el campo médico.

No obstante, estos dispositivos médicos son un riesgo de infección y tienen impacto sobre la tasa de infecciones nosocomiales. A diferencia de las infecciones de los IVC, la mayoría de las infecciones relacionadas con cuerpos extraños requieren una eliminación quirúrgica. Se estima que los Estados Unidos promedian entre 200.000 y 400.000 infecciones relacionadas con catéteres (CRI) por año. En pacientes con una necesidad a largo plazo de acceso intravenoso, se puede implementar la terapia sistémica así como la de bloqueo con antibiótico para salvar un catéter (von Eiff, C., Jansen, B., Kohlen, W. & Becker, K. Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs* 65, 179-214 (2005)). La formación de biopelícula sobre superficies biomédicas se considera la base de la infección (von Eiff, C., et al., *Drugs* 65, 179-214 (2005) y Falagas, M.E., Fragoulis, K., Bliziotis, I.A. & Chatzinikolaou, I. Rifampicin-impregnated central venous catheters: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Antimicrob Chemother* 59, 359-369 (2007)). La adherencia bacteriana inicial se considera esencial para la formación de biopelícula sobre las superficies del catéter (von Eiff, C., et al., *Drugs* 65, 179-214 (2005) y Falagas, M.E., et al., *J Antimicrob Chemother* 59, 359-369 (2007)). Las CRI pueden ser difíciles de tratar en parte debido a la mayor concentración inhibitoria mínima mostrada por los patógenos en la biopelícula (Cirioni, O. et al. Pretreatment of central venous catheters with the cathelicidin BMAP-28 enhances the efficacy of antistaphylococcal agents in the treatment of experimental catheter-related infection. *Peptides* 27, 2104-2110 (2006) y Burton, E. et al. Antibiofilm activity of GImU enzyme inhibitors against catheter-associated uropathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1835-1840 (2006)).

La reducción de la formación de biopelícula puede tener un gran impacto en las tasas de infección que derivan de las prótesis y de CRI. En el pasado, las estrategias para reducir la formación de biopelícula incluían catéteres impregnados con plata, no obstante, la lixiviación dejaba estos materiales vulnerables a la adherencia bacteriana. El concepto de un péptido antimicrobiano como medio para reducir o prevenir la formación de biopelícula es factible. Aquí, se demuestra que WLBU-2 puede ser anclado covalentemente de forma permanente a diversas superficies a la vez que conserva sus propiedades antimicrobianas demostradas previamente *in vivo* e *in vitro* contra *P. aeruginosa*. Los péptidos fijados necesitan el contacto directo con las bacterias con el fin de lograr una destrucción eficaz. Como se puede observar en las imágenes SEM (Figura 23), las bacterias son atraídas hacia el WLBU-2 unido al nanocompuesto. La carencia de crecimiento de las muestras obtenidas proporciona una evidencia de lisis bacteriana. Se espera que las implicaciones de estos experimentos sugieran que el WLBU-2 unido, así como otros péptidos antimicrobianos descritos en la presente memoria, sean eficaces en la prevención de la formación de biopelícula bacteriana por reducción de la supervivencia bacteriana después del contacto con material acoplado a WLBU-2. Estos descubrimientos tienen implicaciones para la comprensión del mecanismo activo en superficie de la acción de WLBU-2 y tienen aplicaciones que se pueden trasladar a la salud para el recubrimiento antimicrobiano de dispositivos médicos.

Ejemplo 8 - Virus de la influenza estacional

Los autores de la presente invención han informado previamente de que estos péptidos son activos contra herpesvirus con envoltura tales como los Virus Herpes Simplex (HSV) (Isaacs, C.E. et al. Inactivation of herpes simplex virus clinical isolates by using a combination microbicide. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1063-1066 (2006)). Lo siguiente representa datos con respecto a un ortomixovirus - Virus de la influenza estacional.

Virus de la influenza estacional: Se sometieron a ensayo once diluciones seriadas a la mitad de WLBU-2 (SEQ ID NO: 10) (50 μ M) para la actividad de inhibición de la hemaglutinación (HAI). Los virus utilizados para estos estudios fueron el producto aislado estacional identificado como Indonesia H5N1. Como control positivo, se utilizaron sueros de ratón previamente sometidos a ensayo para HAI (HAI 1:1280) y como control negativo, solución salina tamponada con fosfato. El virus (25 μ L HA =1:8) se incubó durante 20 min con células anfitrionas en todas las condiciones. Los resultados demuestran un descenso dependiente de la dosis en la formación de placa de virus infeccioso (Figura 24).

De un modo similar, los autores de la presente invención han evaluado la actividad del virus de la influenza estacional para causar una enfermedad en ratones después de la exposición al péptido prototipo WLBU-2 de los autores de la presente invención. Para estos experimentos se añadió WLBU-2 a Indonesia H5N1 inmediatamente antes de administrar una dosis intranasal de virus (Figura 25). Estos datos demuestran la capacidad del péptido para inactivar la infectividad del virus.

Ejemplo 9 - *Bacillus anthracis*

Utilizando la cepa de vacuna de *B. anthracis*, los autores de la presente invención han investigado la actividad de WLBU-2 (SEQ ID NO: 10) para determinar su capacidad para inhibir la forma vegetativa de este organismo (Figura 26). Estos estudios se llevaron a cabo de una manera análoga a los estudios con *P. aeruginosa* y *S. aureus* descritos anteriormente - haciendo crecer bacterias hasta una densidad celular específica y añadiendo a continuación péptido para buscar una disminución de los recuentos de viables. Si bien la forma en esporulación de *B. anthracis* es la forma claramente susceptible de *B. anthracis* y es claramente la diana, el hecho de que los autores de la presente invención hayan sido capaces de demostrar que WLBU-2 es sistemáticamente activo en un modelo murino contra *P. aeruginosa* (Deslouches et al., Activity of the de novo engineered péptido antimicrobiano WLBU-2 against *P. aeruginosa* in human serum and whole blood: implications for systemic applications, *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Aug;49(8):3208-16 y Deslouches, B. et al. De novo-derived cationic péptido antimicrobiano activity

in a murine model of *P. aeruginosa* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* 60, 669-672 (2007), y Ejemplo 4) sugiere que el *B. anthracis* circulante sistémicamente debe ser susceptible a la actividad de WLBU-2. Estos resultados ilustran que los péptidos descritos en la presente memoria se podrían utilizar como agente profiláctico sistémico o terapéutico para mitigar frente a un agente de una guerra biológica.

5 Ejemplo 10 - Actividad antifúngica

Las especies de *Candida* son la principal causa de sepsis. El objetivo era investigar la actividad antifúngica de WLBU-2 (SEQ ID NO: 10) frente a diversas especies de *Candida*: 11 *C. albicans* (susceptibles a 4 flucoanzol (S), 2 susceptible dependientes de la dosis (S-DD), 4 resistentes (R)), 4 *C. krusei* (todas R), 4 *C. parapsilosis* (3 S, 1 R), 3 *C. tropicalis* (2S, 1S), 2 *C. galbrata* (1S, 1S-DD, 1R), y 2 *C. lusitaniae* (S). Las actividades antifúngicas y fungicidas se evaluaron *in vitro* mediante determinaciones CIM y análisis de cinética de destrucción. Durante los análisis de destrucción *in vitro* en RPMI 1640 a 37°C, WLBU-2 (6 µM) fue totalmente fungicida en 5 minutos contra la cepa de referencia de *C. albicans* SC5314, así como todas las *C. albicans* y *C. lusitaniae* clínicas y productos aislados. Tanto para *C. krusei* como para *C. tropicalis*, 75% de los productos aislados fueron completamente destruidos por 3 µM de WUBL2. Los productos aislados restantes fueron completamente destruidos por 25 µM, pero las concentraciones fungicidas mínimas (CFM, definida como destrucción ≥ 99,9%) se lograron a concentraciones ≤ 6 µM. Los autores de la presente invención ampliaron sus estudios para someter a ensayo 3 productos aislados de *Cryptococcus neoformans* (2S, 1R) y 2 *Aspergillus fumigatus*. Los productos aislados de *C. neoformans* fueron totalmente destruidos por 3 µM, mientras que los de *A. fumigatus* fueron resistentes a 100 µM. El WLBU-2 es muy activo contra diversas especies de *Candida* y *C. neoformans in vitro*. Tomados junto con los datos anteriores contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*, los descubrimientos de los autores de la presente invención indican que WLBU-2 así como, por deducción, los otros eCAP descritos en la presente memoria, tienen una potente actividad contra numerosas causas comunes de sepsis. Como tales, los eCAP descritos en la presente memoria son potencialmente útiles en el tratamiento de la sepsis o como terapia empírica de pacientes que podrían presentar sepsis. Una vez más, debido a que se ha demostrado que los eCAP son activos *in vivo* contra bacterias gram positivas y gram negativas (Deslouches et al., Activity of the de novo engineered péptido antimicrobiano WLBU-2 against *Pseudomonas aeruginosa* in human serum and whole blood: implications for systemic applications, *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Aug;49(8):3208-16 y Deslouches, B. et al. De novo-derived cationic péptido antimicrobiano activity in a murine model of *P. aeruginosa* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* 60, 669-672 (2007) y en el Ejemplo 4, anterior), se pronostica que las dosis no tóxicas de los péptidos serán eficaces en la prevención y el tratamiento de infecciones por especies de *Candida*. (Candidiasis) y *Cryptococcus in vivo*.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> University Of Pittsburgh-Of The Commonwealth System Of Higher Education
 Mietzner, Timothy A
 5 Montelaro, Ronald C

<120> PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS DERIVADOS DE VIRUS

<130> 0002.0144PCT
 10

<150> 60/959.453
 <151> 13-07-2007

<160> 18
 15

<170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 28
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido antimicrobiano

25 <400> 1
 Arg Val Ile Arg Val Val Gln Arg Ala Cys Arg Ala Ile Arg His Ile
 1 5 10 15

Val Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Arg Arg Ile Leu
 20 25

<210> 2
 <211> 31
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido antimicrobiano

35 <400> 2
 Arg Val Ile Arg Val Val Gln Arg Ala Cys Arg Ala Ile Arg His Ile
 1 5 10 15

Val Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Arg Arg Ile Leu Arg Val Val
 20 25 30

40 <210> 3
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Péptido antimicrobiano

<400> 3

ES 2 668 537 T3

Arg Trp Ile Arg Val Val Gln Arg Trp Cys Arg Ala Ile Arg His Ile
 1 5 10 15

Trp Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Arg Arg Trp Leu Arg Val Val
 20 25 30

5 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Péptido antimicrobiano
 <400> 4

Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg
 1 5 10

15 <210> 5
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Péptido antimicrobiano
 <400> 5

Arg Arg Val Val Arg Arg Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg
 1 5 10 15

25 Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg
 20

30 <210> 6
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Péptido antimicrobiano
 <400> 6

Val Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg
 1 5 10 15

Arg Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Val
 20 25 30
 Val Arg Arg
 35

40 <210> 7
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Péptido antimicrobiano
 <400> 7

ES 2 668 537 T3

Arg Arg Val Val Arg Arg Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg
 1 5 10 15

Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val
 20 25 30

Val Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg
 35 40

- 5 <210> 8
- <211> 48
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> Péptido antimicrobiano
- <400> 8

Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val Arg Arg Val
 1 5 10 15

Val Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val Arg
 20 25 30

- 15 Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg
 35 40 45
- <210> 9
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- 20 <220>
- <223> Péptido antimicrobiano
- <400> 9

Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Trp Val Arg Arg
 1 5 10

- 25 <210> 10
- <211> 23
- <212> PRT
- 30 <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> Péptido antimicrobiano

- 35 <400> 10

Arg Arg Trp Val Arg Arg Val Arg Arg Val Trp Arg Val Val Arg Val
 1 5 10 15

Val Arg Arg Trp Val Arg Arg
 20

- 40 <210> 11
- <211> 36
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

ES 2 668 537 T3

<220>

<223> Péptido antimicrobiano

<400> 11

5

Val Arg Arg Val Trp Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Trp Val
1 5 10 15

