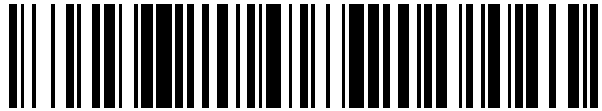


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 392**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/04** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**C07K 7/50** (2006.01)

**C07K 14/00** (2006.01)

**C07K 7/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.12.2013 PCT/IB2013/002893**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14102596**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2013 E 13828804 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018 EP 2938352**

54 Título: **Péptidos catiónicos cíclicos con actividad antimicrobiana**

30 Prioridad:

**28.12.2012 IT MI20122263**

**08.11.2013 US 201361901680 P**

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

**26.09.2018**

73 Titular/es:

**I.C.F. S.R.L. (100.0%)**

**Via G.B. Benzoni 50**

**26020 Palazzo Pignano (CR) , IT**

72 Inventor/es:

**BARONI, MARIA CRISTINA;**

**CABASSI, CLOTILDE SILVIA y**

**ROMANI, ANTONELLO**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 683 392 T3**

Aviso:En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Péptidos catiónicos cíclicos con actividad antimicrobiana

## 5 Campo de la invención

10 La presente invención proporciona una serie de péptidos catiónicos cíclicos, o que pueden volverse cíclicos, con actividad antimicrobiana, caracterizados por citotoxicidad baja o no detectable contra células de organismos superiores, que son citostáticos o citotóxicos contra al menos una bacteria Gram negativa y/o Gram positiva y/o un hongo (que comprende levaduras) derivados de cepas de referencia o aislados clínicos.

Estado de la técnica

15 El tratamiento de infecciones bacterianas con antibióticos representa uno de los pilares de la medicina humana. El desarrollo y empleo de antibióticos, a partir de la segunda mitad del siglo XX, ha revolucionado el enfoque al tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas e infecciones que se consideraban incurables en el pasado.

20 La necesidad de compuestos antimicrobianos nuevos y cada vez más eficientes ha inducido a las compañías farmacéuticas a concentrar sus esfuerzos hacia el desarrollo de nuevas moléculas, con el resultado de poner a disposición, a partir del inicio de los años sesenta del pasado siglo, más de 200 compuestos antimicrobianos diferentes (Overbye y Barrett, Drug Discovery Today, 10: 45-52, 2005).

25 Sin embargo, a pesar de haberse invertido recursos y energía para aumentar el conocimiento de los mecanismos de resistencia, y en la investigación de moléculas cada vez más eficientes, en este momento, el desarrollo de resistencia a los antibióticos es más rápido que el descubrimiento de nuevas clases de moléculas.

30 La incapacidad de las industrias farmacéuticas de identificar nuevos compuestos antimicrobianos se hace evidente a partir de la reducción drástica de la cantidad de moléculas nuevas comercializadas. De hecho, si bien de 1983 a 2001 la FDA (Administración de Alimentos y Fármacos) aprobó 47 compuestos nuevos para el uso clínico, en el período de 1998-2005 solamente 9 compuestos recibieron licencia para su uso clínico (Overbye y Barrett, ver la referencia anterior).

35 La resistencia a antibióticos, definida como el surgimiento (y la propagación) de factores de resistencia bacteriana a antibióticos, se activa por la presión selectiva ejercida sobre poblaciones microbianas por un uso excesivo y/o inadecuado de estos fármacos. Las infecciones por bacterias resistentes causan costos de salud estimados entre 10 y 15 mil millones de dólares al año solamente en los Estados Unidos, con aumento de la morbilidad, la mortalidad y los costos asociados con la enfermedad (Prevention effectiveness: A guide to decision analysis and economic evaluation. 2da Edición. Editores: Haddix AC, Teutsch SM, Corso PS., Nueva York: Oxford University Press 2003:345-57). Un artículo, publicado recientemente en Clinical Infectious Diseases, destaca un costo de salud por paciente afectado por infecciones resistentes a antibióticos (ARI) evaluable entre 18 000 y 29 000 dólares asociado con un aumento promedio de la hospitalización entre 6 y 12 días. Además, las tasas de mortalidad para estos pacientes son aproximadamente 2-2,5 veces mayores en comparación con pacientes no ARI (R.R. Roberts y otros, 2009 Clin Infect Dis; 49:1175-84).

45 En la actualidad este problema se ha convertido en una auténtica prioridad de la salud pública a escala mundial, también debido a la aparición de patógenos que son resistentes simultáneamente a varios antibióticos (resistencia a múltiples fármacos, o resistencia heterogénea), lo que reduce de facto la posibilidad de un tratamiento eficiente (WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2001, WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2). Cabe señalar que la resistencia heterogénea a antibióticos frecuentemente involucra a estructuras de salud. Estos microorganismos multiresistentes que se derivan de infecciones adquiridas en el hospital pueden transmitirse en una comunidad de varias maneras entre las que se encuentran: sistemas de ventilación y aireación, flujo de agua, tratamiento de tejidos y muestras de laboratorio, higiene inadecuada del personal y el ambiente, procedimientos quirúrgicos y dispositivos invasivos (Eggimann, Clin Microbiol Infect 2001;7:91; Pittet, The Lancet 2000;356:1307; Hugonnet, Clin Microbiol Infect 2000;6:350; Pittet, Swiss-NOSO 2001;8:25).

55 Entre los principales problemas, debe mencionarse la resistencia a metilina en *S. aureus* ("Celbenin"-resistant staphylococci. Br Med J, i:124-25, 1961), cuya prevalencia en Italia ha alcanzado una incidencia constante de alrededor de 40 %, y está entre las más altas en Europa (Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual Report of the European Antimicrobial resistance Surveillance Network (EARS-Net). Estocolmo, Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), 2010). La resistencia a la penicilina en *S. pneumoniae* alcanza una frecuencia superior al 20 % en algunos países de Europa y en los Estados Unidos, e incluso supera el 50 % en el Lejano Oriente. Recientemente, se ha observado una alta resistencia a macrólidos en este microorganismo, con valores que alcanzan el 30 %, con una tendencia creciente. En el género *Enterococcus* la frecuencia de resistencia a vancomicina ha aumentado progresivamente en todo el mundo, principalmente en los últimos años (alrededor de 20 % en los Estados Unidos) (en Centers for Disease Control and Prevention. 2002. Morb Mortal Weekly Rep, Julio 5, 51(26):565-567). En Italia, en un estudio llevado a cabo en 2007, se encontró una frecuencia de resistencia a vancomicina de aproximadamente 2,5 % en *E. faecalis* y de aproximadamente 20 % en el menos frecuente *E. faecium* (European Antimicrobial Resistance Surveillance System, EARSS, 2007).

En microorganismos Gram negativos, se observa una distribución de resistencias muy heterogénea, con una tendencia creciente, relacionada principalmente con la resistencia a fluoroquinolonas, aminopenicilinas y aminoglucósidos en *E. coli* y *K. pneumoniae/oxytoca*, y resistencia a carbapenem en *P. aeruginosa* ("Antibiotic-resistance surveillance and use of systemic antibiotics in Emilia-Romagna" Dossier 173/2009, Agenzia sanitaria e sociale regionale dell'Emilia-Romagna). Recientemente, el aumento de la incidencia de bacterias Gram negativas de amplio espectro productoras de beta lactamasa ha despertado un notable interés por las consecuencias epidemiológicas/microbiológicas y por la importancia en la terapia (del Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA). ECDC/EMA Joint Technical Report - The bacterial challenge: time to react. Estocolmo, 2009).

Además, en el campo de la veterinaria hay aspectos que suscitan una cierta preocupación (Carattoli A y otros 2005; Busani C. y otros 2004). En un informe publicado por EFSA en 2007 (de "Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008", publicado el 26 de abril de 2010) se establece que algunas entre las bacterias zoonóticas más comunes provenientes de animales y alimentos en la EU, han desarrollado resistencia antimicrobiana. En particular, entre las bacterias probadas, se observó con frecuencia resistencia a ampicilina, sulfonamida y tetraciclina y, en diferentes países, se informó resistencia a fluoroquinolonas, macrólidos o cefalosporinas de tercera generación (antibióticos que también son importantes en el tratamiento de enfermedades infecciosas humanas) (Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008", publicado el 26 de abril de 2010). Tales preocupaciones se relacionan con la observación de altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas en cepas de *Salmonella* aisladas de aves de corral y en cepas de *Campylobacter* aisladas de aves de corral, reses y cerdos destinados al consumo, y con la importancia que algunos de estos antibióticos tienen en el tratamiento de enfermedades infecciosas humanas.

Los organismos vivos se defienden de la invasión de agentes extraños a través de dos tipos de respuestas: una inmunidad denominada "innata o natural" y una "adquirida o específica". La inmunidad innata representa un mecanismo de defensa que existe antes de cualquier contacto con un antígeno. Hace uso de diferentes factores mecánicos y químicos (integridad del epitelio, piel, saliva, secreción gástrica), factores humorales (lisozima, complemento, interferón), células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas, células asesinas naturales (NK) y flora bacteriana comensal.

Los péptidos antimicrobianos representan una vía adicional para la respuesta innata a infecciones microbianas (Hartmann M., y otros 2010, Antimicrob. Agents Chemother. 54:3132-3142). Tienen doble importancia, dado que pueden proteger aproximadamente 80 % de las especies animales y casi todas las plantas, y también desempeñan un papel fundamental en la inmunidad de animales superiores, proporcionando una especie de primera línea de defensa que estimula y coopera activamente con las respuestas inmunitarias adaptativas (Tossi A y Sandri L., Curr. Pharm. Design, 2002 8: 743-761). En animales superiores, representan las moléculas "efectoras" de la inmunidad innata (Boman HG., J Intern Med. 2003 254:197-215).

Los péptidos antimicrobianos muestran un amplio espectro de actividad: exterminan rápidamente las células bacterianas y son activos contra varias cepas resistentes a antibióticos de importancia clínica (Hancock y Chapple, Antimicrob Agents Chemother, 1999 43:1317-1323; Proc Natl Acad Sci USA. 2000 97:8856-886; Zasloff M., Nature, 2002 415:389-395).

Además, se ha demostrado que, para las bacterias, es mucho más difícil volverse resistentes a proteínas con actividad antimicrobiana, dado que esto requeriría un reordenamiento o modificación de la composición lipídica de su membrana, un proceso poco económico y "costoso" para todas las especies microbianas (Zasloff M., Nature, 2002 415:389-395).

La mayoría de los péptidos antimicrobianos actúan mediante la alteración directa de la membrana de las células diana (Thevissen y otros, Mol Plant-Microbe Interact. 2000, 13:54-61). Las membranas bacterianas son ricas en fosfolípidos aniónicos, tales como fosfatidilserina y fosfatidilglicerol: esto determina una interacción electrostática del péptido cargado positivamente con la propia membrana, que es la base del efecto de perturbación posterior de la bicapa.

En el caso de las bacterias Gram negativas, se ha observado que el péptido interactúa primero con las moléculas de lipopolisacáridos aniónicos de la membrana externa, y después es capaz de hacerla permeable o de ser capturado en su interior. En el caso de las bacterias Gram positivas, en lugar de esto, probablemente el péptido es atraído por ácidos teicoicos y teicurónicos y por otros grupos aniónicos que se encuentran en el exterior en la capa de peptidoglicanos. La composición diferente de las membranas, de hecho, es la base de la selectividad que algunos de estos péptidos tienen por las células bacterianas.

Las membranas de células eucariotas se caracterizan por un alto contenido de fosfolípidos zwitteriónicos, tales como fosfatidilcolina, esfingomielina y fosfatidiletanolamina. Además, son ricas en colesterol, que está ausente en bacterias, el cual parece inhibir la acción de tales péptidos lo que confiere a las membranas una cierta resistencia (Zasloff M., Nature, 2002 415:389-395).

Otro factor de selectividad importante es el valor del potencial de membrana: un potencial más negativo en el interior de la célula, típico de células bacterianas (100-150 mV), facilita la interacción del péptido con la capa lipídica (Bechinger B. J Membr Biol. 1997 156:197-211).

Se han propuesto dos mecanismos generales principales para explicar el efecto después de la interacción de los péptidos con la membrana citoplasmática:

- un efecto "detergente", donde la estructura anfipática de tales moléculas interactúa con la bicapa lipídica, lo que interrumpe su organización y determina el escape de los componentes citoplasmáticos;

5 - la formación de canales, debido a la agregación de monómeros del péptido en la bicapa lipídica (Le Guerneve C y otros, Archives of Biochemistry and Biophysics 1998 360: 179-186) y se describe en el modelo de Shai-Matsuzaki-Huang (Zasloff M., Nature, 2002 415:389-395).