Arg Arg Val Arg Arg Val Trp Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg
20 25 30

Trp Val Arg Arg
35

<210> 12

<211> 48

10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antimicrobiano

15

<400> 12

Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Trp Val Arg Arg Val Arg Arg Val
1 5 10 15

Trp Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Trp Val Arg Arg Val Arg
20 25 30

Arg Val Trp Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Trp Arg Val Val
35 40 45

20

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Péptido antimicrobiano

<400> 13

Arg Arg Trp Trp Arg Arg
1 5

30

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

35

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antimicrobiano

40

<400> 14

Arg Trp Trp Arg Trp Trp Arg Arg Trp Trp Arg Arg
1 5 10

45

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 668 537 T3

<220>

<223> Péptido antimicrobiano

5 <400> 15

Trp Arg Arg Trp Trp Arg Arg Trp Trp Arg Trp Trp Arg Arg Trp Trp
1 5 10 15

Arg Arg

<210> 16

10 <211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Péptido antimicrobiano

<400> 16

Arg Arg Trp Trp Arg Arg Trp Arg Arg Trp Trp Arg Arg Trp Trp Arg
1 5 10 15
Trp Trp Arg Arg Trp Trp Arg Arg
20

20 <210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Dominio de transducción peptídico

<400> 17

Arg Arg Gln Arg Arg Thr Ser Lys Leu Met Lys Arg
30 1 5 10

<210> 18

<211> 35

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antimicrobiano

40 <400> 18

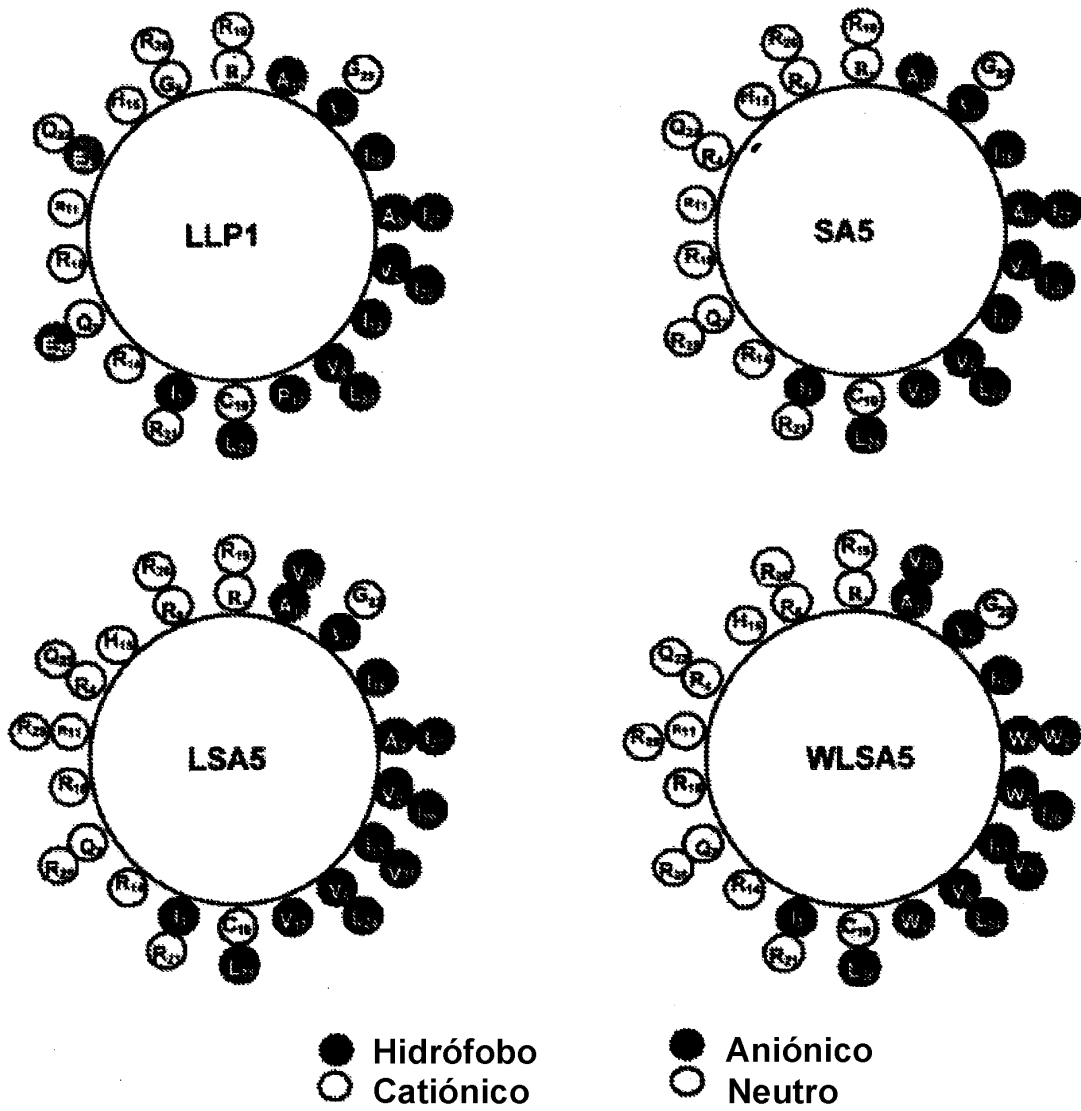
Arg Arg Gln Arg Arg Thr Ser Lys Leu Met Lys Arg Arg Arg Trp Val
1 5 10 15

Arg Arg Val Arg Arg Val Trp Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Trp
20 25 30

Val Arg Arg
35

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado y purificado que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
RWWRWRRWRR (SEQ ID NO: 14);
5 WRRWRRWRRWRRWRRWRR (SEQ ID NO: 15); y
RRWRRWRRWRRWRRWRRWRR (SEQ ID NO: 16).
2. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. Un método *in vitro* para neutralizar un microorganismo seleccionado entre un lentivirus y una bacteria *Staphylococcus aureus*, que comprende poner en contacto el microorganismo con uno o más péptidos antimicrobianos seleccionados entre WR12 (SEQ ID NO: 14); WR18 (SEQ ID NO: 15); y WR24 (SEQ ID NO: 16) en una cantidad eficaz para neutralizar el lentivirus o destruir la bacteria *Staphylococcus aureus*.
4. El método de la reivindicación 3, en donde el lentivirus es un virus de la inmunodeficiencia humana, preferiblemente en donde el virus de la inmunodeficiencia humana es VIH-1.
- 15 5. Un péptido antimicrobiano seleccionado entre WR12 (SEQ ID NO: 14); WR18 (SEQ ID NO: 15); y WR24 (SEQ ID NO: 16) para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección por lentivirus o una infección por *Staphylococcus aureus*.
6. Un sustrato en fase sólida que comprende al menos un péptido seleccionado entre: WR12 (SEQ ID NO: 14); WR18 (SEQ ID NO: 15); WR24 (SEQ ID NO: 16).
- 20 7. El sustrato en fase sólida de la reivindicación 6, en donde el sustrato en fase sólida es un dispositivo protésico, o es un catéter o una cánula.
8. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el lentivirus es un virus de la inmunodeficiencia humana, preferiblemente en donde el virus de la inmunodeficiencia humana es VIH-1.



LLP1: RVIEV VQGAC RAIRH IP RRI RQGLE RIL
 SA5: RVIRV VQRAC RAIRH IV RRI RQGLR RIL
 LSA5: RVIRV VQRAC RAIRH IV RRI RQGLR RILRV V
 WLSA5: RWIRV VQRWC RAIRH IW RRI RQGLR RWLRV V

Fig. 1

- LBU-1 RVRVRRVRR (SEQ ID NO:4)
- LBU-2 RRVRVRVRRVRRVRRVRR (SEQ ID NO:5)
- LBU-3 VRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (SEQ ID NO:6)
- LBU-3.5 RRVRVRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (SEQ ID NO:7)
- LBU-4 RVRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (SEQ ID NO:8)
- WLBU-1 RVRVRRVRR (SEQ ID NO:9)
- WLBU-2 RRVRVRVRRVRRVRRVRRVRR (SEQ ID NO:10)
- WLBU-3 VRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (SEQ ID NO:11)
- WLBU-4 RVRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (SEQ ID NO:12)

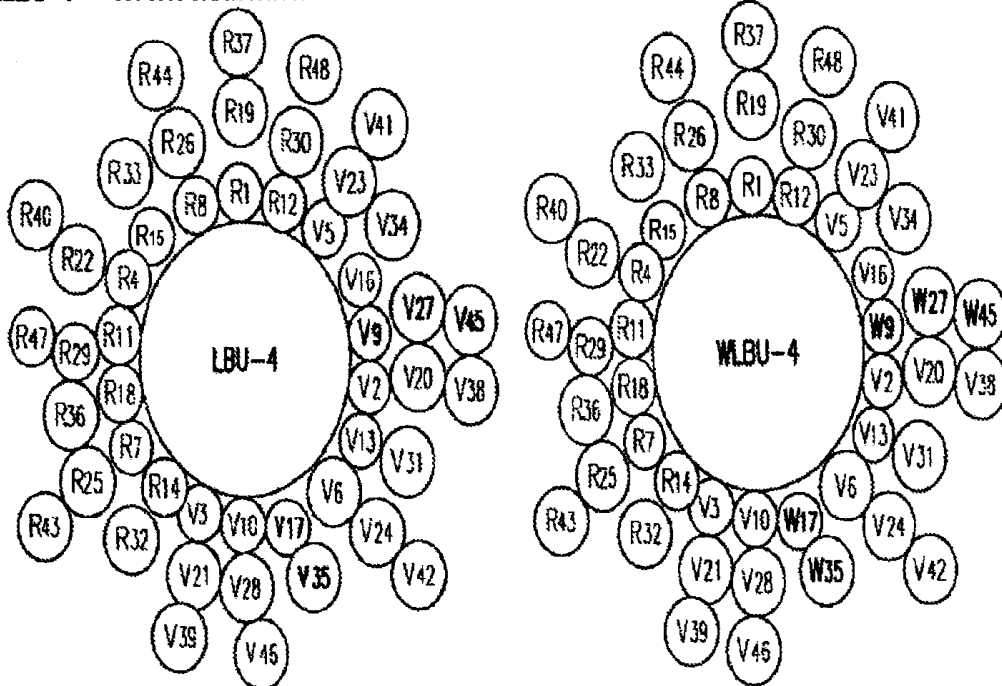


Fig. 2

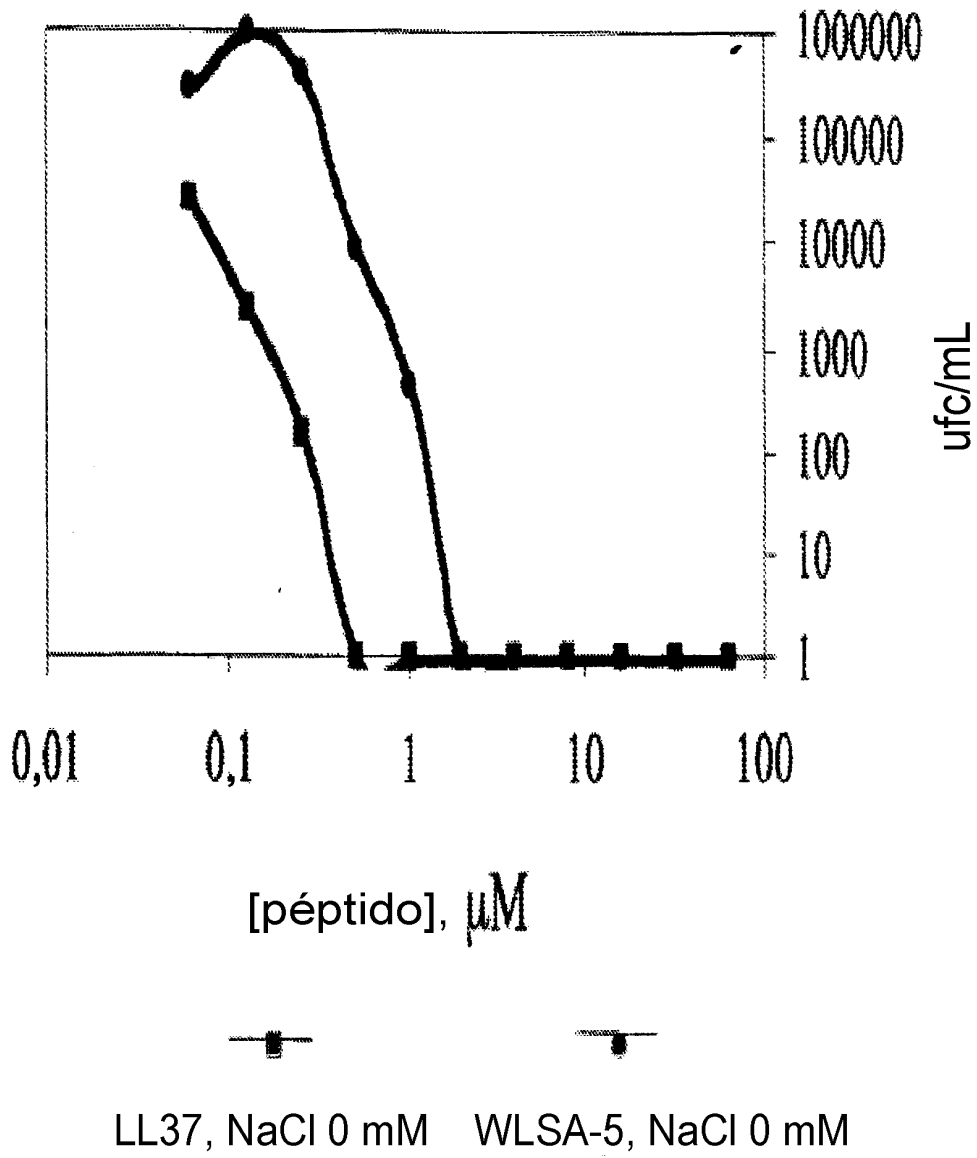


Fig. 3

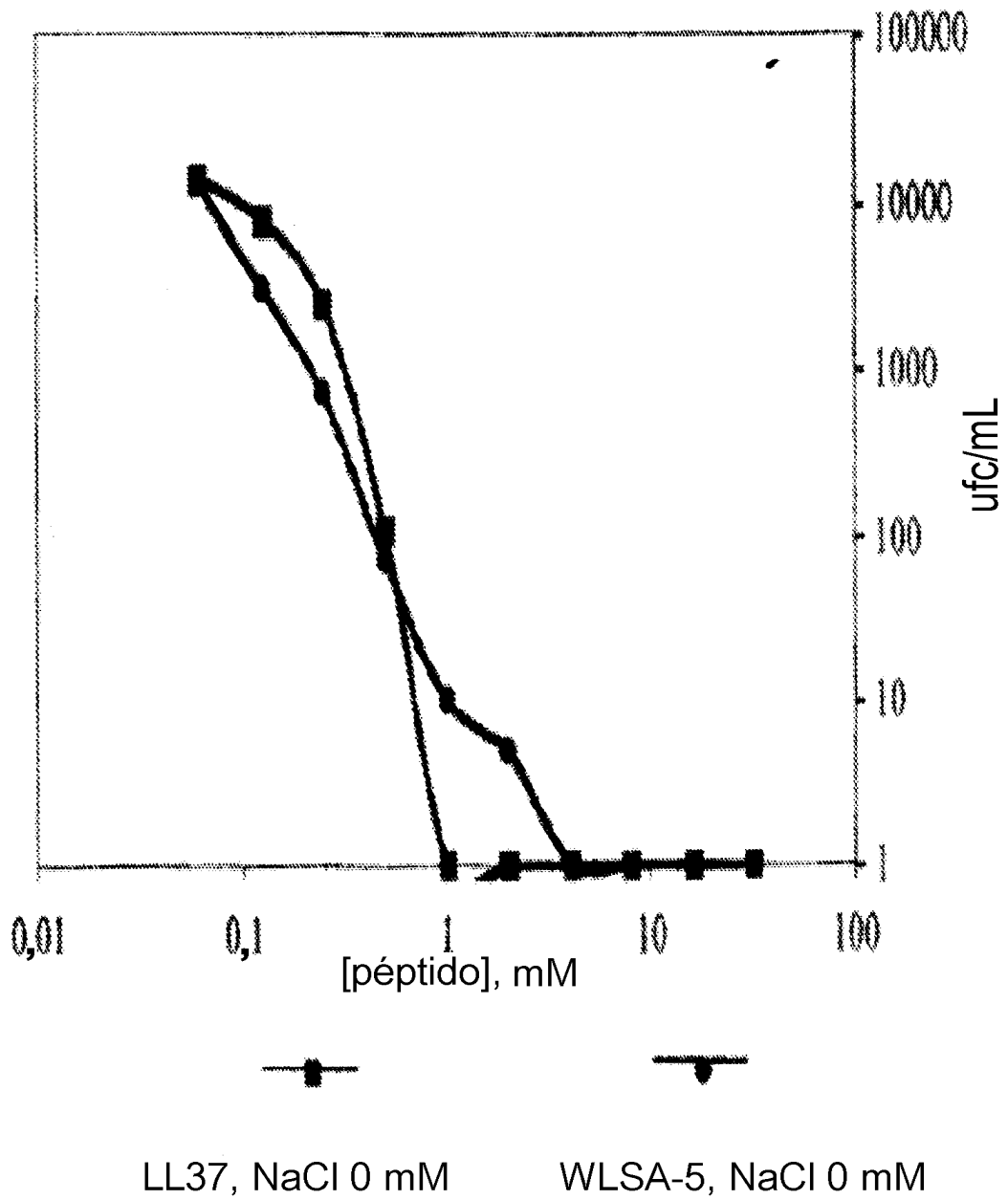


Fig. 4

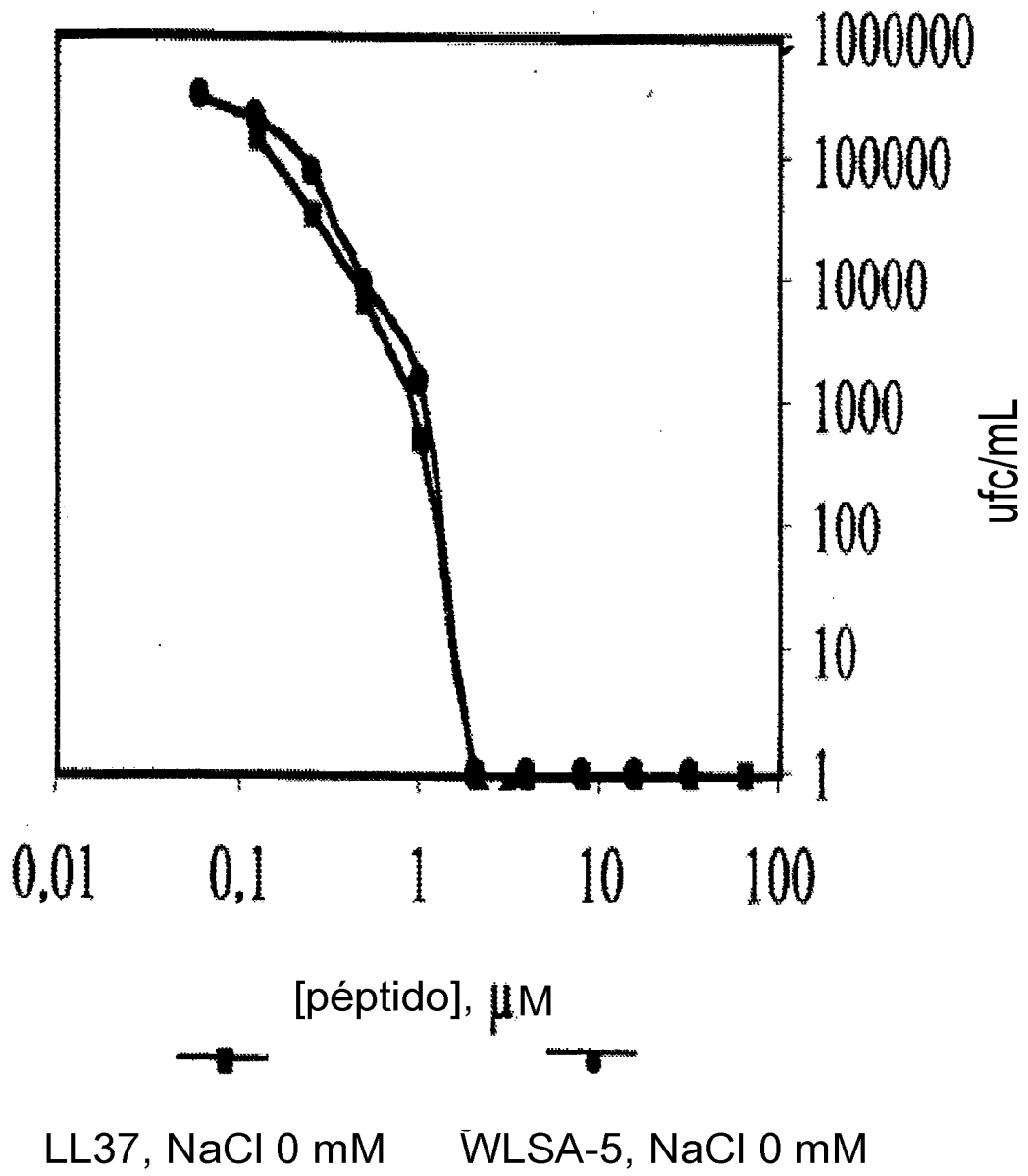
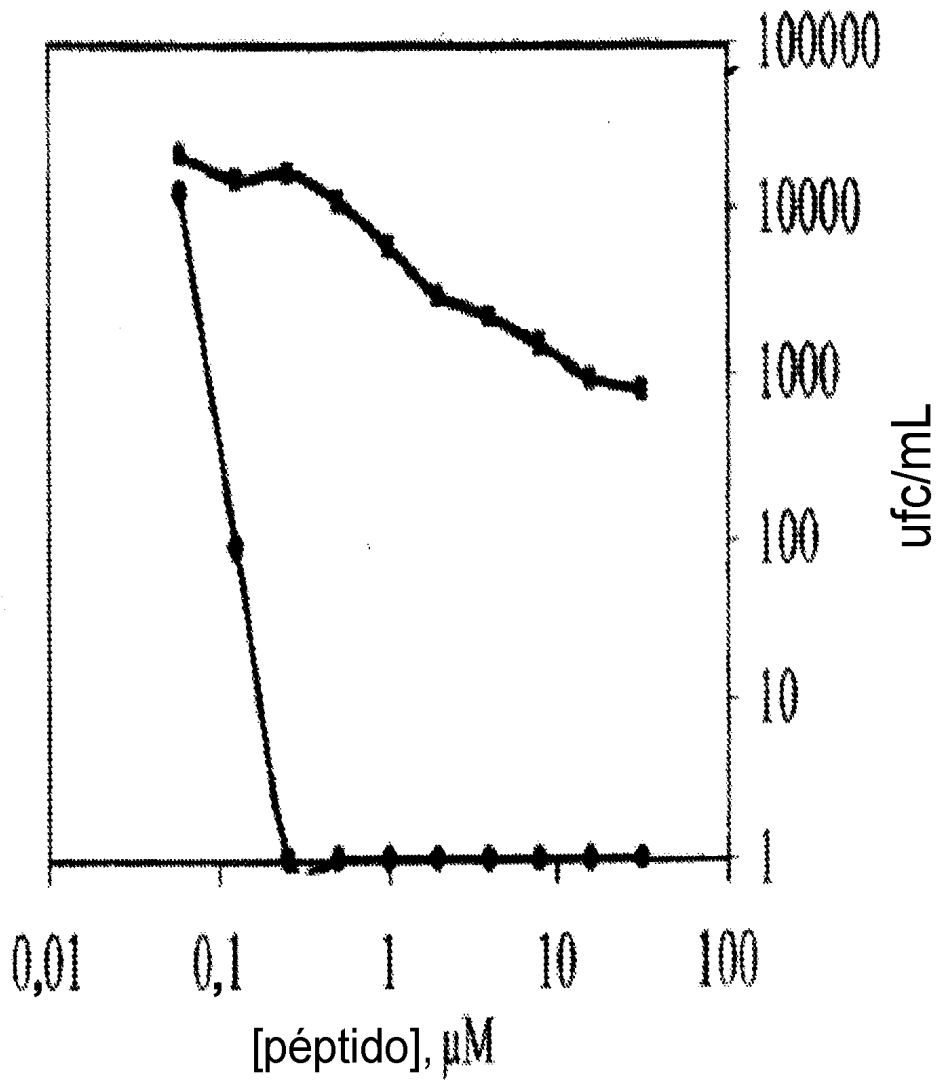