10 Desde 1985, se han identificado una serie de péptidos antimicrobianos, que alcanzaron la cantidad notable de aproximadamente 600 compuestos en 2010. Sin embargo, la mayoría de estos péptidos muestran una o más desventajas que limitan su uso terapéutico potencial (Stein A. y Raoult D., Clin Infect Dis 2002 35:901-902).

15 Por ejemplo, el péptido antimicrobiano polimixina B requiere la ciclización para su estabilización y actividad biológica. Además, este péptido causa nefrotoxicidad, neurotoxicidad e hipertermia cuando se usa a concentraciones terapéuticamente eficientes (Ostronoff y otros, Int. J. Infect. Dis, 2006 10: 339-340).

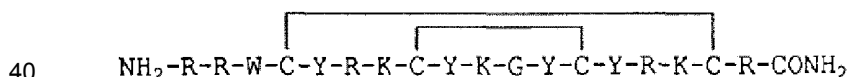
20 Otro ejemplo se proporciona por Temporin L. Es un péptido antimicrobiano aislado de Rana temporaria, tóxico para células eucariotas que comprenden las humanas (Rinaldi y otros, Biochem J. 368: 91-100, 2002). Los péptidos antimicrobianos mieloides bovinos (BMAP) han demostrado toxicidad contra células endoteliales cultivadas y, generalmente, contra casi todas las líneas celulares de la línea hematopoyética (Risso y otros, Cell Immunol., 189: 107-115, 1998). De manera similar, también Bombinin H2, aislado del anuro Bombina orientalis, determina una hemólisis marcada (Csordas A. y Michl H.; Monatsh Chem 101: 182-189, 1970).

25 Los documentos WO 97/02287 A1 y US 2002/147301 A1 se refieren a compuestos basados en parevinas y taquipesinas antimicrobianas, que tienen la secuencia de aminoácidos general siguiente:



30 Los compuestos preferidos son péptidos bicíclicos que se informan en el Ejemplo 1, es decir cis-parevina-1, trans-parevina-1, trans taquitegrina-1. Estos compuestos generalmente mantienen la actividad antimicrobiana de las protegrinas, pero difieren en la conformación debido a la dislocación de los residuos de cisteína en las posiciones 6 y/o 15 de estas protegrinas.

35 Masuda y otros (1992) se refiere a péptidos que tienen actividad antiviral contra HIV tipo 1 in vitro, siendo T22 bicíclico el compuesto candidato más atractivo para la quimioterapia y profilaxis de las infecciones por HIV: T22



Kang y otros (2012) es una reseña sobre péptidos antimicrobianos naturales, que analiza generalmente las propiedades de péptidos de origen natural.

45 Tamamura y otros (1998) describe derivados de polifemusin para el uso como antagonista de CXCR4 y bloqueo de la infección por HIV-1.

50 Por lo tanto, es necesario identificar aquellos péptidos antimicrobianos que tienen actividad biológica alta contra microorganismos, asociados con una toxicidad débil o nula contra células eucariotas, amplio espectro de actividad y estabilidad estructural alta para diferentes aplicaciones clínicas.

55 Además, se ha observado que muchos péptidos con actividad antibacteriana demostrada in vitro, una vez que se prueban en otros medios de cultivo in vitro, o in vivo, pierden la actividad antibacteriana o la mayor parte de esta; tal fenómeno se ha atribuido a la acción de inactivación de péptidos por altas concentraciones de sal, tales como las presentes en diferentes compartimentos del cuerpo humano o en algunos medios de cultivo. Por consiguiente, sería útil además tener grupos o subgrupos de péptidos que, además de tener una actividad antimicrobiana basal útil, también la mantengan en presencia de altas concentraciones de sal, a fin de obtener un efecto antibacteriano consistente in vivo en todos los compartimentos fisiológicos, que incluyen los que contienen altas cantidades de sales.

60 Resumen

65 En respuesta a los inconvenientes mostrados por los antibióticos actualmente en el mercado o disponibles para el tratamiento de infecciones resistentes a antibióticos, un objeto de la presente invención es una serie de péptidos catiónicos cíclicos con actividad antimicrobiana y amplio espectro de actividad.

Los péptidos de la invención como se reivindica en la reivindicación 13 pueden volverse cíclicos por medio de la formación de un puente disulfuro entre dos aminoácidos que contienen azufre, ubicados adecuadamente en proximidad con las regiones -NH<sub>2</sub> terminal y -COOH terminal, adoptando una estructura de hoja plegada beta antiparalela en su forma cíclica. Además, la porción central del péptido se caracteriza por la presencia de un número de aminoácidos cargados, en parte 5 o completamente alternantes con aminoácidos neutros. Más específicamente, los péptidos muestran una secuencia del tipo A-B-C-D-C'-B'-A', donde: las unidades A y A' representan las regiones - NH<sub>2</sub> terminal y -COOH terminal respectivamente; las unidades B y B' consisten en aminoácidos que contienen azufre; las unidades C consisten en 5 aminoácidos seleccionados de: (a) aminoácidos hidrofóbicos y (b) aminoácidos básicos o aminoácidos formadores de enlaces de hidrógeno; la unidad D consiste en glicina y un aminoácido básico. La subestructura C-D-C' se caracteriza por 10 contener de 5 a 9 puntos de alternancia entre aminoácidos del grupo (a) y el grupo (b), o viceversa.

Los péptidos objeto de la presente invención muestran actividad antibacteriana significativa como se reivindica en la reivindicación 1. La estructura en horquilla y lazo del péptido, garantizada por el grupo D en la porción central de la 15 secuencia, se yuxtapone con los dos aminoácidos B que contienen azufre que, en un ambiente adecuado (en aire o condiciones oxidantes), forman un puente disulfuro.

La ciclización de la estructura contribuye a la estabilidad del péptido y la resistencia contra la acción de peptidasas bacterianas. La secuencia citada anteriormente comprende un porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos, a fin de no 20 perturbar las membranas de las células eucariotas, lo que garantiza una toxicidad débil/nula para tales células. Además, la disposición de aminoácidos hidrofóbicos en regiones discretas, separados de aminoácidos cargados, es decir básicos y/o formadores de enlaces de hidrógeno, proporciona a los péptidos mayor eficacia, y posiblemente también mayor insensibilidad a las sales. Tales péptidos, eventualmente, muestran alta solubilidad en solventes acuosos.

La invención también se refiere al uso de dichos péptidos en el tratamiento de infecciones relacionadas con diferentes 25 zonas (por ejemplo, pulmonar, gastrointestinal, urinaria), infecciones cutáneas y enfermedades médicas/quirúrgicas complicadas por superinfecciones bacterianas o fúngicas.

Los péptidos objeto de la presente invención se sintetizan con facilidad, son muy eficientes, estables proteolíticamente, 30 esencialmente insensibles a las sales, no hemolíticos y no citotóxicos para células eucariotas.

El espectro antibacteriano de los péptidos antimicrobianos de la presente invención incluye microorganismos Gram 35 negativos y Gram positivos. Los microorganismos Gram negativos son, por ejemplo, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637: en particular, se observaron LD<sub>90</sub> contra *E. coli* entre 0,83 μM (1,5 pg/ml) y 10,64 μM (19,63 μg/ml) y para *P. aeruginosa* entre 0,87 μM (1,59 μg/ml) y 7,68 μM (16,29 μg/ml); las LD<sub>90</sub> obtenidas contra *Stenotrophomonas maltophilia* varían entre 1,88 μM (3,42 pg/ml) y 2,67 μM. De particular interés son también los resultados obtenidos contra bacterias Gram positivas, como se destaca por la actividad contra cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA ATCC 43300). Para los péptidos probados las LD<sub>90</sub> varían entre 0,85 μM (1,65 pg/ml) y 0,90 μM (1,72 pg/ml). Igualmente, interesantes son los resultados obtenidos contra cepas de *S. aureus* sensibles a meticilina (ATCC 25923), con LD<sub>90</sub> comprendidas entre 1,42 μM (2,89 pg/ml) y 13,4 μM 40 (28,77 pg/ml). Los péptidos de la presente invención demostraron ser eficientes también contra especies de hongos y levaduras, como se destaca por la actividad contra *Candida albicans* ATCC 10231 y *Malassezia pachydermatis* ATCC 14522; los valores de LD<sub>90</sub> obtenidos con diferentes péptidos para ambas especies probadas comprendían entre un valor mínimo de 0,68 μM (1,24 pg/ml) y un valor máximo de 39 μM (aproximadamente 70 μg/ml).

Dichos péptidos pueden usarse eficazmente como agentes primarios o como adyuvantes en el tratamiento de 45 enfermedades infecciosas relacionadas con diferentes zonas del cuerpo, tanto en seres humanos como en animales. Además, los péptidos objeto de la invención también pueden emplearse en el tratamiento de infecciones de organismos vegetales.

#### 50 Descripción de las figuras

Figura-1: Representación esquemática de la estructura de los péptidos. A: evidencia del enlace disulfuro; B: potencial electrostático; C: (1)=zona cargada; (2)=zona hidrofóbica.

Figura 2a: curva de permeabilización de la membrana de *E. coli* ML35p por los péptidos descritos en el ejemplo 1. El 55 aumento de la densidad óptica es proporcional a la concentración de β-galactosidasa citoplasmática liberada por las bacterias dañadas en el medio de cultivo.

Figura 2b: curva de permeabilización de la membrana de *E. coli* ML35p por los péptidos descritos en el ejemplo 1. El aumento de la densidad óptica es proporcional a la concentración de un derivado cromogénico de la degradación de CENTA por una beta-lactamasa liberada por las bacterias dañadas en el medio de cultivo.

Figura 3: actividad hemolítica de péptidos hacia glóbulos rojos de carnero. La concentración probada es 20 veces la LD<sub>90</sub>. El porcentaje de hemólisis se calculó por análisis de la densidad óptica a 450 nm.

#### Descripción detallada

65 El término "péptido", dentro de la presente invención, se define como una multiplicidad de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Tiene el mismo significado de polipéptido y proteína y puede usarse indistintamente. Los

aminoácidos que forman un polipéptido se identifican en la presente descripción independientemente por su nombre completo, o por sus abreviaturas oficiales internacionales respectivas (código de 1 o 3 letras).

El término "serie", en el presente documento, se define como todas las variantes posibles del péptido de la invención, en donde uno o más aminoácidos de la secuencia peptídica se sustituyen por un aminoácido homólogo de manera que las propiedades de los péptidos se mantienen, incluso si no es necesariamente al mismo nivel. Otra variante puede mostrar mayor o menor actividad y/o un espectro más amplio (por ejemplo, actividad contra una variedad más amplia de microbios), o ser más específica para un microorganismo particular. Preferentemente, las sustituciones conservadoras de aminoácidos se llevan a cabo en uno o más residuos de aminoácidos.

El término "hoja plegada beta" se refiere a la estructura tridimensional del péptido cíclico como se ilustra por ejemplo en la Figura 1; en ella, puede observarse la organización del péptido en hoja plegada beta, donde cada cadena muestra una torsión hacia la derecha (giro) de aproximadamente 30°; tal geometría representa el compromiso entre la optimización de la energía conformacional de las dos cadenas que forman la hoja, y el mantenimiento de la geometría de los enlaces de hidrógeno intracatenarios. En la secuencia citada anteriormente, las unidades A, B, C, D, C', B', A' se unen en el orden A-B-C-D-C'-B'-A' para formar una secuencia lineal; tal secuencia puede volverse cíclica o ciclarse mediante el enlace directo entre las dos unidades B. En dicha estructura, las unidades nombradas con la misma letra no son necesariamente iguales, sino que pueden contener aminoácidos diferentes; en consecuencia, considerando el grupo central D, la invención incluye tanto péptidos simétricos como asimétricos.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un péptido que consiste en una secuencia A-B-C-D-C'-B'-A', en donde: la unidad A consiste en 2 aminoácidos, y la unidad A' consiste en 1 aminoácido, ambas unidades B y B' son Cys, cada unidad C consiste independientemente en 5 aminoácidos, seleccionados tanto del grupo (a) de aminoácidos hidrofóbicos, como del grupo (b) de aminoácidos básicos o aminoácidos formadores de enlaces de hidrógeno; la unidad D es -Arg-Gly-

, en donde:

(i) dichos aminoácidos hidrofóbicos se seleccionan de: Ala, Phe, Ileu, Leu, Pro, Tyr, Trp y Val;

(ii) dichos aminoácidos básicos se seleccionan de: Lys, His, Arg;

(iii) dichos aminoácidos formadores de enlaces de hidrógeno se seleccionan de Asn, Gln, Ser, Thr;

y en donde la subestructura C-D-C' como un todo contiene de 5 a 9 puntos de alternancia entre aminoácido del grupo (a) y aminoácido del grupo (b), o viceversa,

en donde el péptido está en la forma cíclica por medio de la formación de un puente disulfuro entre las dos unidades B, y en donde los aminoácidos hidrofóbicos son entre 30 y 50 % de la cantidad total de aminoácidos del péptido, dicho péptido es para el uso en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias, hongos y/o levaduras.