Fig. 5



—●—
LL37, NaCl 0 mM

—●—
WLSA-5, NaCl 0 mM

Fig. 6

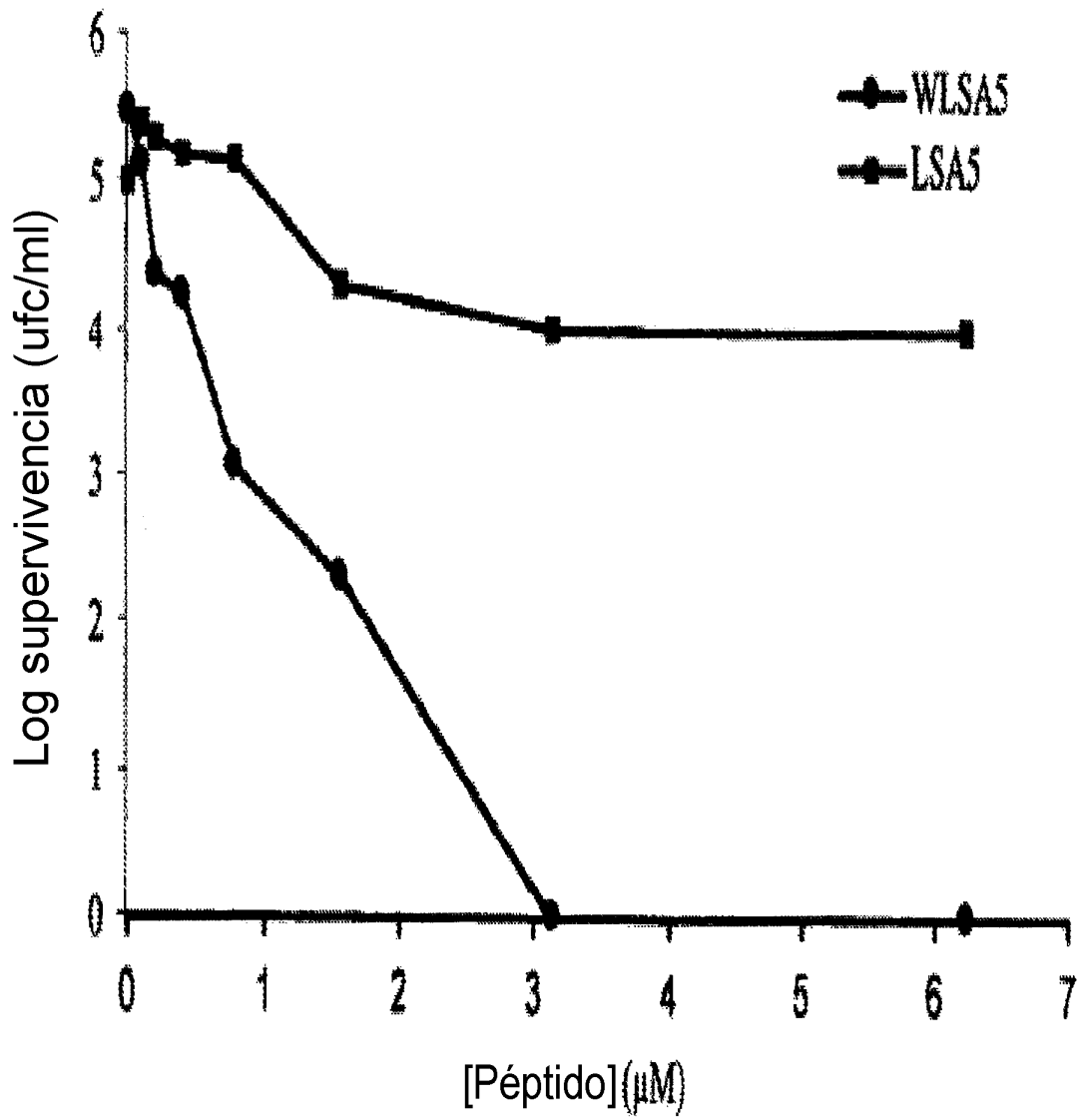


Fig. 7

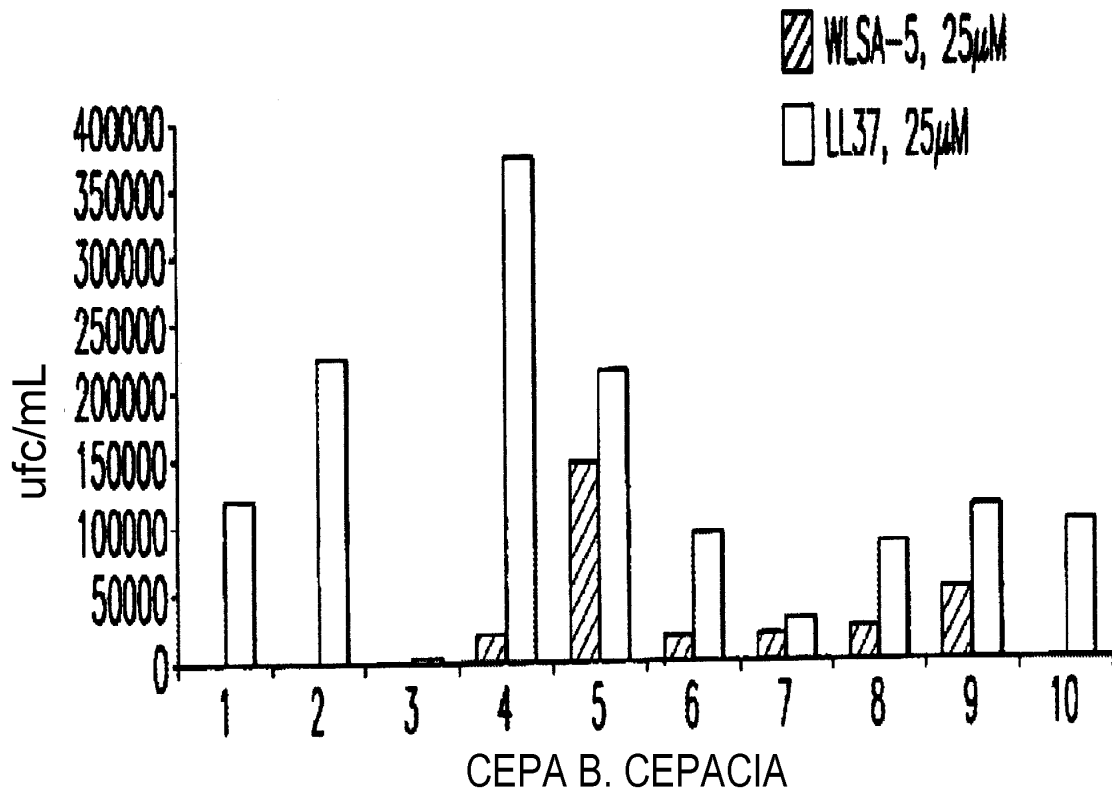


Fig. 8

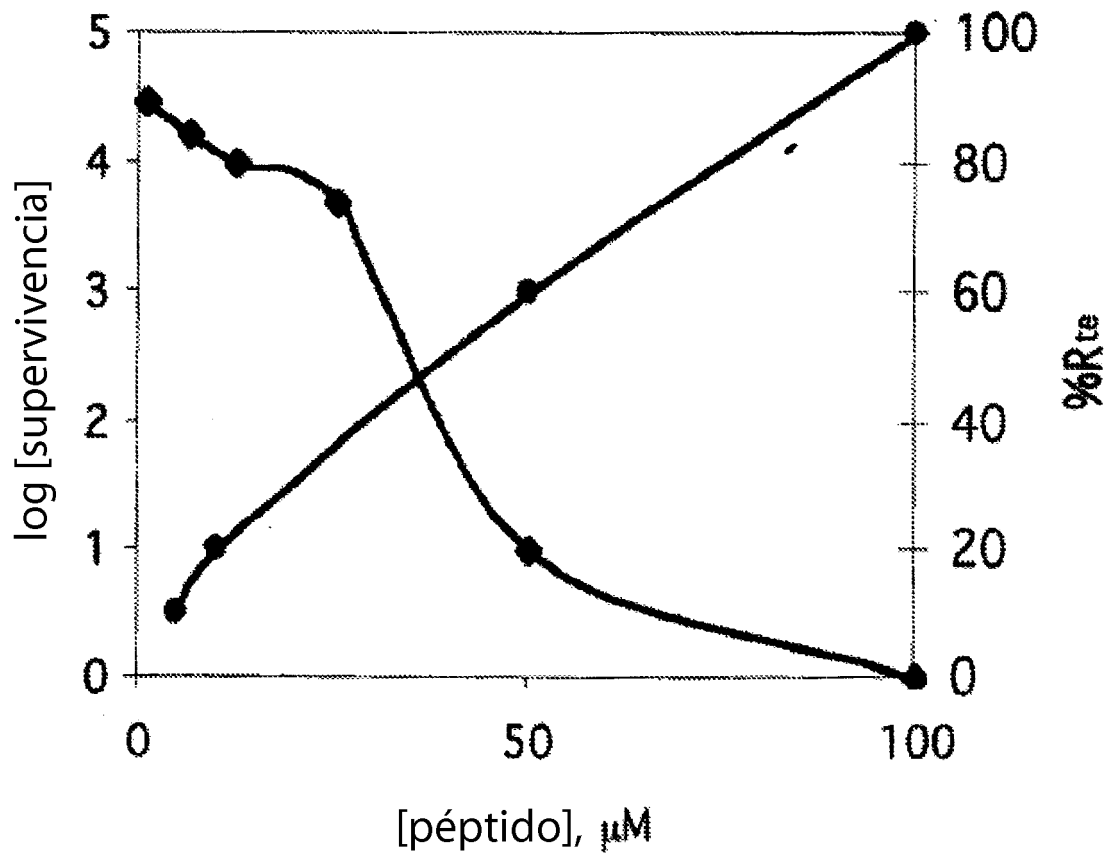


Fig. 9

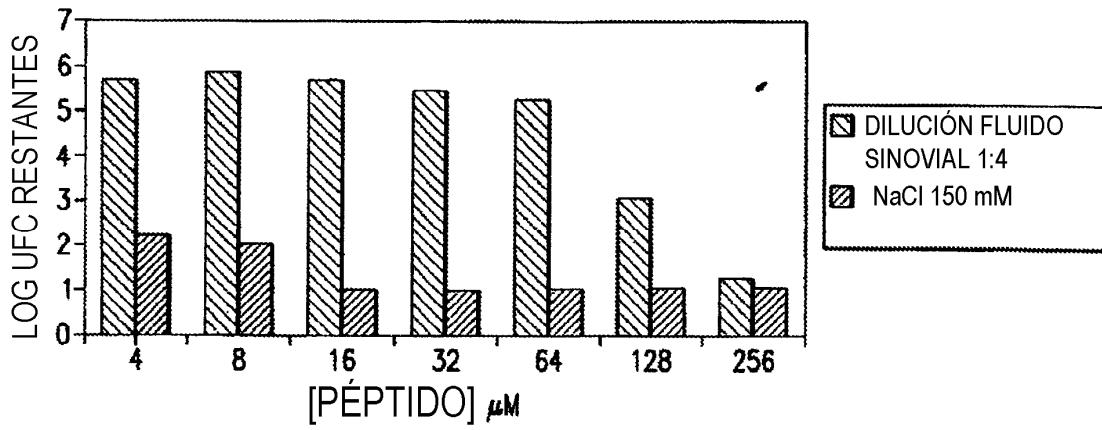


Fig. 10

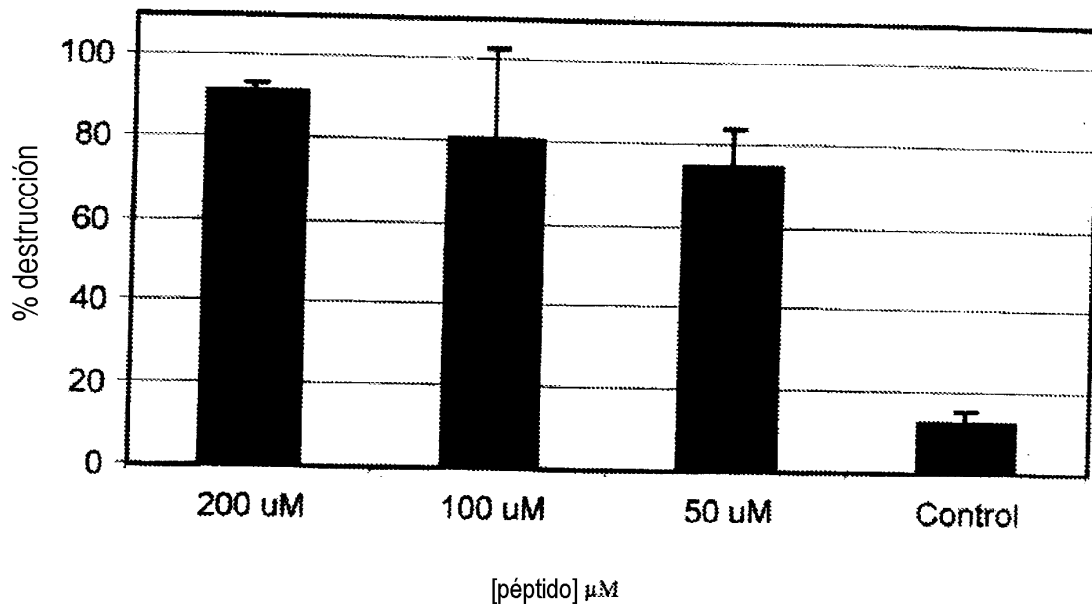


Fig. 11

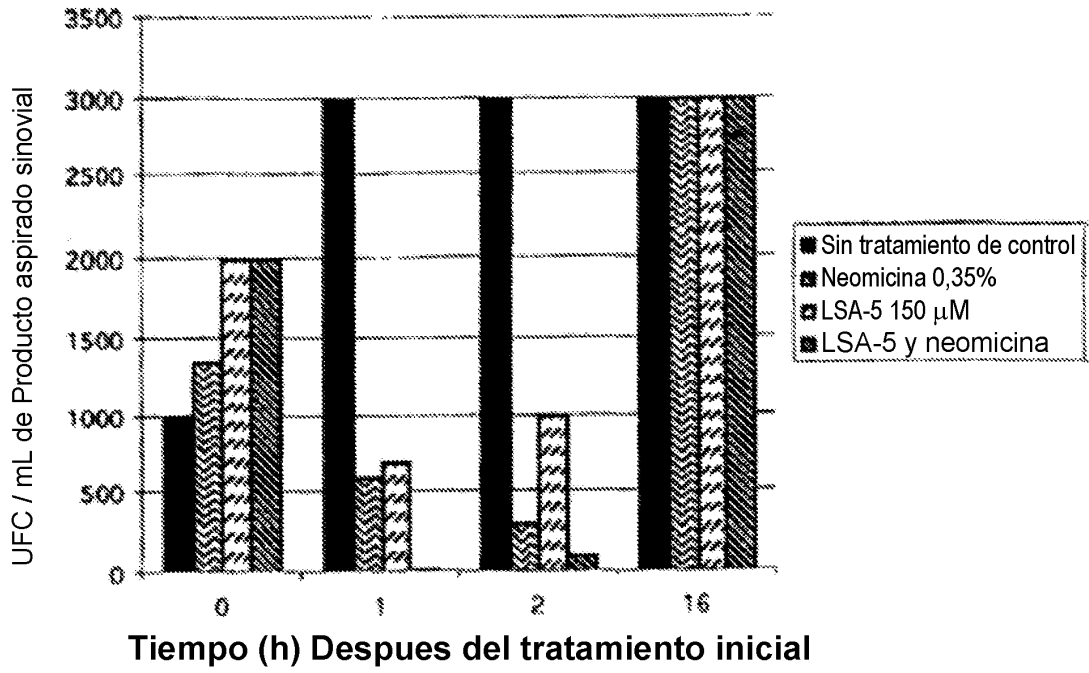


Fig. 12

SUPRESIÓN DE VIH POR LSA-5

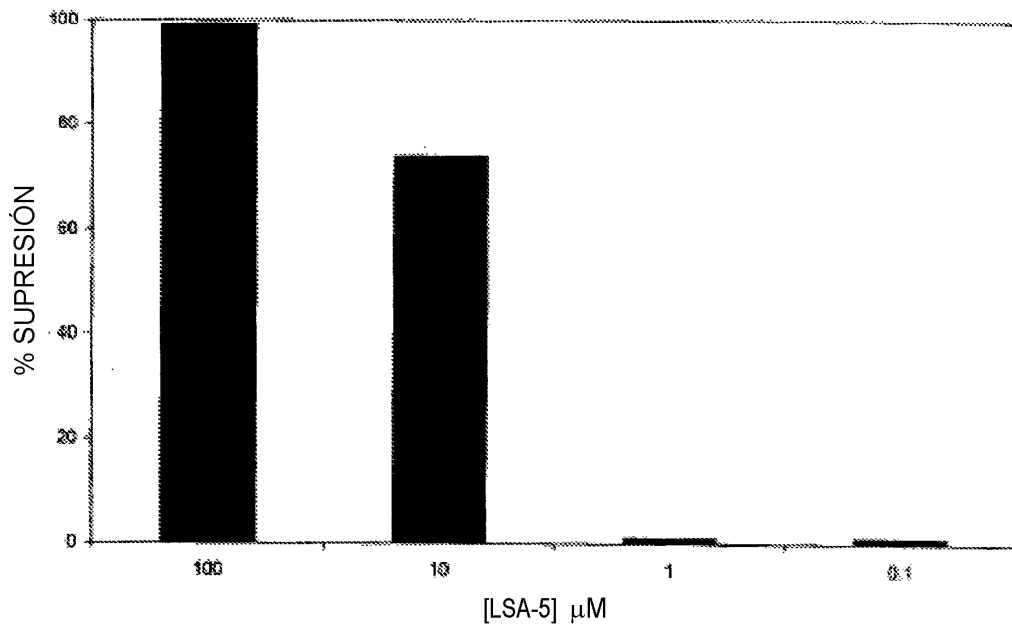


Fig. 13

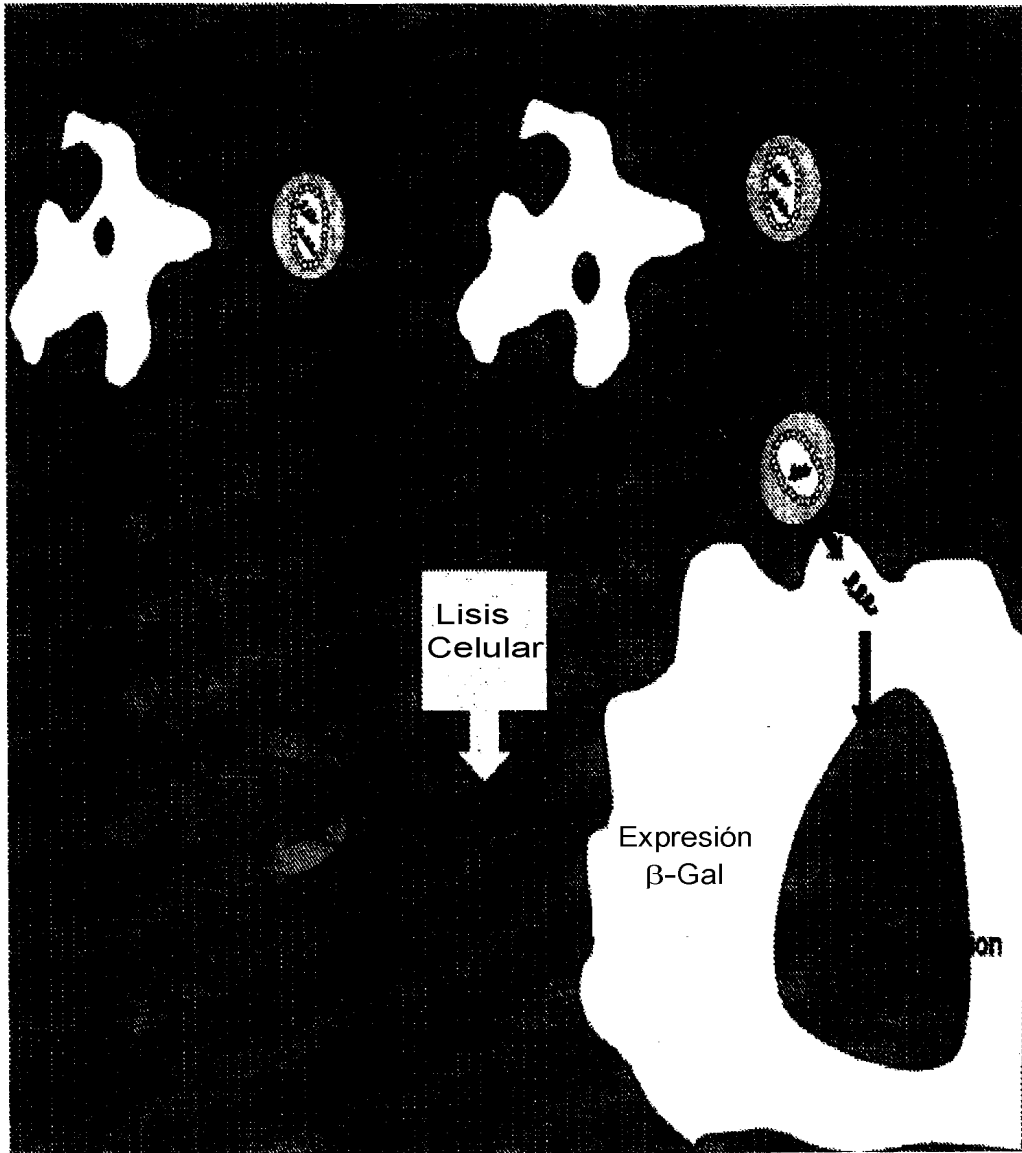


Fig. 14

Serie LBU frente a cepa NL4-3 de VIH

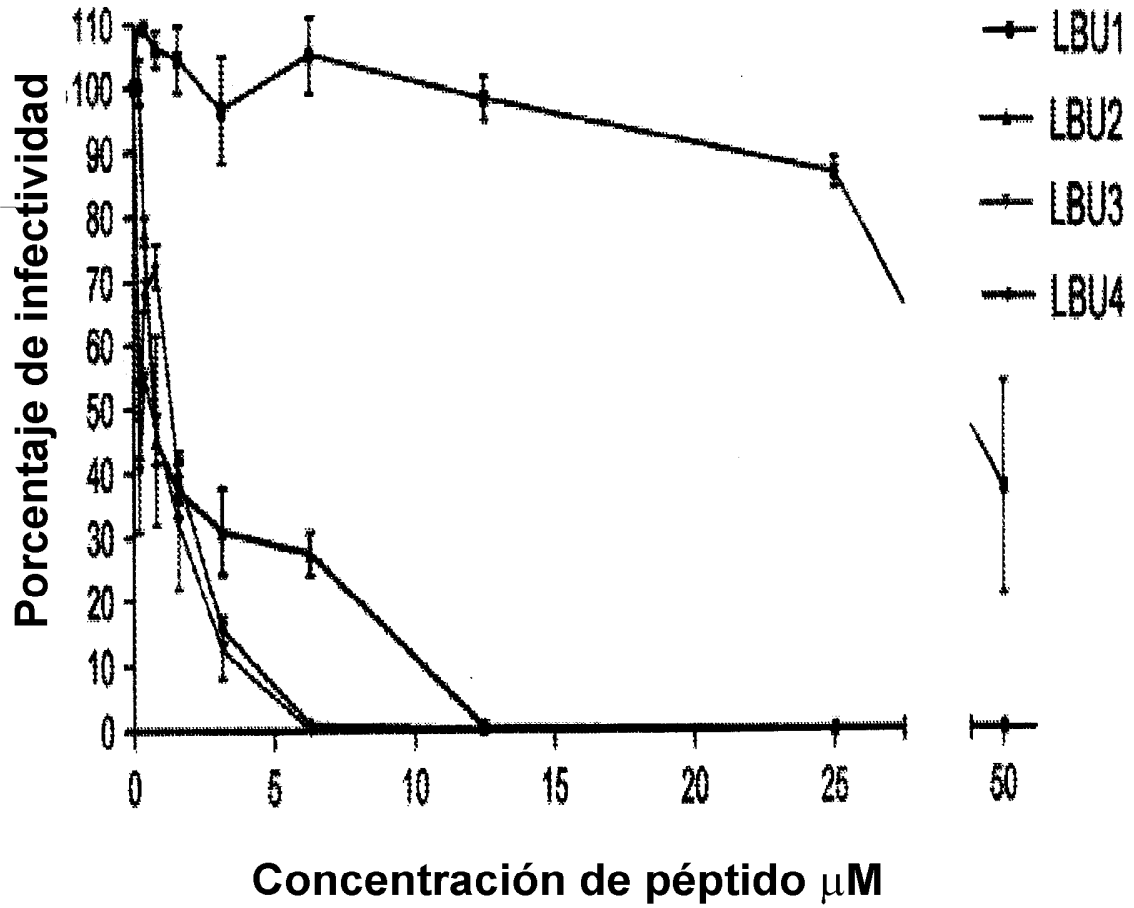


Fig. 15

Péptido	Cl ₅₀ (μM)	Toxicidad (μM)
LBU1	30	>50
LBU2	0,78	1,6
LBU3	0,38	1,6
LBU4	1,56	0,78

Fig. 16

Serie WLBU frente a cepa NL4-3 de VIH

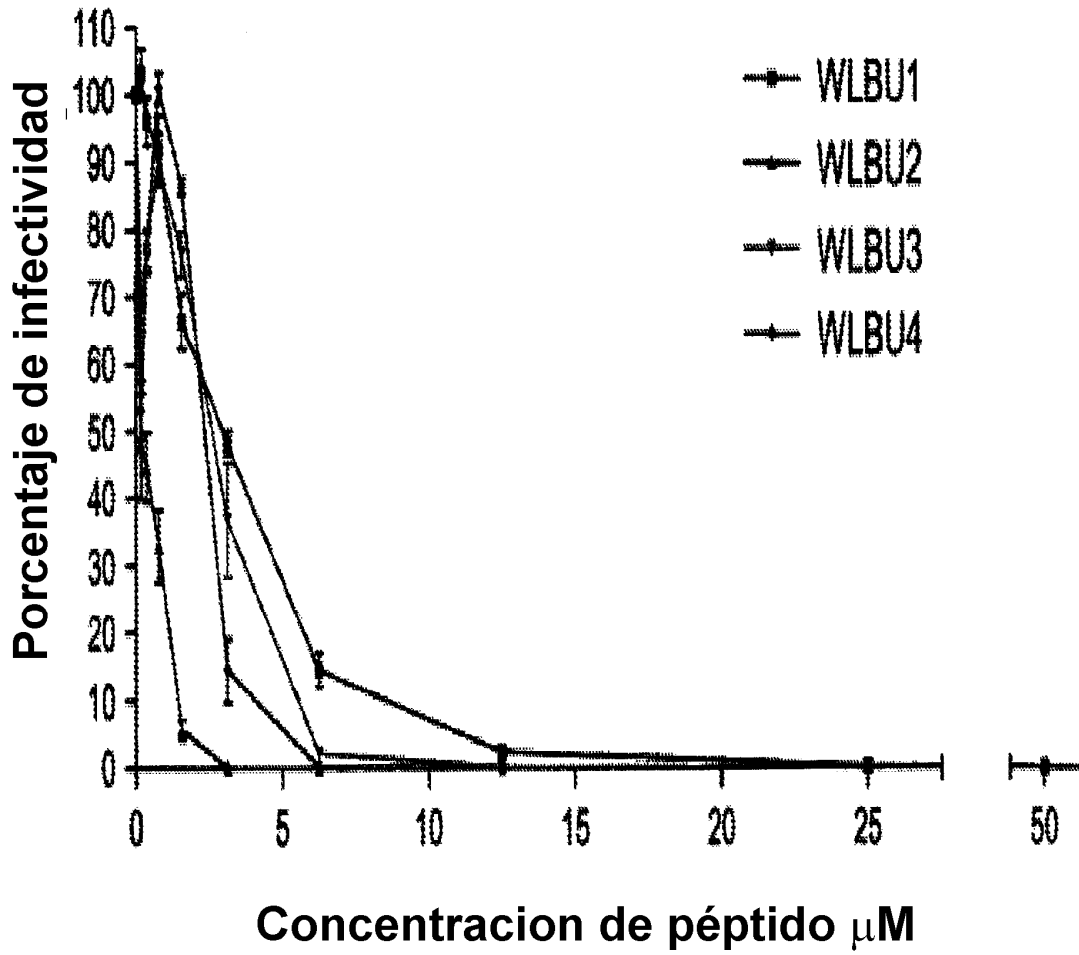


Fig. 17

Péptido	Cl ₅₀ (μM)	Toxicidad (μM)
WLBU1	3,13	>50
WLBU2	0,38	1,6
WLBU3	3,13	12,5
WLBU4	3,13	6,25