Las unidades A representan las regiones terminales del péptido: la unidad A se refiere a la región -NH<sub>2</sub> terminal, mientras que la unidad A' se refiere a la región -COOH terminal. La unidad A consiste en 2 aminoácidos, y la unidad A' consiste en 1 aminoácido; el tipo de estos aminoácidos no es determinante, sin embargo, pueden seleccionarse preferentemente de histidina, lisina, glicina, triptófano, alanina, valina.

Las unidades B se encuentran representadas por un aminoácido que contiene azufre, en particular cisteína. Las unidades B están involucradas en la formación del puente disulfuro responsable de la ciclización del péptido. La ciclización puede lograrse en el momento de la síntesis del péptido, o puede producirse posteriormente en presencia de una cantidad adecuada de oxígeno ambiental. La invención incluye la síntesis, formulación y uso terapéutico del péptido tanto en forma lineal como en forma cíclica.

La unidad D se encuentra representada por glicina y un aminoácido básico, preferentemente con la secuencia: aminoácido básico→glicina, en dirección A→A'; en ella, el aminoácido básico es preferentemente arginina. La glicina presente en D, apoyada adecuadamente por arginina, permite la estructura en horquilla y lazo del péptido y, en asociación con las unidades C unidas a ella, una distancia adecuada entre las unidades B que forman el puente disulfuro.

Las unidades C, independientemente, consisten en 5 aminoácidos seleccionados:

a) tanto del grupo de aminoácidos hidrofóbicos,

b) como del grupo de aminoácidos básicos o formadores de enlaces de hidrógeno.

Los aminoácidos hidrofóbicos del grupo (a) se seleccionan de: alanina, fenilalanina, isoleucina, leucina, prolina, tirosina, triptófano y valina. Con referencia a la cantidad total de todos los aminoácidos del péptido, estos representan preferentemente entre 30 y 50 %, con mayor preferencia entre 35 y 45 %, por ejemplo, entre 39 y 43 %.

Los aminoácidos básicos del grupo (b) se seleccionan de: lisina, histidina, arginina.

Los aminoácidos formadores de enlaces de hidrógeno del grupo (b) se seleccionan de asparagina, glutamina, serina, treonina.

En la presente invención, es esencial que cada unidad C contenga tanto aminoácidos del grupo (a) como aminoácidos del grupo (b); como miembros del grupo (b), es posible usar libremente aminoácidos básicos, aminoácidos formadores de enlaces de hidrógeno, o ambos. En una variante preferida, las unidades C contienen, principalmente o totalmente, aminoácidos básicos como miembros del grupo (b).

5 Una característica fundamental de las unidades C es el alto grado de alternancia entre aminoácidos cargados positivamente del grupo (b), y aminoácidos eléctricamente neutros del grupo (a). En particular, la secuencia C-D-C' contiene de 5 a 9 puntos de alternancia entre: (a) aminoácido hidrofóbico y (b) aminoácido básico o formador de puente de hidrógeno, o viceversa. La cantidad de "puntos de alternancia" es igual a la cantidad de enlaces peptídicos que, en la secuencia C-D-C', separan un aminoácido del grupo (a) de un aminoácido del grupo (b) unido directamente a este: por ejemplo la secuencia Ala-His-Ala-Thr-Phe contiene 4 puntos de alternancia, correspondientes a los 4 enlaces peptídicos que se encuentran en la secuencia; por otra parte, una secuencia Lys-Ala-Phe-Lys-Phe contiene solamente 3 puntos de alternancia: porque Ala y Phe pertenecen a la misma clase (a), y por tanto el enlace Ala-Phe no se considera un "punto de alternancia". Para los propósitos de la presente invención, los "puntos de alternancia" también incluyen el enlace entre el aminoácido básico presente en D y el aminoácido de la unidad C unido a este, en caso de que dicho aminoácido sea un aminoácido hidrofóbico; viceversa, los enlaces que involucran a la glicina y a aminoácidos que contienen azufre, no se consideran "puntos de alternancia", independientemente del aminoácido unido a ellos.

20 Por consiguiente, en las unidades C los aminoácidos del tipo (a) y (b) típicamente se alternan entre ellos; sin embargo, esto no excluye la posibilidad de contigüidades limitadas entre aminoácidos del mismo grupo ((a) o (b)), siempre y cuando dicha cantidad de puntos de alternancia en la secuencia C-D-C se satisfaga.

La alternancia de carga lograda en la subestructura C-D-C es ventajosa para la actividad antibacteriana general del péptido.

25 Un subgrupo preferido de péptidos pertenecientes a la familia descrita anteriormente es aquel que contiene un total de 17 aminoácidos, en donde las unidades A y A' consisten independientemente en 1 o 2 aminoácidos, ambas unidades B y B' son Cys, al menos una de las unidades C y C' incluye Lys, todos los aminoácidos en las posiciones 6, 8, 13 (numeradas de A a A') pertenecen a dicho grupo (i) de aminoácidos hidrofóbicos, y los aminoácidos en las posiciones 9 y 10 son Arg y Gly.

30 Un subgrupo más preferido se caracteriza por contener, además de las características enumeradas anteriormente, un aminoácido hidrofóbico especialmente en la posición 11 (siempre con numeración de A a A'). Tal característica ha demostrado ser particularmente útil para aumentar la insensibilidad a las sales del péptido, es decir el mantenimiento de su acción antibacteriana incluso en presencia de altas concentraciones de sal. Esta propiedad es de particular importancia, dado que la actividad membranalítica de los péptidos antimicrobianos se basa generalmente en la interacción electrostática con membranas de bacterias u hongos cargadas negativamente; normalmente, la presencia de iones libres (por ejemplo Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, usualmente presentes en el medio de ensayo o en fluidos fisiológicos/patológicos) enmascara la carga negativa presente en la membrana bacteriana, lo que reduce la eficiencia de unión del péptido y por tanto la eficacia del tratamiento. Los presentes péptidos no se ven influenciados por este fenómeno no deseado, manteniendo una eficacia significativa (especialmente contra bacterias Gram negativas) en presencia de concentraciones iónicas ambientales altas.

40 Todos los aminoácidos presentes en el presente péptido pueden estar presentes independientemente en forma D o L; preferentemente, se encuentran principalmente (es decir por encima de 50 %) o totalmente en la forma L.

45 Otro aspecto preferido de la invención se refiere a péptidos constituidos de al menos 80 %, por ejemplo 90 %, o con mayor preferencia 91-100 %, por ejemplo 100 %, de L-aminoácidos.

50 Otro aspecto preferido de la invención se refiere a péptidos constituidos de al menos 80 %, por ejemplo 90 %, o con mayor preferencia 91-100 %, por ejemplo 100 %, de D-aminoácidos.

Todos los aminoácidos pueden usarse en su estado natural o en forma de sus derivados sintéticos.

55 Un grupo preferido de péptidos es aquel donde:  
- la unidad A (NH<sub>2</sub>- terminal) contiene 2 aminoácidos, y la unidad A' (COOH- terminal) contiene 1 aminoácido,  
- ambas unidades B y B' se encuentran representadas por cisteína.

60 Los péptidos preferidos específicos de acuerdo con la presente invención son el péptido identificado como AMP2041 (sec. con núm. de ident.:1), el péptido identificado como AMP72 (sec. con núm. de ident.:2), y el péptido identificado como AMP126 (sec. con núm. de ident.:3). Otros péptidos útiles para los propósitos de la invención son aquellos que tienen las secuencias sec. con núm. de ident.: 4-54 como se describe en la presente descripción.

65 Igualmente preferidos son los homólogos cercanos de cada una de dichas sec. con núm. de ident.: 4-54, caracterizados porque están modificados por solo un aminoácido en cualquier posición entre la núm. 1 y 17, donde dicha modificación no involucra a los aminoácidos en las posiciones 3, 9, 10, 16; la modificación consiste en sustituir dicho aminoácido con otro aminoácido seleccionado de los 20 aminoácidos naturales; preferentemente, el aminoácido se sustituye con otro

aminoácido perteneciente a la misma categoría, (a) o (b) como se definió anteriormente: por ejemplo, Ala se sustituye con Leu; o Ser se sustituye con Lys o Thr, etc.

5 La presente invención incluye un proceso para la síntesis de dichos péptidos que tienen la estructura A-B-C-D-C'-B'-A' definida anteriormente.

10 Colectivamente, o individualmente, los péptidos de la invención son generalmente péptidos sintéticos sintetizados in vitro con el uso de métodos químicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se preparan con el uso de procedimientos de síntesis en fase sólida, fase líquida, condensación peptídica, o cualquier combinación de las técnicas antes mencionadas. Los aminoácidos que componen los péptidos de la invención pueden ser naturales o sintéticos. Los aminoácidos usados para la síntesis de péptidos pueden ser aminoácidos en donde el  $\alpha$ -amino-terminal está protegido por el grupo inestable en ácidos N- $\alpha$ -t-butiloxicarbonilo (Boc) de acuerdo con el trabajo de Merrifield (J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154, 1963) o por el grupo inestable en bases 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) como se describe en Carpino y Han (J. Org. Chem., 37: 3403-3409, 1972). Los aminoácidos protegidos por Boc o Fmoc pueden obtenerse de diferentes fuentes comerciales, tales como, por ejemplo, Fluka, Sigma-Aldrich Bachem, Advanced Chemtech, Cambridge Biochemical Research.

20 En general, los métodos de síntesis química en fase sólida, de acuerdo con M. Bodansky, Principles of peptide synthesis, (Springer-Verlag, Berlín, 1984) o JM Stewart y JD Young, Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois 1984), consisten en la adición secuencial de uno o más aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento. Generalmente, el grupo amino o carboxilo del primer aminoácido está protegido por un grupo protector óptimo. El primer aminoácido protegido se adhiere a un soporte sólido inerte, por ejemplo, una resina. Después el grupo protector se elimina del residuo unido a la resina y los siguientes aminoácidos (adecuadamente protegidos) se añaden secuencialmente. Después de alcanzar el número de aminoácidos, todos los grupos protectores restantes (y cualquier soporte sólido) se eliminan secuencialmente o simultáneamente, para proporcionar el péptido final.

25 Es posible añadir más de un aminoácido a la vez a la cadena en crecimiento, por ejemplo, mediante el acoplamiento (en condiciones experimentales adecuadas que evitan la formación de racematos debido a la presencia de centros quirales) de un tripéptido protegido con un dipéptido adecuadamente protegido para formar, después de su desprotección, un pentapéptido como se describe, por ejemplo, por Merrifield en G. Barany y RB Merrifield, Peptides: analysis, synthesis, biology, E. y J. Gross Meienhofer eds., vol. 2 (Academic Press, Nueva York, 1980, págs. 3-254).

30 Dichos péptidos pueden sintetizarse por firmas que proporcionan el servicio de síntesis de péptidos por encargo, por ejemplo, pero sin limitarse a, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos), SelleckChem (Houston, TX, Estados Unidos), Invitrogen (Grand Island, NY, Estados Unidos), Abgent (Oxfordshire, OX144RY, Reino Unido).

35 El grado de pureza del compuesto peptídico puede determinarse mediante varios métodos, entre los que se encuentra la identificación de picos de HPLC. Preferentemente, se prefiere un péptido que produce un pico individual de altura y ancho iguales al menos a 75 % del material aplicado en una columna de HPLC. Se prefiere aún más un péptido que produce un pico individual que es al menos 87 %, al menos 90 %, al menos 99 % o incluso 99,5 % del material aplicado en una columna de HPLC.

40 Para garantizar que el péptido obtenido con el uso de una de las técnicas de síntesis antes mencionadas es el péptido deseado para los usos o formulaciones descritas en lo adelante en la presente invención, el análisis de la composición del péptido se lleva a cabo con la ayuda de diferentes métodos analíticos conocidos en la técnica. El análisis de la composición puede llevarse a cabo, por ejemplo, con el uso de espectrometría de masas de alta resolución para determinar el peso molecular del péptido. Alternativamente, el contenido de aminoácidos de un péptido puede confirmarse mediante la hidrólisis del péptido en solución ácida para identificar y cuantificar los componentes de la mezcla con el uso de HPLC, o un analizador de aminoácidos. Igualmente, útiles son los métodos de cromatografía en capa fina, que también pueden usarse para identificar uno o más grupos o residuos constituyentes de un péptido deseado.

45 Otro aspecto preferido, pero no limitante, de los péptidos de la invención se refiere al ángulo polar comprendido entre 90° y 180°, preferentemente entre 91° y 179°, con mayor preferencia entre 104° y 115°. El término "ángulo polar" en el presente documento significa la medida del ángulo formado entre los lados polar y no polar de un péptido formados en una estructura anfipática.