Fig. 18

Serie WR frente a la cepa NL4-3 de VIH

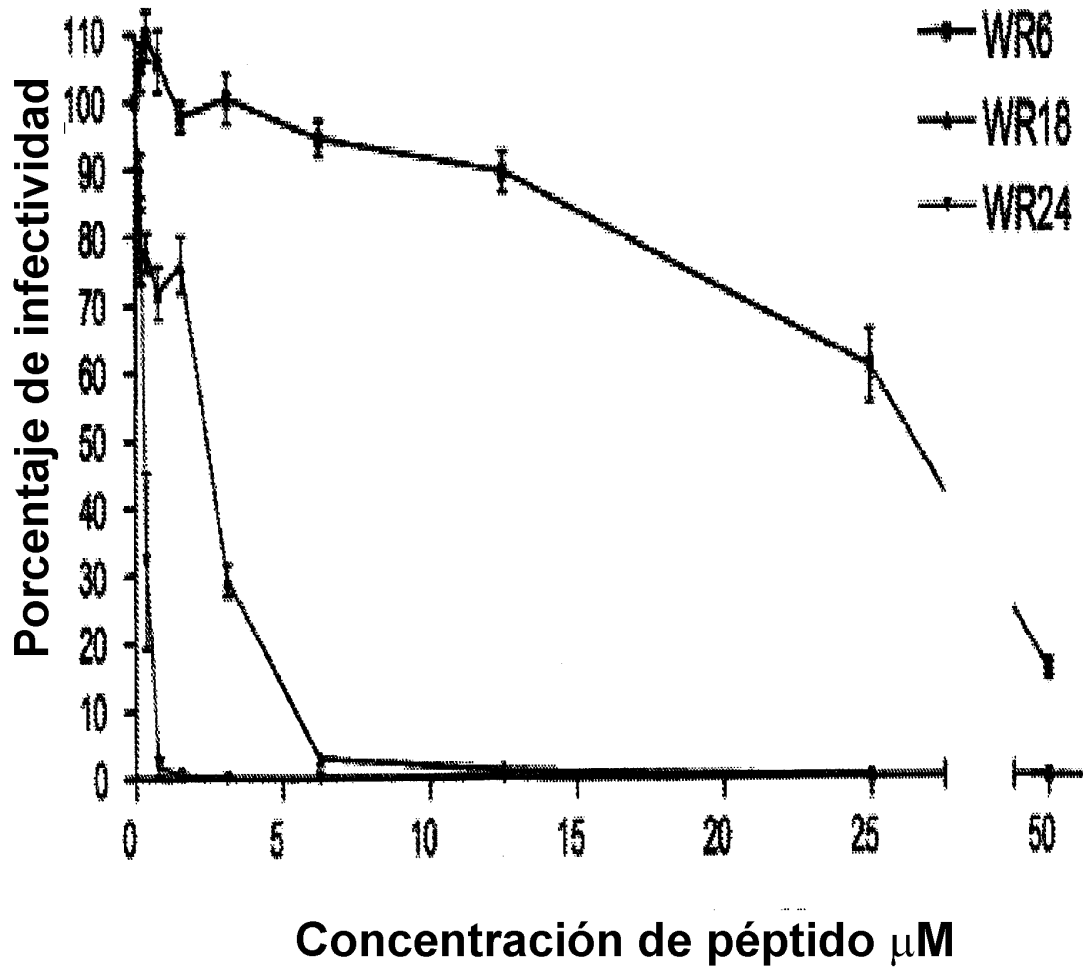


Fig. 19

Péptido	Cl ₅₀ (μM)	Toxicidad (μM)
WR6	30	>50
WR18	3,13	12,5
WR24	0,78	3,12

Fig. 20

Las bacterias son atraídas hacia la superficie catiónica bacteriana

Muerte celular y lisis

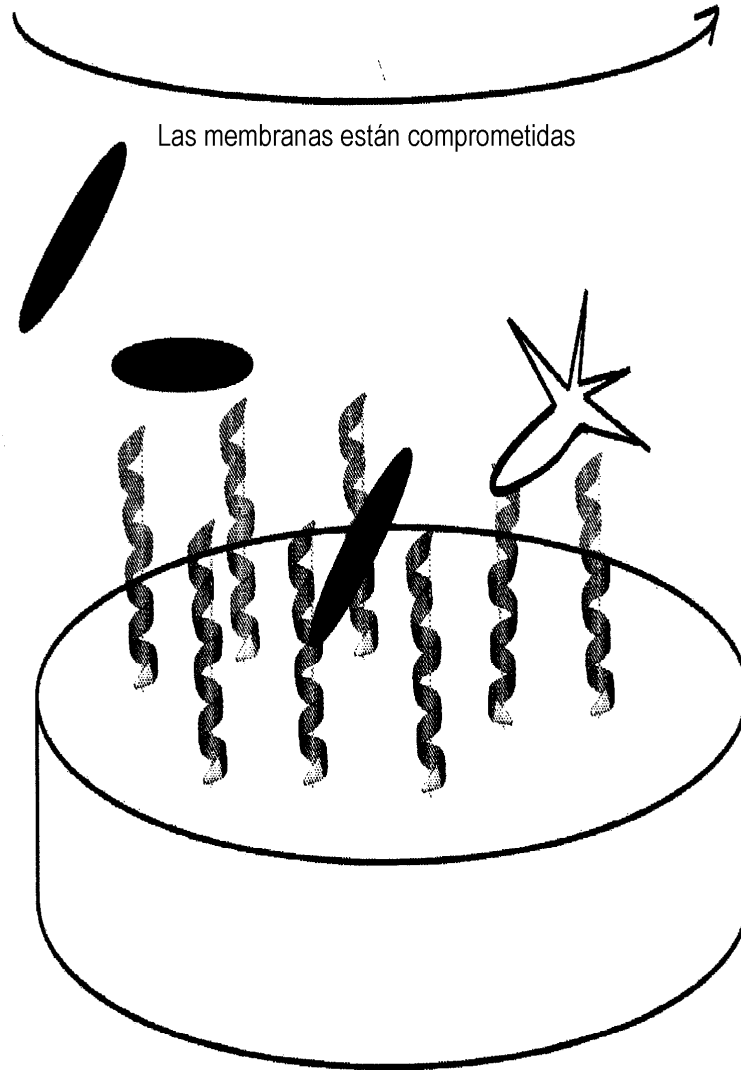
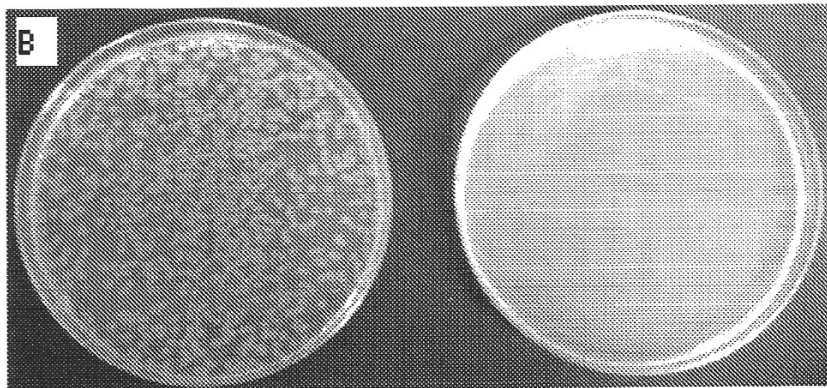
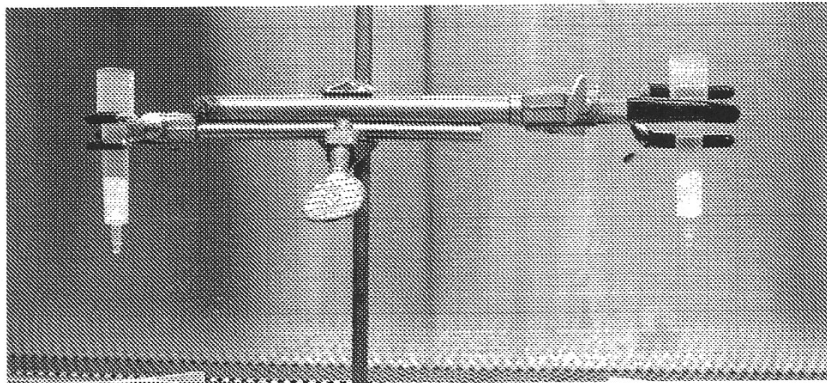


Fig. 21



Experimento Transwell WLBUE2 para evaluación de la lixiviación

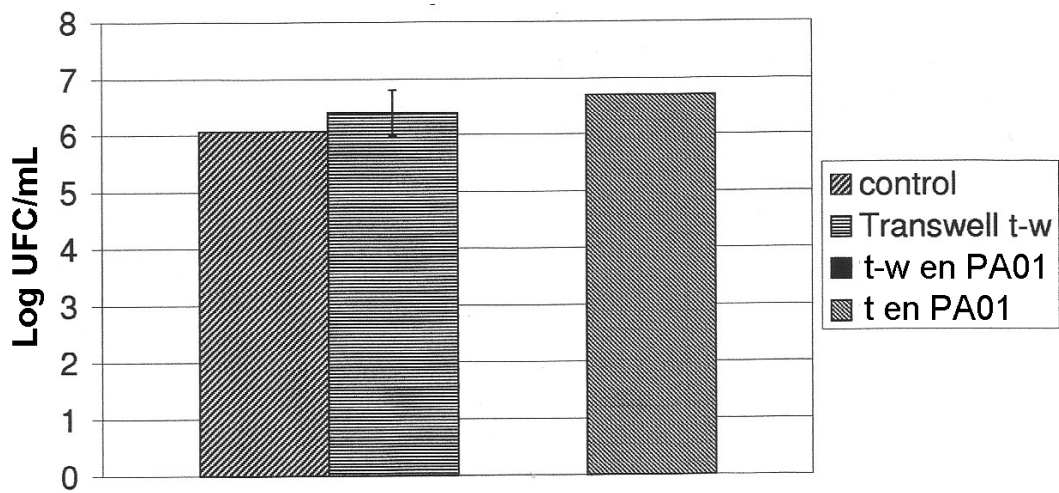


Fig. 22

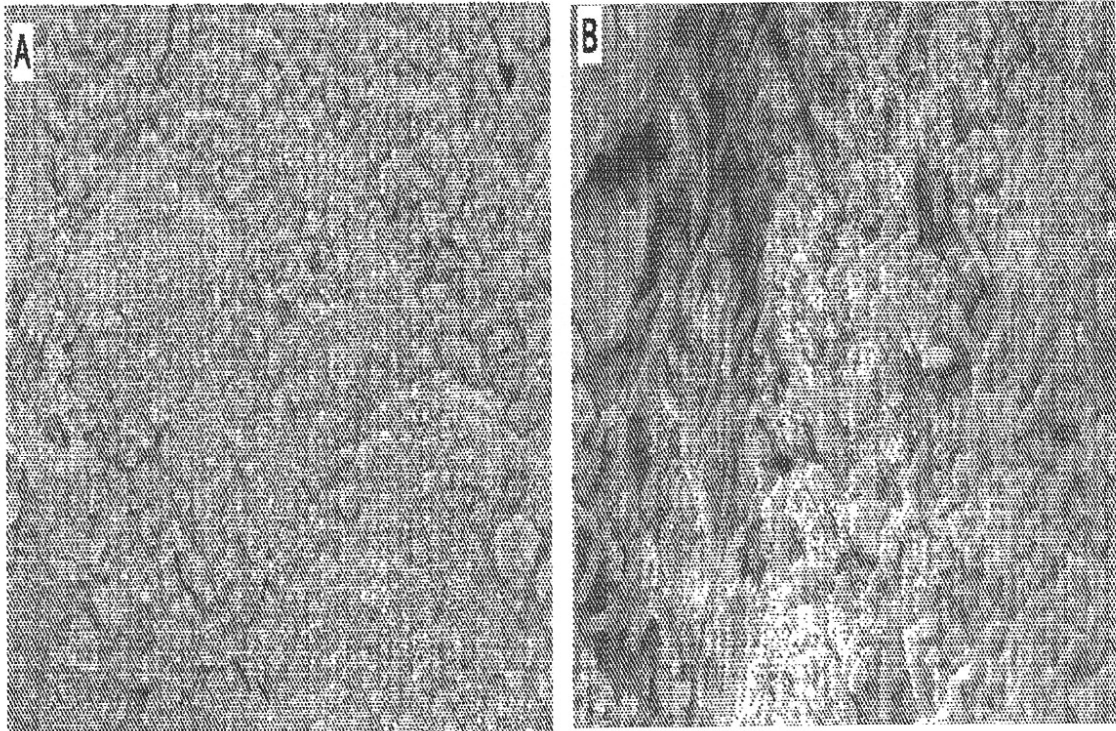


Fig. 23

Efecto del péptido WBLU2 sobre formación de placa A/PR