50 Otro aspecto preferido, pero no limitante, de los péptidos de la invención se refiere al índice de Boman comprendido entre -1 y +4. Preferentemente entre -0,5 y +3 y aun con mayor preferencia entre +1 y +2,5, por ejemplo entre +1,1 y +2,0. El término "índice de Boman" en la presente invención significa la suma de las energías para la transferencia de agua a ciclohexano de las cadenas laterales de los aminoácidos individuales que componen los péptidos, dividida por la cantidad total de residuos, de acuerdo con lo descrito por Radzeka y Wolfenden (1988) en "Comparing the polarities of amino acids: side-chain distribution coefficients between vapour phase, cyclohexane, 1-octanol and neutral aqueous solution." (Biochemistry 27:1664-1670). Los valores calculados son negativos pero el signo (+ o -) es el opuesto.

55 Otro aspecto preferido, pero no limitante, de la invención se refiere al porcentaje de solubilidad en agua de los péptidos de la invención, comprendido entre 40 % y 90 %, preferentemente entre 91 % y 97 %, aun con mayor preferencia entre



97,5 % y 100 %, por ejemplo 98 %. El porcentaje estimado de solubilidad se calcula mediante el modelo de solubilidad biparamétrico de Wilkinson-Harris como se describe en Wilkinson DL y Harrison RG (1991) *Bio/Technology* 9, 443-448.

5 Colectivamente o individualmente, los péptidos de la invención se proporcionan con actividad biológica hacia la biota (organismos celulares pertenecientes a los dominios Archea, Bacteria o Eukaryota).

Un aspecto preferido de los péptidos de la invención se refiere a la falta de actividad biológica hacia la biota perteneciente al dominio Eukaryota, preferentemente la biota perteneciente al subreino Eumetazoa, aun con mayor preferencia la biota perteneciente al phylum Chordata.

10 Colectivamente o individualmente, los péptidos de la invención se proporcionan con actividad antimicrobiana para una amplia variedad de patógenos tales como, por ejemplo, bacterias, hongos, levaduras, parásitos, protozoos y virus. Un "agente patógeno" se define generalmente como cualquier organismo (unicelular o pluricelular, o que tiene organización subcelular) que causa una enfermedad en un organismo.

15 Colectivamente o individualmente, los péptidos antimicrobianos de la invención se sintetizan con facilidad, son muy eficientes, estables proteolíticamente, esencialmente insensibles a las sales, no hemolíticos y no citotóxicos.

20 La masa de los péptidos de la invención puede determinarse a través de procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, espectrometría de masas. Esencialmente, esta técnica incluye la ionización de un compuesto y la posterior separación de los iones producidos en base a su propia relación masa/carga. Los espectrómetros de masa tienen diferentes métodos para determinar la relación masa/carga del ión, por ejemplo, el tiempo de vuelo. Esencialmente, los iones provenientes de la fuente se aceleran por un potencial (V) a la misma energía cinética, después se dejan volar a lo largo de un tubo hacia un detector. Si un espectrómetro tiene un tubo de vuelo de una longitud L, el tiempo de vuelo para un ión dado se proporciona por:  $t = (L^2 \cdot m / 2 \cdot z \cdot e \cdot V)$ . A partir de la relación m/z, una función del tiempo de permanencia en el tubo de vuelo, puede calcularse la masa de un ión dado. El tubo de vuelo, no obstante, tiene baja resolución (baja capacidad de discriminar dos iones con m/z similar), para superar esto, la mayoría de los analizadores se proporcionan con un "Reflectrón" es decir un espejo capaz de reflejar los iones y después hacer que el ión recorra dos veces la trayectoria. De esta manera, es posible discriminar entre 2 iones que tienen tiempos de vuelos muy similares en el tubo de vuelo. El uso del "Reflectrón" reduce el intervalo de masa molecular que puede analizarse, que está comprendido entre 200 y 5 000-10 000 Da.

35 La estructura secundaria de péptidos en solución puede analizarse mediante una técnica conocida en la técnica, denominada dicroísmo circular. Forma parte de las espectroscopías quirópticas, es decir aquellas técnicas espectroscópicas que, con el uso de luz polarizada, ponen de manifiesto la actividad óptica de las moléculas de prueba. Los resultados obtenidos mediante esta técnica proporcionan información sobre los porcentajes de estructuras secundarias presentes en polipéptidos. Aunque no es posible establecer la posición en la secuencia, esta técnica puede usarse para un primer tamizaje para la elección del sistema de solventes para el análisis de NMR y como una comprobación de los resultados obtenidos del cálculo computacional.

40 La actividad antimicrobiana de un péptido puede determinarse con el uso de un método conocido en la técnica, por ejemplo, el método de dilución en caldo de cultivo. Esencialmente, este método involucra el cultivo de un microorganismo en un medio líquido hasta que alcanza la fase logarítmica. El péptido de prueba se diluye de manera seriada con medio de cultivo para la bacteria de prueba en los pocillos de una placa de múltiples pocillos. Una concentración óptima del microorganismo se añade a los pocillos que contienen el péptido diluido de manera seriada. La placa se incuba en un termostato a una temperatura de 37 °C durante un tiempo suficiente para que el microorganismo crezca. El crecimiento del microorganismo, evaluado en comparación con un control negativo (microorganismo cultivado en ausencia del péptido), se determina mediante la detección de la absorbancia de la solución que contiene la bacteria, por ejemplo, a 605 nm.

50 Otro método conocido en la técnica para determinar la actividad antimicrobiana de un péptido de la invención es la prueba de difusión en agar. Esencialmente, la prueba se lleva a cabo en agar en placas de 14 cm o 9 cm. Para realizar la inoculación de bacterias en agar, 4-5 colonias cultivadas en medio de aislamiento primario se suspenden en 4-5 ml de Caldo Tríptico Soya (caldo de cultivo de enriquecimiento), se incuba durante 2-6 horas hasta que el cultivo líquido ha alcanzado una opacidad correspondiente a un valor de 0,5 en la escala nefelométrica de McFarland (es decir  $1,5 \times 10^6$  bacterias). La bacteria cuya sensibilidad se ensayará se siembra en la superficie del agar. Posteriormente, en la superficie perfectamente seca del agar, se depositan discos impregnados con péptido con el uso de pinzas estériles y, después de hacer que los discos se adhieran a la superficie, la placa se incuba en un termostato a una temperatura de 37 °C durante 24 horas. El diámetro de las zonas de inhibición permite definir cuál bacteria es resistente, tiene resistencia intermedia o es sensible al péptido.

65 Un método adicional para determinar si un péptido tiene actividad antimicrobiana consiste en comprobar la existencia de un daño a la membrana bacteriana. Este método consiste esencialmente en poner en contacto, en un medio líquido, el microorganismo con un péptido. Se añade al medio líquido, una molécula capaz de atravesar la membrana intacta del microorganismo. Una vez que se introduce, dentro del microorganismo, se digiere para formar un producto que ya no es capaz de atravesar la membrana. El medio en el cual el microorganismo se dispersa, se analiza en cuanto a la presencia

de dicho producto. La presencia de tal producto en el medio en el que se incubaba el microorganismo es un índice del daño a la membrana causado por el péptido y es un índice de la actividad antimicrobiana del péptido. Un ejemplo de una molécula adecuada es calceína AM. La calceína AM se convierte en calceína libre dentro del microorganismo. Normalmente, la calceína libre no es capaz de atravesar la membrana celular del microorganismo y estar presente en el medio de cultivo. Por tanto, la detección de calceína libre en el medio es un índice del daño a la membrana celular del microorganismo, y por tanto de la actividad antimicrobiana del péptido.

Otro método útil para identificar un daño a la membrana bacteriana explota la capacidad de la  $\beta$ -galactosidasa de convertir el sustrato cromogénico artificial orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) en glucosa y o-nitrofenol. Este método descrito por primera vez por Jeffrey Miller en 1972 y publicado en "Experiments in Molecular Genetics" se modificó posteriormente por Zhang y Bremer en 1995 (The Journal of Biological Chemistry, 1995, 270, 11181-11189). Esencialmente, este método consiste en mezclar en un medio líquido adecuado una alícuota de células bacterianas y un agente permeabilizante, por ejemplo, detergentes tales como Tritón-X100 o Tween20, o los péptidos de la invención, que destruyen las membranas bacterianas dejando la enzima  $\beta$ -galactosidasa intacta. Después de un período de incubación adecuado, se añade una solución de ONPG al medio de cultivo. La  $\beta$ -galactosidasa liberada por las bacterias dañadas metaboliza el ONPG, para liberar nitrofenol libre. El nitrofenol, que proporciona al medio un color amarillo, se cuantifica por análisis espectrométrico a 405 nm.

En la presente invención, también se determinó la citotoxicidad de los péptidos, por ejemplo, mediante la determinación de la hemólisis de glóbulos rojos y calificación de los péptidos antimicrobianos en base a su concentración hemolítica mínima. En el presente documento, la MHC10 se define como la concentración de péptido que determina un 10 % de hemólisis, la MHC50 es la concentración de péptido que determina un 50 % de hemólisis y la MHC90 es la concentración de péptido que determina un 90 % de hemólisis. Se seleccionaron los péptidos que a la concentración de 100  $\mu$ g/ml caen en la clase definida como MHC10.

En la presente invención, también se determinó la citotoxicidad de los péptidos contra una línea celular de linfocitos T, por ejemplo, células Jurkat. Las células se cultivaron en presencia y en ausencia de péptidos y el daño a la membrana se evaluó mediante la tinción de viabilidad con azul Tripán.

Un aspecto preferido de la invención se refiere al uso de un péptido que tiene la estructura A-B-C-D-C'-B'-A' definida anteriormente, para fabricar un medicamento útil para el tratamiento de un sujeto afectado por una infección causada por bacterias, hongos y/o levaduras; la invención comprende además el mismo péptido para el uso en el tratamiento de un sujeto afectado por una infección causada por bacterias, hongos y/o levaduras. En una primera variante, el tratamiento se dirige particularmente contra el grupo de bacterias Gram negativas; en una segunda variante, el tratamiento se dirige contra el grupo de bacterias Gram positivas; en una tercera variante, el tratamiento se dirige contra el grupo de hongos y levaduras; en una cuarta variante, el tratamiento se dirige contra microorganismos pertenecientes a más de uno de dichos grupos. El término "tratamiento" se refiere a los efectos de los péptidos de la invención capaces de proporcionar beneficios a pacientes afectados por una enfermedad infecciosa, por ejemplo, una mejoría de las afecciones del paciente o un retraso en la progresión de la enfermedad. En el presente documento, el término "infección", o su sinónimo "enfermedad infecciosa" significa la invasión, colonización y/o multiplicación de un microorganismo dentro de o en otro organismo huésped. El término "infección microbiana" significa una enfermedad infecciosa causada por un agente patógeno, como se definió anteriormente, por ejemplo, una bacteria, un parásito, un protozoo, un virus o un hongo, que comprende levaduras. En el presente documento, el término "sujeto" define cualquier organismo pluricelular, entre los que se encuentra un ser humano, animal, planta o insecto que puede infectarse por un microorganismo. Preferentemente, el sujeto es cualquier organismo animal, por ejemplo, un ser humano o un animal, que puede infectarse por un microorganismo contra el cual un péptido antimicrobiano o una variante de este es activo.

Una bacteria patógena, como se definió anteriormente, puede originarse de una de las especies bacterianas seleccionadas en el grupo que incluye: *Staphylococcus* spp., por ejemplo, *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), *Enterococcus* spp., por ejemplo, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Pseudomonas* spp., por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Mycobacterium* spp., por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*; *Enterobacter* spp.; *Campylobacter*spp.; *Salmonella* spp. (por ejemplo *Salmonella enteritidis* ATCC 13076); *Streptococcus* spp., por ejemplo *Streptococcus* grupo A o B, *Streptococcus pneumoniae*, *Helicobacter* spp., por ejemplo *Helicobacter pylori*; *Neisseria* spp., por ejemplo *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*; *Borrelia burgdorferi*, *Shigella* spp., por ejemplo, *Shigella flexneri*; *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Haemophilus* spp., por ejemplo, *Haemophilus influenzae*; *Francisella tularensis*, *Bacillus* spp., por ejemplo, *Bacillus anthracis*; *Clostridium* spp., *Clostridium botulinum*, *Yersinia* spp., por ejemplo, *Yersinia pestis*; *Treponema* spp.; *Burkholderia* spp.; por ejemplo, *Burkholderia cepacia* ATCC 17759, *B. mallei* y *B. pseudomallei*; *Stenotrophomonas* spp., por ejemplo, *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637.