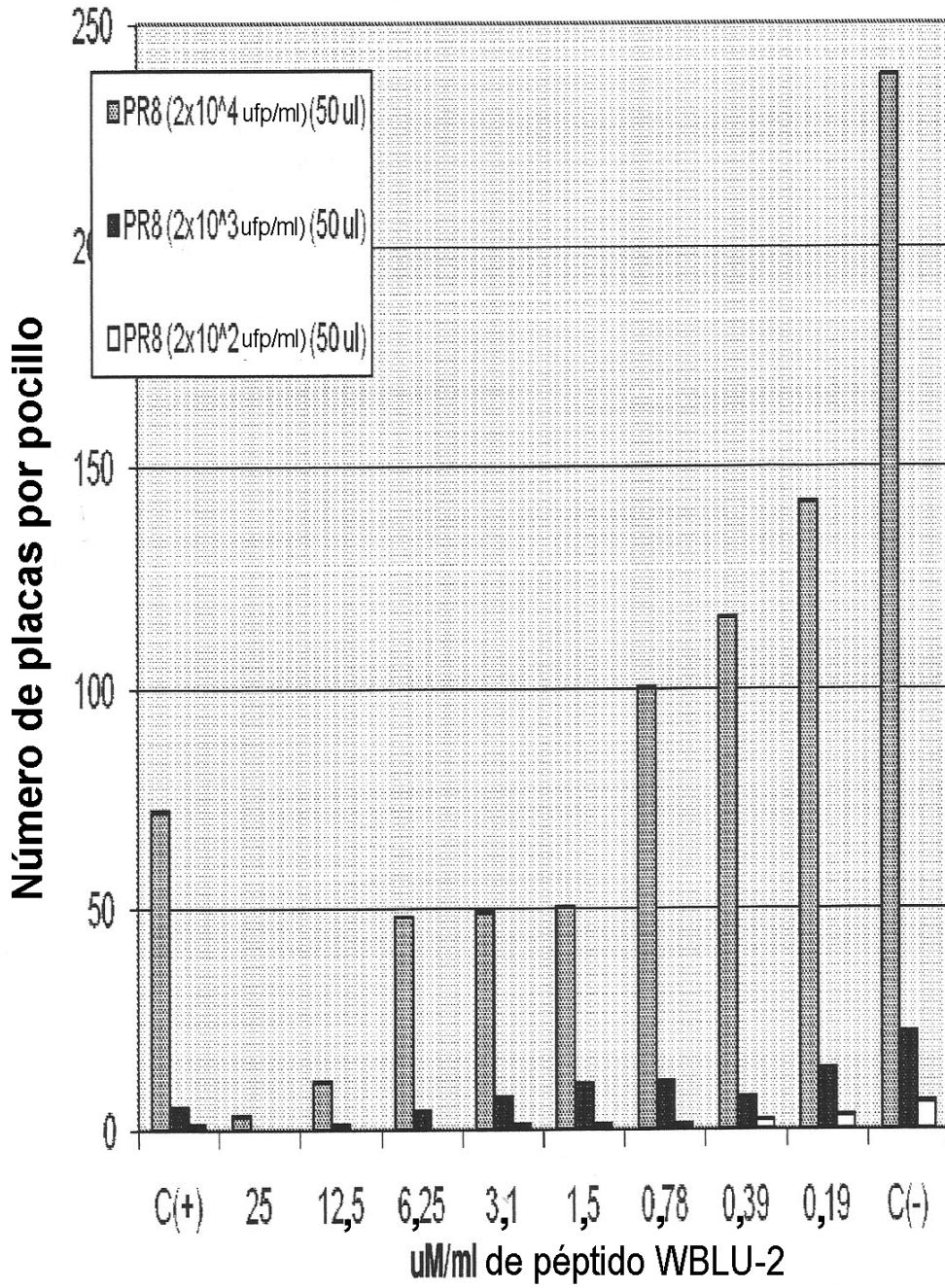


Fig. 24

Curva de supervivencia de WLBU-2

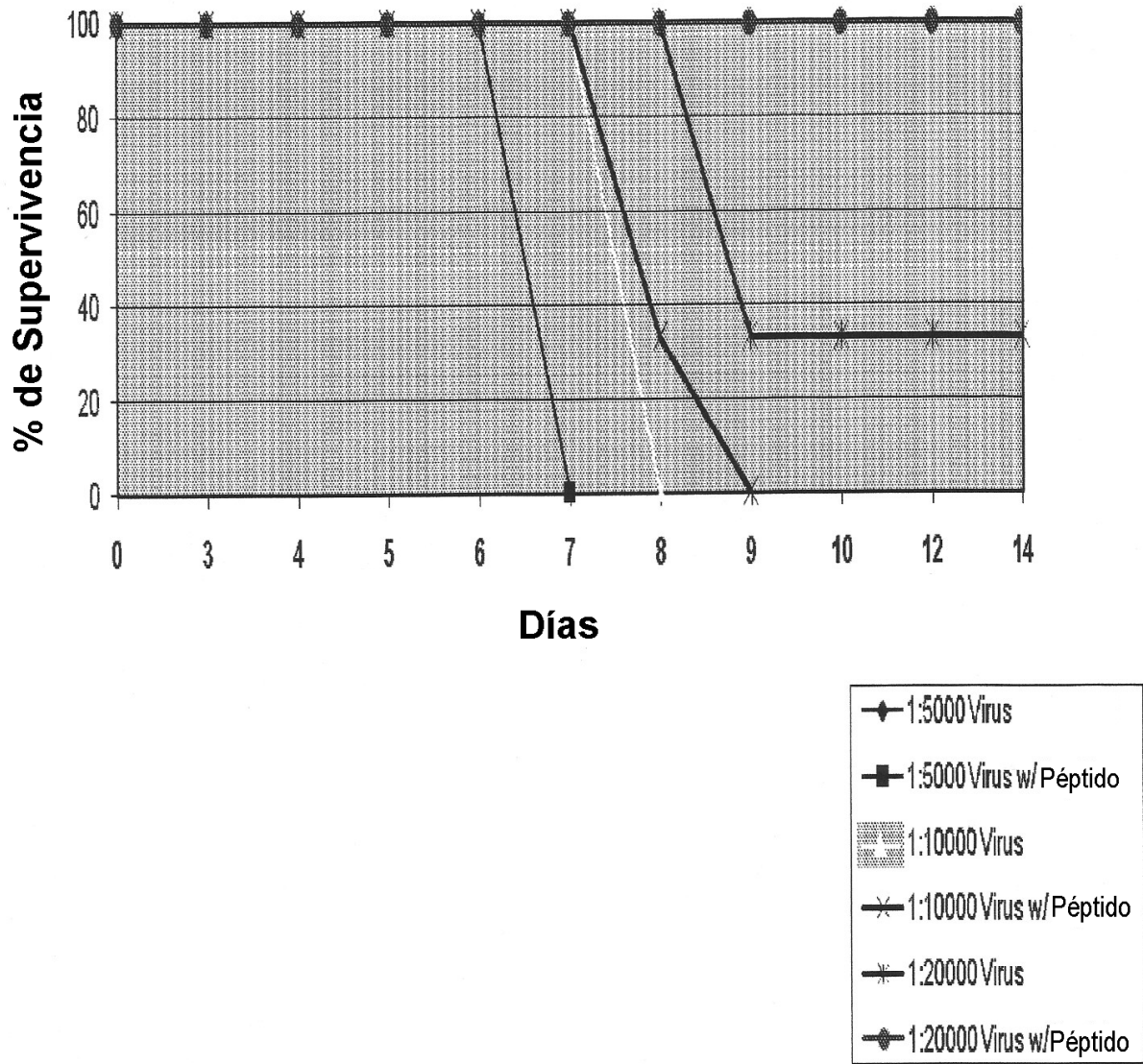


Fig. 25

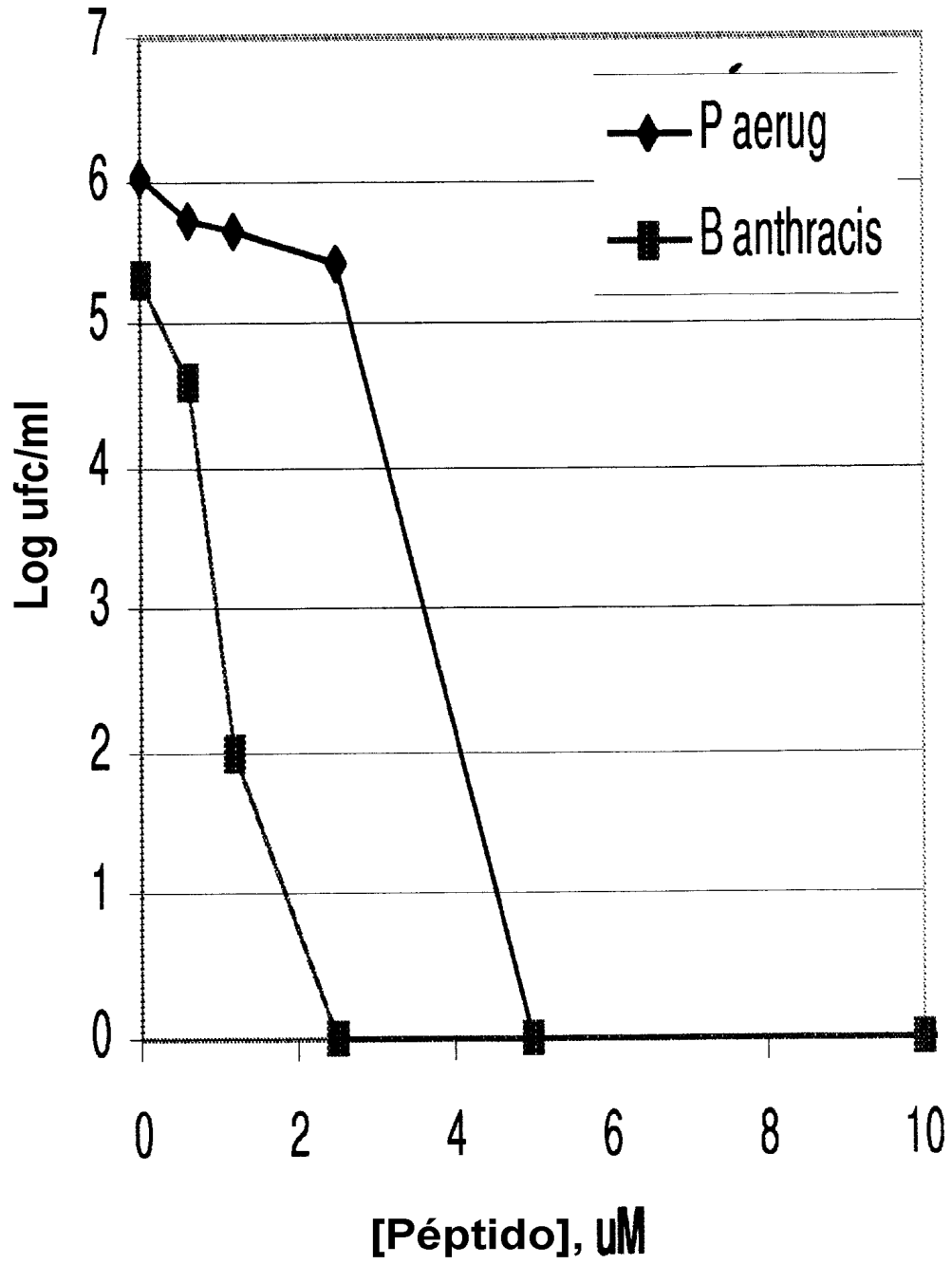
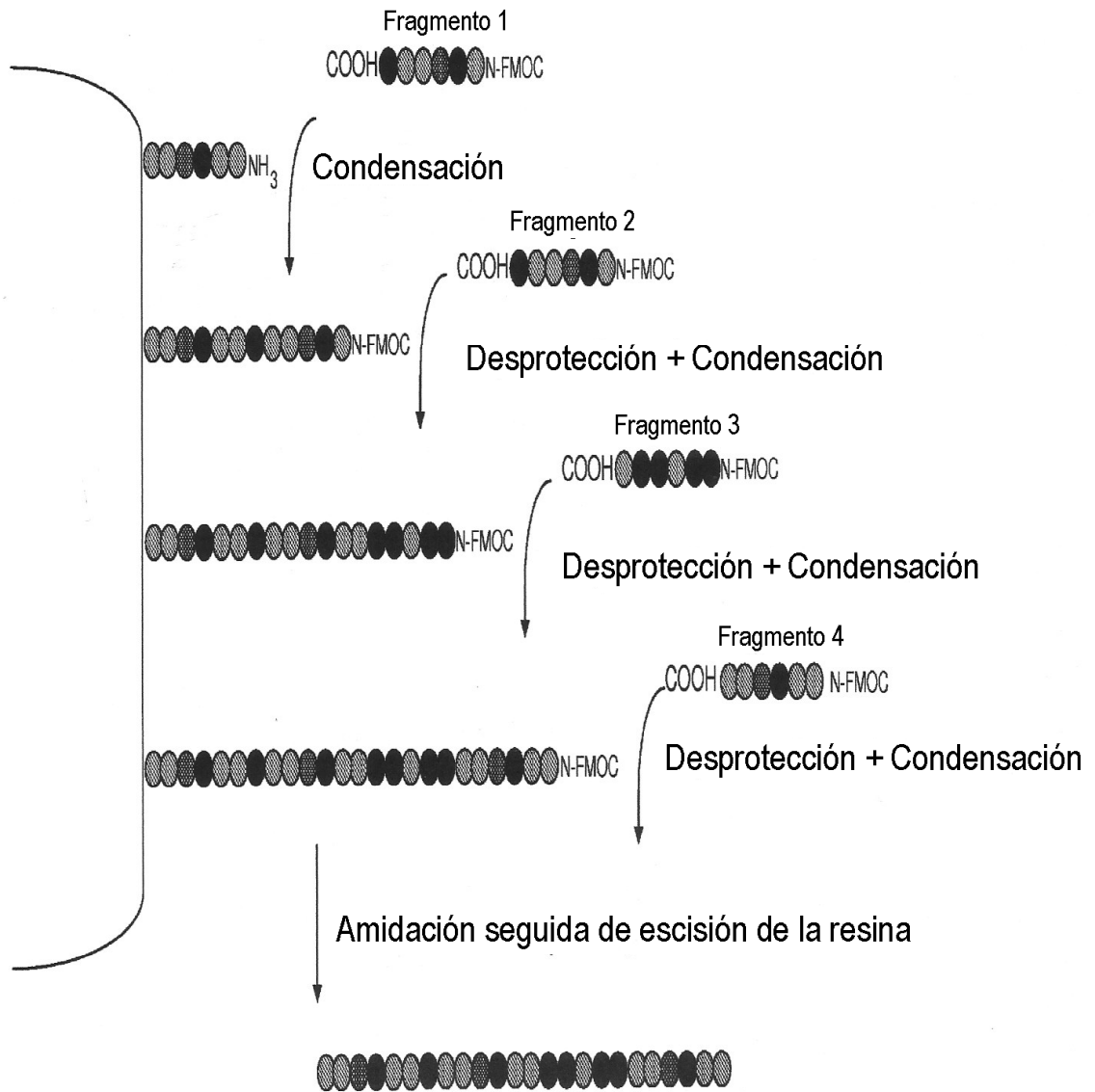


Fig. 26



WLBU2
Fig. 27