La actividad biológica de los péptidos de la invención contra microorganismos se determinó, por ejemplo, a través de ensayo de microdilución en caldo de cultivo y recuento de las colonias en una placa. En la presente invención, se determinó la capacidad de los péptidos de reducir o prevenir el crecimiento de las bacterias involucradas en enfermedades infecciosas fundamentalmente de importancia clínica. Por ejemplo, la actividad sobre bacterias Gram negativas se comprobó con referencia a bacteria tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*. En particular, *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram negativa problemática

5 en virtud de su invasividad y resistencia heterogénea a quimioterápicos antibacterianos. Este microorganismo es responsable de infecciones severas y es la causa de la morbilidad severa en sujetos inmunodeprimidos debido a infecciones virales tales como HIV, quimioterapia contra el cáncer o terapias inmunosupresoras. Además, esta bacteria es frecuentemente el agente etiológico de enfermedades infecciosas severas del tracto respiratorio inferior, el tracto urinario, lesiones cutáneas (heridas, úlceras) en población juvenil internada, que incluye sujetos afectados de fibrosis quística, y pacientes hospitalizados. En los últimos años, la incidencia de infecciones por *Pseudomonas*, en la fibrosis quística, ha aumentado drásticamente.

10 *Escherichia coli* es un microorganismo Gram negativo perteneciente a la familia de Enterobacteriaceae, a la que pertenecen bacterias tales como *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella* o *Proteus*. *Escherichia coli* es un agente patógeno importante que causa frecuentemente enfermedades infecciosas del tracto urinario, bacteremias, neumonía adquirida en el hospital y la comunidad y varias enfermedades infecciosas de la cavidad abdominal. La resistencia emergente a quimioterápicos antibacterianos observada en los últimos años en *Escherichia coli* se está volviendo un serio problema de salud. De particular interés es la resistencia relacionada con la producción de beta-lactamasas de amplio espectro que ha hecho a esta bacteria resistente a cefalosporinas y fluoroquinolonas, en particular al ciprofloxacino.

15 *Stenotrophomonas maltophilia* es un bacilo Gram negativo aerobio de amplia distribución en diferentes hábitats naturales, animales o seres humanos. Actualmente, se considera responsable de enfermedades infecciosas adquiridas en el hospital tales como bacteremias, meningitis, infecciones oculares, neumonía, infecciones del tracto urinario, infecciones de tejidos blandos y de la piel. Las enfermedades infecciosas causadas por este microorganismo se consideran generalmente un factor de riesgo en todas las enfermedades en las que se observa una reducción de la respuesta inmunitaria, por ejemplo, en neoplasias, enfermedades respiratorias crónicas, tales como fibrosis quística o enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, y se considera el agente responsable de las endocarditis infecciosas. Estas endocarditis generalmente adquiridas en el hospital se relacionan con la contaminación de catéteres y frecuentemente son fatales debido a la resistencia intrínseca de esta bacteria a los antibióticos comunes.

La actividad sobre bacterias Gram positivas se comprobó con referencia a bacteria tales como *Staphylococcus aureus* y su variante resistente a metilicina.

30 Un patógeno fúngico puede originarse de uno de los hongos (que comprenden levaduras) pertenecientes al grupo que incluye los géneros *Candida* spp. (por ejemplo *C. albicans*), *Epidermophyton* spp., *Exophiala* spp., *Microsporum* spp., *Trichophyton* spp. (por ejemplo *T. rubrum* y *T. interdigitale*), *Tinea* spp., *Aspergillus* spp., *Blastomyces* spp., *Blastoschizomyces* spp., *Coccidioides* spp., *Cryptococcus* spp. (por ejemplo, *Cryptococcus neoformans*), *Histoplasma* spp., *Paracoccidiomyces* spp., *Sporotrix* spp., *Absidia* spp., *Cladophialophoraspp.*, *Fonsecaea* spp., *Phialophora* spp., *Lacazia* spp., *Arthrographis* spp., *Acremonium* spp., *Actinomadura* spp., *Apophysomyces* spp., *Emmonsia* spp., *Basidiobolus* spp., *Beauveria* spp., *Chrysosporium* spp., *Conidiobolus* spp., *Cunninghamella* spp., *Fusarium* spp., *Geotrichum* spp., *Graphium* spp., *Leptosphaeria* spp., *Malassezia* spp. (por ejemplo, *Malassezia furfur*), *Mucor* spp., *Neotestudina* spp., *Nocardia* spp., *Nocardiosis* spp., *Paecilomyces* spp., *Phoma* spp., *Piedraia* spp., *Pneumocystis* spp., *Pseudallescheria* spp., *Pyrenochaeta* spp., *Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces* spp., *Scedosporium* spp., *Scopulariopsis* spp., *Sporobolomyces* spp., *Syncephalastrum* spp., *Trichoderma* spp., *Trichosporon* spp., *Ulocladium* spp., *Ustilago* spp., *Verticillium* spp., *Wangiella* spp.

45 La actividad biológica de los péptidos de la invención contra un hongo o una levadura se determinó, por ejemplo, por ensayo de microdilución en caldo de cultivo y recuento de las colonias en una placa. Por ejemplo, se determinó la capacidad de un péptido aislado o de uno perteneciente a una biblioteca de péptidos de inhibir el crecimiento y/o exterminar los hongos (que comprenden levaduras) pertenecientes a los géneros *Candida* spp. o *Malassezia* spp., por ejemplo, *Candida albicans* o *Malassezia furfur*.

50 *Malassezia*, conocido anteriormente como *Pityrosporum*, es un género de hongos que viven en la piel de varios animales, que incluyen seres humanos, y ocasionalmente causan infecciones oportunistas. Recientemente, gracias al uso de técnicas de biología molecular, se observó que este hongo es el agente patógeno de una serie de dermatitis en seres humanos, que incluyen caspa y dermatitis seborreica (Sugita T, Tajima M, Takashima M, y otros, 2004, "A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects", *Microbiol. Immunol.* 48 (8): 579-83). Además, se descubrió que las erupciones cutáneas observadas en pitiriasis versicolor se deben a la infección por este hongo (Guillot J, Hadina S, Guého E, 2008, "The genus *Malassezia*: old facts and new concepts". *Parasitología* 50 (1-2): 77-9). Los miembros del género *Malassezia* spp., en particular *Malassezia pachydermatis*, son de particular importancia en el campo de la medicina veterinaria. Se desarrolla como un saprófito sobre la piel y en el canal del oído externo de perros y gatos, además de otros mamíferos. Se adapta estrictamente al huésped, tanto que no se encuentra libre en la naturaleza. Es un hongo oportunista que expresa su potencia patogénica solamente en presencia de factores promotores: exceso de humedad, aumento de la secreción de cerumen o sebo, pliegues cutáneos. Constituye uno de los agentes más frecuentes de la otitis externa en el perro. La terapia tópica parece ser la más indicada en el manejo de las infecciones óticas por *Malassezia* spp., donde existe la necesidad de productos multivalentes que tengan simultáneamente actividad fungicida/bactericida.

65 En una variante preferida, pero no limitante, el tratamiento se dirige contra un microorganismo seleccionado en el grupo de *Pseudomonas* spp., *Escherichia* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Burkholderia* spp., *Candida* spp., o *Malassezia* spp.

Colectivamente, o individualmente, los péptidos de la presente invención también pueden ser útiles en el tratamiento de infecciones asociadas generalmente con la piel entre las que se encuentran, sin limitación, úlceras y lesiones, heridas de la piel, cortes o quemaduras.

5

Un aspecto preferido adicional de la invención informa que los péptidos, colectivamente o individualmente, son útiles en el tratamiento de infecciones cutáneas bacterianas o piodermitis.

10

Otro aspecto incluye el uso colectivo o individual de los péptidos de la invención en el tratamiento de enfermedades (clínicas o quirúrgicas) complicadas por superinfecciones bacterianas entre las que se encuentran, sin limitación, infecciones asociadas con las mucosas, infecciones asociadas con el tracto gastrointestinal, el tracto urogenital, infecciones del tracto urinario (por ejemplo, pielonefritis, cistitis, uretritis) o infecciones respiratorias, por ejemplo, fibrosis quística.

15

Los mamíferos, las aves y, en general, otros animales pueden tratarse con los péptidos descritos en la presente invención. Los mamíferos y las aves comprenden, pero no se limitan a, seres humanos, perros, gatos y aves mascotas y ganado de producción, tales como caballos, reses, ovejas, cabras, cerdos, gallinas y pavos y aves de corral.

20

Un segundo aspecto preferido incluye el uso de los péptidos de la invención en el tratamiento de enfermedades infecciosas: infecciones por *Klebsiella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Proteus* y *Colibacilli* de animales de compañía y ganado de producción.

25

Otro aspecto preferido se refiere al tratamiento del muermo en équidos y melioidosis en carnívoros e infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* en animales de compañía y ganado de producción. Un aspecto adicional se refiere al tratamiento de infecciones por *Bordetella* spp., en animales de compañía y ganado de producción; infecciones por *Moraxella* spp.; infecciones por *Francisella* spp., infecciones por *Brucella* spp., infecciones por *Campylobacter* spp., infecciones por *Pasteurella* spp.; infecciones por *Actinobacillus* spp. (actinobacilosis); infecciones por *Haemophilus* spp.; infecciones por *Streptococcus* spp. (entre las que se encuentran mastitis en vacas, moquillo); infecciones por *Staphylococcus* spp. (entre las que se encuentran mastitis, piodermitis, endometritis); infecciones por *Bacillus* spp., entre las que se encuentra el ántrax; infecciones por *Clostridium* spp., entre las que se encuentran tétanos, botulismo y ántrax sintomático; infecciones por *Listeria* spp. (listeriosis); infecciones por *Erysipelothrix* spp., entre las que se encuentra el erisipeloide; infecciones por *Leptospira* spp., *Serpulina* (enteritis necrótica superficial), *Treponema* spp. (sífilis del conejo), *Borrelia* spp. en animales de compañía y ganado de producción.

30

35

Eventualmente, las plantas también pueden tratarse con los péptidos de la invención.

40

La presente invención también se refiere a un péptido que consiste en una secuencia A-B-C-D-C'-B'-A', en donde: la unidad A consiste en 2 aminoácidos, y la unidad A' consiste en 1 aminoácido, ambas unidades B y B' son Cys; cada unidad C consiste independientemente en 5 aminoácidos, seleccionados tanto del grupo (a) de aminoácidos hidrofóbicos, como del grupo (b) de aminoácidos básicos o aminoácidos formadores de enlaces de hidrógeno; la unidad D es -Arg-Gly-

en donde:

(i) dichos aminoácidos hidrofóbicos se seleccionan de: Ala, Phe, Ileu, Leu, Pro, Tyr, Trp y Val;

(ii) dichos aminoácidos básicos se seleccionan de: Lys, His, Arg;

45

(iii) dichos aminoácidos formadores de enlaces de hidrógeno se seleccionan de Asn, Gln, Ser, Thr;

y en donde la subestructura C-D-C' como un todo contiene de 5 a 9 puntos de alternancia entre aminoácido del grupo (a) y aminoácido del grupo (b), o viceversa, en donde el péptido está en la forma cíclica por medio de la formación de un puente disulfuro entre las dos unidades B, y en donde los aminoácidos hidrofóbicos son entre 30 y 50 % de la cantidad total de los aminoácidos del péptido, dicho péptido se selecciona de la sec. con núm. de ident.: 1-54, y los homólogos de cada una de dichas sec. con núm. de ident.: 1-54, caracterizados porque dichos homólogos están modificados por solo un aminoácido en cualquier posición entre la núm. 1 y 17, donde dicha modificación no involucra a los aminoácidos en las posiciones 3, 9, 10, 16, y la modificación consiste en sustituir un aminoácido con otro aminoácido perteneciente al mismo grupo (a) o (b).

50

55

Preferentemente, dicho péptido se selecciona de la sec. con núm. de ident.: 1, sec. con núm. de ident. 2, sec. con núm. de ident. 3.

60

Diferentes formulaciones farmacéuticas que contienen, colectivamente o individualmente, los péptidos de la invención pueden prepararse mediante procedimientos descritos en la técnica y con excipientes conocidos y disponibles con facilidad. Tales formulaciones son parte de la presente invención.

65

En el presente documento, el término "excipiente" significa un compuesto o una mezcla de este óptimo para el uso en una formulación destinada al tratamiento de una enfermedad infecciosa específica o afecciones asociadas con ella. Por ejemplo, un excipiente para el uso en una formulación farmacéutica, generalmente, no debe causar una respuesta adversa en un sujeto. El excipiente, como se describió anteriormente, no debe inhibir significativamente la actividad biológica

relevante del compuesto activo. Por ejemplo, un excipiente no inhibe significativamente la actividad antimicrobiana de un péptido antimicrobiano de la presente invención o una variante de este. Un excipiente puede proporcionar simplemente una actividad tamponante para mantener el compuesto activo a un pH adecuado para ejercer su actividad biológica, por ejemplo, tampón salino de fosfato. Alternativamente o además, el excipiente puede comprender un compuesto, por ejemplo un inhibidor de proteasas, que aumenta la actividad o la vida media del péptido. En otro ejemplo, el excipiente puede incluir o ser en sí mismo una molécula antimicrobiana adicional y/o una molécula antiinflamatoria.

Colectivamente, o individualmente, los péptidos de la invención también pueden formularse como soluciones para la administración oral o como soluciones adecuadas para la administración parenteral, tal como, por ejemplo, por vía intramuscular, subcutánea, intraperitoneal o intravenosa.

Las formulaciones farmacéuticas de los péptidos de la invención pueden estar además en forma de una solución acuosa, una forma seca o una dispersión, o alternativamente en forma de una emulsión, una suspensión, una crema, un bálsamo o un ungüento.

Colectivamente, o individualmente, los péptidos de la presente invención pueden incluirse en suspensiones, soluciones o emulsiones oleosas en vehículos o en agua y pueden contener agentes de suspensión, estabilizantes útiles y/o agentes promotores de la dispersión.

Colectivamente, o individualmente, los péptidos de la presente invención pueden formularse en forma de un polvo, obtenido por aislamiento aséptico de un sólido estéril o por liofilización de una solución a reconstituir en forma de una solución con la ayuda de un vehículo adecuado antes del uso, por ejemplo, agua para preparaciones inyectables.

Colectivamente, o individualmente, los péptidos de la presente invención también pueden administrarse por medio del tracto respiratorio. Para la administración por inhalación o insuflación, la composición puede estar en forma de un polvo seco, por ejemplo, una mezcla de polvo del agente terapéutico y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

Colectivamente, o individualmente, los péptidos de la presente invención pueden administrarse en una solución acuosa en forma de aerosol o por vía de inhalación.

En toda la descripción y las reivindicaciones de esta invención específica, las palabras "comprender" y "contener" y las variaciones de las palabras, por ejemplo "comprende" y "contiene", significan "que comprende, pero sin limitarse a", y no pretenden excluir otras fracciones, aditivos, componentes o etapas completas.

En toda la descripción y las reivindicaciones de esta invención específica, el singular incluye el plural, a menos que el contexto requiera otra cosa. Además, en las partes donde se usa el artículo indefinido, debe entenderse específicamente como pluralidad y singularidad, a menos que el contexto requiera otra cosa.

Con "individualmente" o "individual" se entiende que la invención comprende el péptido antimicrobiano o grupos de péptidos antimicrobianos mencionados, y que, aunque puede ser que los péptidos individuales o grupos de péptidos no se enumeren por separado en este documento, las reivindicaciones que se enumeran más abajo pueden definir tales péptidos o grupos de péptidos de una manera divisible y por separado unos de otros.

Con "colectivamente" o "colectivo" se entiende que la invención incluye cualquier cantidad o combinación de péptidos antimicrobianos o grupos de péptidos antimicrobianos mencionados, y que, con la comprensión de que tales cantidades o combinaciones de péptidos o grupos de péptidos no pueden mencionarse específicamente en el presente documento, las reivindicaciones que se enumeran más abajo pueden definir tales combinaciones o subcombinaciones por separado y de una manera divisible de cualquier otra combinación de péptidos o grupos de péptidos.

La presente invención se describirá en más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

#### Parte experimental

##### Ejemplo 1: Síntesis de péptidos

##### Método

La síntesis de los péptidos se realizó por la compañía SelleckChem, a través de su socio en los Estados Unidos. La síntesis se llevó a cabo mediante técnicas conocidas en la técnica y específicamente mediante síntesis en fase sólida.

##### Resultados

Se sintetizaron 100 péptidos, que tienen una longitud de 17 aminoácidos y un grado de pureza comprendido entre 78 y 90 %. Los péptidos se entregaron en una placa de 96 pocillos que contiene 2-5 mg de péptido liofilizado + 4 frascos criogénicos que contienen los 4 péptidos restantes. El informe técnico adjunto a los péptidos no destacó problemas durante la síntesis. En la Figura 1 se representa esquemáticamente la estructura de los péptidos.

Ejemplo 2: Ensayo de permeabilización de la membrana con el uso de la cepa bacteriana *E. coli* ML-35pYC

Métodos:

5

La cepa ML-35pYC de *E. coli* se usó para el ensayo de la cinética de permeabilización de la membrana realizado con los péptidos de la invención. Esta cepa bacteriana expresa resistencia a ampicilina, expresión constitutiva de beta-galactosidasa citoplasmática, y se encuentra modificada genéticamente con un plásmido para la síntesis de una beta-lactamasa periplasmática. Se añadieron sesenta microlitros (60  $\mu$ l) de suspensión bacteriana de la cepa ML-35pYC de *E. coli* a 60  $\mu$ l de una solución a 15 mM de ONPG o 1,5 mM de CENTA en tampón fosfato. Posteriormente, se añadieron 120  $\mu$ l de los péptidos de prueba para obtener una concentración final de 12,5 pg/ml. La cinética de la reacción se evaluó mediante el registro del valor de absorbancia a 600 nm y 405 nm, para ONPG y CENTA respectivamente, cada 10 min hasta un máximo de 240 min.

15 Resultados

En las Figuras 2A y 2B se informan las curvas de permeabilización con relación a los 3 péptidos probados. Cuando los valores de absorbancia obtenidos con el ensayo con el uso de CENTA u ONPG se representan en un gráfico en función del tiempo, es posible destacar dos comportamientos distintos.

20

Mediante el "ajuste" de los puntos experimentales con la curva logística de 4 parámetros, fue posible determinar el punto de inflexión, es decir el punto donde la curva cambia de dirección, con relación a los 3 péptidos de prueba. No se observó punto de inflexión durante el ensayo con CENTA (punto de inflexión mayor que 500 min). El ensayo con ONPG pone de manifiesto una meseta de absorbancia después de 40 min, y un punto de inflexión a 7,86 y 16,08 min, respectivamente para los péptidos P72 y P2041, mientras que el péptido 126 muestra una tendencia lineal en toda la duración del experimento.

25

Tabla 1: Punto de inflexión obtenido mediante el ajuste de los puntos experimentales con la curva logística de 4 parámetros.

30

Péptido	Punto de inflexión	
	CENTA	ONPG
72	>500 min	7,86 min
126	>500 min	>500 min
2041	>500 min	16,08 min

35

40

Ejemplo 3 Determinación del espectro de actividad y la eficacia de péptidos antimicrobianos en bacterias Gram negativas

Este ejemplo demuestra el espectro de actividad y la eficacia de los péptidos probados contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637. Se determinaron las LD<sub>90</sub> para cada péptido y para cada cepa probada.

45

Métodos:

50 a) Preparación del inóculo bacteriano

Por cada cepa bacteriana, se extrajeron 3-5 colonias morfológicamente similares de cultivos frescos, se inocularon en medio líquido de caldo de infusión cerebro corazón y se incubaron a la temperatura de 37 °C con agitación a 225 r.p.m. durante 3-4 h. Posteriormente, la suspensión bacteriana se centrifugó a 1 000 g durante 20 min y el sedimento así obtenido se resuspendió en tampón fosfato 10 mM. La turbidez se midió en un espectrofotómetro con absorbancia a 600 nm, equivalente en el intervalo de 0,08-0,13 a una concentración de aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/ml. La suspensión bacteriana se diluyó 1:100 en tampón fosfato 10 mM, y dentro de 30 min se inocularon 50 microlitros de la suspensión bacteriana (10<sup>6</sup> UFC/ml) en cada pocillo de la placa de microtitulación, para obtener una concentración bacteriana final de aproximadamente 5 x 10<sup>5</sup> UFC/ml.

60

b) Microdilución seriada

Varios péptidos se probaron en cuanto a su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano en cultivo líquido. Se añadieron cincuenta microlitros de péptido a una concentración comprendida entre aproximadamente 0,2 mM y 50 mM en placas de 96 pocillos de fondo en U que contienen medio de cultivo líquido y una de las siguientes bacterias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637. Después de 2 horas de incubación a 37

65

°C, las bacterias se transfirieron a un medio sólido. Como control de crecimiento, los cultivos bacterianos se cultivaron en ausencia de péptidos.

c) Transferencia a agar

5

La suspensión bacteriana se puso en contacto durante dos horas con diferentes concentraciones del péptido a la temperatura de 37 °C. Después de la incubación, se extrajeron 20 µl de los pocillos de cada dilución y se sembraron en medio sólido, agar McConkey. El inóculo se distribuyó uniformemente en el medio con agar por medio de un asa estéril desechable. Después de la incubación durante 24 h a la temperatura de 37 °C, se realizó el recuento de las colonias bacterianas (UFC).

10

Resultados

15

En la tabla 2, se expresan los valores de LD<sub>90</sub> para los diferentes péptidos. Los péptidos 72, 126 y 2041 resultaron ser activos contra *E. coli* con un valor de LD<sub>90</sub> de 1,69 µg/ml (0,86 µM), 1,86 µg/ml (0,91 µM), 1,57 µg/ml (0,83 µM), respectivamente. Con relación a *P. aeruginosa*, el péptido 126 resulta ser el más eficiente con un valor de LD<sub>90</sub> igual a 0,20 µM (0,4 µg/ml), seguido del péptido 72 con un valor de LD<sub>90</sub> igual a 0,87 µM (1,61 µg/ml). Con relación a *Stenotrophomonas maltophilia*, el péptido 72 resulta ser el más eficiente con un valor de LD<sub>90</sub> de 1,88 µM (3,42 µg/ml) seguido del péptido 2041 con una LD<sub>90</sub> de 2,67 µM.

20

Tabla 2A Actividad antimicrobiana. Valores de LD<sub>90</sub> obtenidos mediante la prueba de microdilución en caldo de cultivo y posterior siembra en placa con agar.

25

Bacterias Gram Negativas:			
	<i>E. Coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. maltophilia</i>
	ATCC 25922	ATCC 27853	ATCC 13637
P72	0,86 µM	0,87 µM	1,88 µM
P126	0,91 µM	0,20 µM	6,65 µM
P2041	0,83 µM	2,14 µM	2,67 µM

30

35

Pruebas adicionales, realizadas a los péptidos de acuerdo con la invención, proporcionaron los siguientes resultados de actividad antibacteriana (MBC µg/ml).

40

Tabla 2b Actividad antimicrobiana. Valores de MBC (µg/ml), obtenidos mediante la prueba de la Tabla 2a. Actividad antimicrobiana. Valores de MBC (µg/ml) obtenidos mediante la prueba de microdilución en caldo de cultivo y posterior siembra en placa con agar.

45

Bacterias Gram Negativas:		
	<i>E.coli</i> ATCC 25922*	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Sec, con núm, de ident.: 1	3,05	2,08
Sec, con núm, de ident.: 2	9,68	2,84
Sec, con núm, de ident.: 3	12,5	4,53
Sec, con núm, de ident.: 4	17,37	1,14
Sec, con núm, de ident.: 5	1,08	1,09
Sec, con núm, de ident.:22	11,72	1,08
Sec, con núm, de ident.: 8	9,26	1,81
Sec, con núm, de ident.: 7	7,81	3,4
Sec, con núm, de ident.: 6	1,81	0,4
Sec, con núm, de ident.: 9	7,56	2,57
Sec, con núm, de ident.: 10	24,6	12,08

50

55

60

65

Las secuencias de referencia, que contienen menos de 5 puntos de alternancia entre los aminoácidos del grupo (a) y (b) en el segmento comprendido entre las dos cisteínas (C),  
P14: AKCRPLHTRGKQSAVCV

P127: FFCGNKRWRGNYQGSK

P195: ANCWTRKIRGWGVSCG

probadas en las mismas condiciones, resultaron inactivas.

5 Ejemplo 4: Determinación del espectro de actividad y la eficacia de péptidos antimicrobianos en bacterias Gram positivas

Este ejemplo demuestra el espectro de actividad y la eficacia de algunos péptidos antimicrobianos contra cepas de *S. aureus* tanto sensibles a meticilina como resistentes a meticilina (MRSA). Se determinó la LD<sub>90</sub> para cada péptido y para cada cepa.

10

Métodos:

a) Preparación del inóculo bacteriano

15

Por cada cepa bacteriana, se extrajeron 3-5 colonias morfológicamente similares de cultivos frescos, se inocularon en medio líquido de caldo de infusión cerebro corazón y se incubaron a la temperatura de 37 °C con agitación a 225 r.p.m. durante 3-4 h. Posteriormente, la suspensión bacteriana se centrifugó a 1 000 g durante 20 min y el sedimento así obtenido se resuspendió en tampón fosfato 10 mM. La turbidez se midió en un espectrofotómetro con absorbancia a 600 nm, equivalente en el intervalo de 0,08-0,13 a una concentración de aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/ml. La suspensión bacteriana se diluyó 1:100 en tampón fosfato 10 mM, y dentro de 30 min, se inocularon 50 microlitros de la suspensión bacteriana (10<sup>6</sup> UFC/ml) en cada pocillo de la placa de microtitulación, para obtener una concentración bacteriana final de aproximadamente 5x10<sup>5</sup> UFC/ml.

20

b) Microdilución seriada

25

Varios péptidos sintéticos se probaron en cuanto a su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Se añadieron cincuenta microlitros de péptido a una concentración comprendida entre aproximadamente 0,2 mM y aproximadamente 50 mM a placas de 96 pocillos de fondo en U que contienen tampón fosfato y una de las siguientes bacterias: *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 resistente a meticilina. Después de 2 horas de incubación a 37 °C, las bacterias se transfirieron a un medio sólido. Como control, los cultivos bacterianos se cultivaron en ausencia de péptido.

30

c) Transferencia a agar

35

La suspensión bacteriana se puso en contacto durante dos horas con diferentes concentraciones del péptido a la temperatura de 37 °C. Después de la incubación, se extrajeron 20 µl de los pocillos de cada dilución y se sembraron en medio sólido, agar Columbia complementado con 5 % de glóbulos rojos bovinos para bacterias Gram positivas. El inóculo se distribuyó uniformemente en el medio con agar por medio de un asa estéril desechable. Después de la incubación durante 24 horas a la temperatura de 37 °C, se realizó el recuento de las colonias bacterianas (UFC).

40

Resultados

En la Tabla 3, se expresan los valores de LD<sub>90</sub> para los diferentes péptidos. Los péptidos 2041 y 72 resultan ser los más eficientes contra *S. aureus* ATCC 25923 con un valor de LD<sub>90</sub> de 1,42 µM (2,89 µg/ml) y 3,39 µM (6,16 µg/ml), respectivamente. Le sigue el péptido 126, con una LD<sub>90</sub> de 4,68 µM (9,54 µg/ml). Particularmente interesantes son los valores de LD<sub>90</sub> obtenidos en el caso de *S. aureus* ATCC 43300 resistente a meticilina. Con relación al péptido 72 se obtuvo una LD<sub>90</sub> igual a 0,90 µM (1,65 µg/ml), mientras que con el péptido 2041 se obtuvo un valor de 0,85 µM (1,72 µg/ml). El péptido 126 tiene una LD<sub>90</sub> igual a aproximadamente 71 µM (100 µg/ml).

45

Tabla 3: Actividad antimicrobiana. Valores de LD<sub>90</sub> obtenidos mediante la prueba de microdilución en caldo de cultivo y posterior siembra en placa con agar.

50

	Bacteria Gram Positiva:	
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	MRSA ATCC 43300
P72	3,39 µM	0,90 µM
P126	4,68 µM	>70 µM
P2041	1,42 µM	0,85 µM

60

Ejemplo 5 Metodología para el ensayo de actividad antimicrobiana de péptidos contra cepas de hongos (levaduras)

Métodos:

65



El inóculo se estableció mediante el cultivo de *Candida albicans* ATCC 10231 y *Malassezia pachydermatis* ATCC 14522 en medio de caldo Czapek-Dox (DIFCO) durante 48-72 h. En el día del ensayo, el cultivo fúngico se centrifugó a 1 700 x g durante 15 min, el sedimento se resuspendió en tampón fosfato y se sometió a agitación mediante el uso de un agitador de vórtice eléctrico para dispersar los agregados de células fúngicas. La suspensión se diluyó hasta alcanzar una densidad óptica igual a una opacidad de 0,5 en la escala turbidimétrica de McFarland, que contiene aproximadamente 1-5 x 10<sup>6</sup> células/ml (Branda J.A., Krantz A. Effect of yeast on automated cell counting. Am J Clin Pathol., 2006:126, 248-254).

a) Microdilución seriada

Los péptidos se probaron en cuanto a su capacidad de inhibir el crecimiento fúngico. Se añadieron cincuenta microlitros de péptido a una concentración comprendida entre aproximadamente 0,2 mM y aproximadamente 50 mM en placas de 96 pocillos de fondo en U que contienen tampón fosfato y uno de los siguientes hongos: *Candida albicans* ATCC 10231 y *Malassezia pachydermatis* ATCC 14522. Después de 2 h de incubación a 37 °C, los hongos se transfirieron al medio sólido agar Sabouraud. Como control, los cultivos fúngicos se cultivaron en ausencia de péptido.

b) Transferencia a agar

La suspensión fúngica se puso en contacto durante dos horas con diferentes concentraciones del péptido a la temperatura de 37 °C. Después de la incubación, se extrajeron 20 µl de los pocillos de cada dilución y se sembraron en el medio sólido agar Sabouraud. El inóculo se distribuyó uniformemente en el medio con agar por medio de un asa estéril desechable. Después de la incubación durante 24 h a la temperatura de 37 °C, se realizó el recuento de las colonias fúngicas (UFC).

Resultados

En la tabla 4, se expresan los valores de LD<sub>90</sub> para los diferentes péptidos. El péptido 72 resultó ser el más eficiente contra ambas especies fúngicas probadas. En particular, contra *Candida albicans* se obtuvo un valor de 1,03 µM (1,87 µg/ml), mientras que contra *Malassezia* spp. se obtuvo 0,68 µM (1,24 µg/ml). Para el péptido 126 las LD<sub>90</sub> variaron entre un mínimo de 0,75 µM y un máximo de aproximadamente 2 µM para ambas especies fúngicas probadas.

Tabla 4: Actividad antimicrobiana. Valores de LD<sub>90</sub> obtenidos mediante la prueba de microdilución en caldo de cultivo y posterior siembra en placa con agar.

	Hongos (levaduras)	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Malassezia pachydermatis</i>
P72	1,03 µM	0,68 µM
P126	1,98 µM	0,75 µM
P2041	1,42 µM	0,85 µM

Ejemplo 6: Citotoxicidad de los péptidos antimicrobianos

Este ejemplo evalúa la citotoxicidad de péptidos antibacterianos mediante la observación y cuantificación de la hemólisis de glóbulos rojos (RBC) de carnero o la presencia de células intensamente coloreadas con la tinción de viabilidad azul Tripán, en presencia y en ausencia de péptido.

Métodos:

(a) Prueba de hemólisis

Los eritrocitos de carnero, extraídos inmediatamente antes de iniciar la prueba, se lavaron en tampón isotónico hasta que el sobrenadante se volvió transparente. Los eritrocitos lavados se incubaron con diferentes concentraciones de péptido durante una hora a temperatura ambiente. Después de este período, los eritrocitos se sedimentaron por centrifugación. El sobrenadante se recolectó y se analizó a 450 nm para la cuantificación de la hemólisis. El control positivo consistía en glóbulos rojos lisados con la adición de 0,1 % de Tritón. Esta muestra sirvió para la determinación de la densidad óptica máxima. El porcentaje de hemólisis se calculó a partir de la relación entre la densidad óptica de la muestra y la del control positivo a 450 nm.

El valor de MHC10 se calculó como la concentración mínima de péptido que induce 10 % de lisis celular.

(b) Citotoxicidad de péptidos contra células Jurkat

La citotoxicidad de los péptidos contra linfocitos T, por ejemplo, células Jurkat, se determinó mediante la siembra de las células a una densidad de aproximadamente 5\*10<sup>5</sup> células/ml en presencia y en ausencia de péptidos e incubación

durante toda la noche a 37 °C en termostato bajo CO<sub>2</sub>. Como control negativo de citotoxicidad, se usó un medio carente del péptido de prueba, mientras que, como control positivo de citotoxicidad, se usó un medio que contiene 0,2 % de Tritón X-100, para lisar completamente las células. La viabilidad celular se determinó posteriormente mediante la adición de 20 µl de azul Tripán en cada pocillo, y mediante la incubación de las células durante 5 min adicionales a 37 °C. El valor de MCC10 se calculó como la concentración mínima de péptido necesaria para inducir 10 % de citotoxicidad.

Resultados

Los datos que se informan en la Figura 3 muestran la actividad hemolítica de los péptidos probados. Todos los péptidos que tienen menos de 10 % de actividad hemolítica a una concentración de 40 µM se consideraron no hemolíticos. Los datos de hemólisis de estos péptidos resultaron ser mejores que los de taquiplesina-1, que indujo 15 % de hemólisis de glóbulos rojos a 40 µM.

Los datos que se presentan en la tabla 5 muestran la citotoxicidad de los péptidos en células Jurkat. Todos los péptidos destacaron una citotoxicidad menor que 7 % a 40 µM, y esto confirma su falta de toxicidad contra células eucariotas. Los datos obtenidos son evidentemente favorables en comparación con los obtenidos con taquiplesina-1, que causó la muerte del 10 % de las células a una concentración de 20 µM.

Tabla 5

	Concentración (µg/ml)	
	100 µg/ml	12,5 µg/ml
P72	6,02	<3%
P126	5,04	<2%
P2041	6,95	<3%

Ejemplo 7: Evaluación de la actividad antimicrobiana en presencia de diferentes concentraciones de sal

Este ejemplo comprueba la capacidad de los péptidos de ejercer una actividad antimicrobiana en presencia de concentraciones escaladas de NaCl.

Métodos:

a) Microdilución seriada

Varios péptidos se probaron en cuanto a su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano en cultivo líquido. Se añadieron cincuenta microlitros de péptido a una concentración entre aproximadamente 0,2 mM y 50 mM en placas de 96 pocillos de fondo en U que contienen tampón fosfato 10 mM complementado con NaCl a 125 o 250 mM y una de las siguientes bacterias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853. Después de 2 horas de incubación a 37 °C, las bacterias se transfirieron a un medio sólido. Como control de crecimiento, los cultivos bacterianos se cultivaron en ausencia de péptidos.

b) Transferencia a agar

La suspensión bacteriana se puso en contacto durante dos horas con diferentes concentraciones del péptido a la temperatura de 37 °C. Después de la incubación, se extrajeron 20 µl de los pocillos de cada dilución y se sembraron en el medio sólido agar McConkey para bacterias Gram negativas y agar Columbia complementado con 5 % de glóbulos rojos bovinos para bacterias Gram positivas. El inóculo se distribuyó uniformemente en el medio con agar por medio de un asa estéril desechable. Después de la incubación durante 24 h a la temperatura de 37 °C, se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC).

Resultados

En la tabla 6A, se informa la actividad antimicrobiana contra *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en presencia de NaCl 10 mM. La actividad se calculó como el porcentaje de inhibición del crecimiento de UFC: para cada péptido se evaluó la cantidad de inhibición a la concentración de 100 y 12,5 µg/ml.

A NaCl 10 mM, los resultados concuerdan con los ya obtenidos anteriormente con la prueba descrita en el ejemplo 3.

Tabla 6A Actividad antimicrobiana (porcentaje en comparación con el control) contra *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de NaCl 10 mM.

5

10 mM	<i>E. Coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
↓Péptido	100 µg/ml*	12,5 µg/ml	100 µg/ml	12,5 µg/ml
72	100	100	100	100
126	100	99.68	100	100
2041	100	100	100	100
*concentración probada del péptido				

15 Tabla 6B. Actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* en presencia de NaCl 125 mM.

20

125 mM	<i>E. Coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
↓Péptido	100	12.5	100	12.5
72	99.42	70.59	100	100
126	100	98.64	99.9	97.1
2041	100	99.95	100	100

25

En la tabla 6B, se informan los datos de actividad con NaCl 125 mM. A esta concentración de sal, el péptido 2041 y el péptido 126 demuestran mantener completamente su actividad antimicrobiana para las dos bacterias Gram negativas. El péptido 72 resulta ser igualmente eficiente a ambas concentraciones para *P. aeruginosa* ATCC 27853.

30 Tabla 6C. Actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* en presencia de NaCl 250 mM.

35

250 mM	<i>E, Coli</i>		<i>P, aeruginosa</i>	
↓Péptido	100	12,5	100	12,5
72	44,64	25,8	80,5	64,28
126	90,6	86,7	98,1	85,2
2041	99,51	67,72	99,83	98,39

40

En la Tabla 6C, se informan los datos de actividad con NaCl 250 mM. Aunque en estas condiciones extremas (concentración que se alcanza solamente en ciertas zonas patológicas tales como por ejemplo fluido pulmonar con fibrosis quística) los diferentes péptidos probados aún retienen una actividad antibacteriana buena/discreta; particularmente interesante es el péptido 2041 que mantiene una actividad excelente contra *P. aeruginosa* ATCC 27853 a ambas concentraciones probadas. También es de interés la actividad antibacteriana mayor que 85 % del péptido 126 a la concentración de 12,5 µg/ml.

50 En experimentos adicionales, se probó la resistencia a la sal de los péptidos P944 y P1188, que contienen un aminoácido no lipófilo en la posición 11. Ambos, si bien tienen una actividad antibacteriana basal muy buena, mostraron una reducción muy fuerte de la misma en presencia de concentraciones crecientes de sal. Los porcentajes de inhibición del crecimiento en dependencia de la concentración de sal presente son los siguientes.

55 *E. Coli*

(i) NaCl 10 mM

P944 100 µg/ml: 99.5

60 P944 12,5 µg/ml:95 %

P1188 100 µg/ml: 100.

P1188 12,5 µg/ml:95,3 %

(ii) NaCl 125 mM

65 P944 100 µg/ml: 38,6 %

P944 12,5 µg/ml: -36.6  
 P1188 100 µg/ml: 52,4 %  
 P1188 12,5 µg/ml: 45.3

5 (iii) NaCl 250 mM

P944 100 µg/ml: 27.  
 P944 12,5 µg/ml: 28.5  
 P1188 100 µg/ml: 38.3  
 P1188 12,5 µg/ml: 25.3

*P. aeruginosa*

15 (i) NaCl 10 mM

P944 100 µg/ml: 99.6  
 P944 12,5 µg/ml: 95,8 %  
 P1188 100 µg/ml: 99.2  
 P1188 12,5 µg/ml: 97.3

20 (ii) NaCl 125 mM

P944 100 µg/ml: 55.6  
 P944 12,5 µg/ml: 46.6  
 P1188 100 µg/ml: 60,3 %  
 P1188 12,5 µg/ml: 55.3

(iii) NaCl 250 mM

30 P944 100 µg/ml: 37,9 %  
 P944 12,5 µg/ml: 35.4  
 P1188 100 µg/ml: 15,3 %  
 P1188 12,5 µg/ml: 10,3 %

35 Listados de secuencias que son parte de la descripción

Sec. con núm. de ident.: 1

40 HIS\*LYS\*CYS\*ALA\*LYS\*ILE\*LYS\*TRP\*ARG\*GLY\*VAL\*HIS\*VAL\*LYS\*TYR\*CYS\*ALA

Sec. con núm. de ident.:2

45 LYS\*GLY\*CYS\*ALA\*LEU\*VAL\*LYS\*VAL\*ARG\*GLY\*LEU\*THR\*LEU\*LYS\*VAL\*CYS\*LYS

Sec. con núm. de ident.:3

50 LYS\*TRP\*CYS\*ARG\*LYS\*TRP\*GLN\*TRP\*ARG\*GLY\*VAL\*LYS\*PHE\*ILE\*LYS\*CYS\*VAL

55 Sec. con núm. de ident.:4

Ala\*Ile\*Cys\*Arg\*Thr\*Trp\*Lys\*Tyr\*Arg\*Gly\*His\*Lys\*Trp\*Lys\*Ala\*Cys\*Lys\*

60 Sec. con núm. de ident.:5

Arg\*Lys\*Cys\*Phe\*Pro\*Tyr\*Arg\*Phe\*Arg\*Gly\*Lys\*Arg\*Phe\*Lys\*Lys\*Cys\*Tyr\*

Sec. con núm. de ident.:6

5 Lys\*Lys\*Cys\*Phe\*Thr\*Trp\*Lys\*Trp\*Arg\*Gly\*Lys\*Asn\*Tyr\*Arg\*Lys  
\*Cys\*Gly\*

Sec. con núm. de ident.:7

10 Arg\*Gly\*Cys\*Trp\*Arg\*Trp\*Lys\*Trp\*Arg\*Gly\*Val\*Trp\*Tyr\*Lys\*Lys\*  
Cys\*Leu\*

Sec. con núm. de ident.:8

15 Gly\*Lys\*Cys\*Trp\*Lys\*Trp\*Lys\*Tyr\*Arg\*Gly\*His\*Tyr\*Trp\*Arg\*Thr\*  
Cys\*Leu\*

Sec. con núm. de ident.:9

20 Lys\*Asn\*Cys\*Leu\*Lys\*Trp\*Lys\*Trp\*Arg\*Gly\*Ile\*Thr\*Tyr\*Arg\*Lys\*  
Cys\*Leu\*

Sec. con núm. de ident.:10

30 Ile\*Arg\*Cys\*Ala\*Thr\*Trp\*Asn\*Tyr\*Arg\*Gly\*His\*Gln\*Trp\*Lys\*Lys\*  
Cys\*Leu\*

Sec. con núm. de ident.: 11

35 Gly\*Asn\*Cys\*Lys\*Val\*Phe\*Gln\*Tyr\*Arg\*Gly\*Lys\*Arg\*Trp\*Ala\*Arg\*  
Cys\*Leu\*

Sec. con núm. de ident.: 12

40 Leu\*Gly\*Cys\*Lys\*Arg\*Phe\*Lys\*Phe\*Arg\*Gly\*Ile\*Thr\*Trp\*Lys\*Gly\*  
Cys\*Ile\*

Sec. con núm. de ident.: 13

50 Leu\*Thr\*Cys\*Arg\*Lys\*Trp\*Tyr\*Tyr\*Arg\*Gly\*Val\*His\*Trp\*Lys\*Val\*  
Cys\*Val\*

Sec. con núm. de ident.:14

55 Ala\*Asn\*Cys\*Lys\*Ile\*Trp\*Asn\*Trp\*Arg\*Gly\*Lys\*Arg\*Tyr\*Lys\*Lys\*  
Cys\*Val\*

Sec. con núm. de ident.:15

60 Ile\*Gly\*Cys\*Leu\*Arg\*Trp\*Arg\*Tyr\*Arg\*Gly\*Val\*Thr\*Trp\*Arg\*Lys\*  
Cys\*Val\*

Sec. con núm. de ident.: 16

Lys\*Asn\*Cys\*Ile\*Lys\*Tyr\*His\*Tyr\*Arg\*Gly\*Ile\*Asn\*Tyr\*Arg\*Ser\*C

5 ys\*Gly\*

Sec. con núm. de ident.:17 Lys\*Lys\*Cys\*Gly\*Ala\*Phe\*Thr\*Tyr\*Arg\*Gly\*Val\*His\*Tyr\*Arg\*Lys\*Cys\*Val\*

10 Sec. con núm. de ident.: 18

Ala\*Val\*Cys\*Gly\*Lys\*Phe\*His\*Trp\*Arg\*Gly\*Val\*Lys\*Tyr\*Arg\*Ile\*C

15 ys\*Lys\*

Sec. con núm. de ident.: 19

Ala\*Lys\*Cys\*Lys\*Ser\*Phe\*Tyr\*Tyr\*Arg\*Gly\*Lys\*Trp\*Phe\*Gly\*Lys\*

20 Cys\*Tyr\*

Sec. con núm. de ident.:20

Lys\*Trp\*Cys\*Arg\*Val\*Phe\*His\*Tyr\*Arg\*Gly\*Asn\*Lys\*Trp\*Lys\*Leu

25 \*Cys\*Tyr\*

Sec. con núm. de ident.:21

Ala\*Trp\*Cys\*Gly\*Ala\*Trp\*Arg\*Tyr\*Arg\*Gly\*Lys\*His\*Tyr\*Ile\*Lys\*C

30 ys\*Arg\*

35 Sec. con núm. de ident.:22

Arg\*Asn\*Cys\*Leu\*Lys\*Trp\*Thr\*Trp\*Arg\*Gly\*Ile\*Thr\*Tyr\*Leu\*Lys\*

40 Cys\*Lys\*

Sec. con núm. de ident.:23

Ala\*Ile\*Cys\*Arg\*Ala\*Tyr\*Lys\*Tyr\*Arg\*Gly\*His\*Lys\*Trp\*Gly\*Ile\*Cy

45 s\*Ala\*

Sec. con núm. de ident.:24

Lys\*Lys\*Cys\*Ala\*Leu\*Trp\*Lys\*Phe\*Arg\*Gly\*His\*Lys\*Trp\*Val\*a\*rg

50 Cys\*Ala\*

Sec. con núm. de ident.:25

Leu\*Leu\*Cys\*Leu\*Lys\*Trp\*Lys\*Tyr\*Arg\*Gly\*His\*Thr\*Tyr\*Arg\*Gly

55 \*Cys\*Leu\*

60 Sec. con núm. de ident.:26

Leu\*Lys\*Cys\*Ile\*Gly\*Trp\*Thr\*Tyr\*Arg\*Gly\*His\*Lys\*Trp\*Arg\*Ser\*

65 Cys\*Phe\*

Sec. con núm. de ident.:27

5 Lys\*Lys\*Cys\*Lys\*Gly\*Tyr\*Trp\*Trp\*Arg\*Gly\*Val\*a\*rgTyr\*Lys\*Ile\*C  
ys\*Lys\*

Sec. con núm. de ident.:28

10 Ala\*Gly\*Cys\*Lys\*Ile\*Tyr\*Arg\*Trp\*Arg\*Gly\*His\*Thr\*Trp\*Lys\*Ile\*Cy  
s\*Gly\*

15 Sec. con núm. de ident.:29

Phe\*Lys\*Cys\*Gly\*Ala\*Trp\*His\*Tyr\*Arg\*Gly\*Asn\*Arg\*Trp\*Val\*Lys\*  
20 Cys\*Leu\*

Sec. con núm. de ident.:30

25 Ile\*Trp\*Cys\*Leu\*Arg\*Trp\*His\*Tyr\*Arg\*Gly\*Lys\*Lys\*Tyr\*Ala\*Val\*C  
ys\*Ala\*

Sec. con núm. de ident.:31

30 Ile\*Arg\*Cys\*Lys\*Lys\*Tyr\*Ser\*Phe\*Arg\*Gly\*Val\*His\*Tyr\*Val\*Ser\*C  
ys\*Ala\*

Sec. con núm. de ident.:32

35 Gly\*Asn\*Cys\*Lys\*Gly\*Tyr\*His\*Trp\*Arg\*Gly\*His\*Lys\*Phe\*Lys\*Leu  
\*Cys\*Leu\*

Sec. con núm. de ident.:33

40 Phe\*Leu\*Cys\*Lys\*Ser\*Trp\*Lys\*Trp\*Arg\*Gly\*Lys\*Tyr\*Tyr\*Ile\*Arg\*  
Cys\*Leu\*

45 Sec. con núm. de ident.:34

Gly\*Leu\*Cys\*Arg\*Leu\*Tyr\*Lys\*Tyr\*Arg\*Gly\*Val\*Lys\*Tyr\*Lys\*Ser\*  
50 Cys\*Leu\*

Sec. con núm. de ident.:35

Lys\*Trp\*Cys\*Ile\*Lys\*Phe\*Ser\*Tyr\*Arg\*Gly\*Ile\*Trp\*Trp\*Lys\*Ala\*C  
55 ys\*Arg\*

60 Sec. con núm. de ident.:36

Leu\*Lys\*Cys\*Gly\*Thr\*Trp\*Arg\*Phe\*Arg\*Gly\*His\*Lys\*Trp\*Lys\*Val\*  
65 Cys\*Tyr\*

Sec. con núm. de ident.:37

Leu\*Lys\*Cys\*Lys\*Val\*Tyr\*Arg\*Phe\*Arg\*Gly\*Ile\*Arg\*Tyr\*Gly\*Lys\*

5 Cys\*Leu\*

Sec. con núm. de ident.:38

Ala\*Phe\*Cys\*Ala\*Lys\*Tyr\*Arg\*Phe\*Arg\*Gly\*Lys\*Arg\*Tyr\*Val\*Gly\*

10 Cys\*Ala\*

Sec. con núm. de ident.:39

Lys\*Asn\*Cys\*Phe\*Lys\*Trp\*Thr\*Tyr\*Arg\*Gly\*His\*Tyr\*Trp\*Lys\*Ser\*

15 Cys\*Ala\*

20 Sec. con núm. de ident.:40

Lys\*Leu\*Cys\*Lys\*Leu\*Tyr\*Thr\*Tyr\*Arg\*Gly\*Lys\*Tyr\*Trp\*Gly\*Lys\*

25 Cys\*Lys\*

Sec. con núm. de ident.:41

Ala\*Lys\*Cys\*Ala\*Arg\*Tyr\*Asn\*Tyr\*Arg\*Gly\*Lys\*Lys\*Trp\*Leu\*Lys\*

30 Cys\*Arg\*

Sec. con núm. de ident.:42

Phe\*Gly\*Cys\*Arg\*Lys\*Phe\*Tyr\*Trp\*Arg\*Gly\*Val\*Lys\*Trp\*Lys\*Val\*

35 Cys\*Ala\*

Sec. con núm. de ident.:43

Gly\*Ile\*Cys\*Lys\*Thr\*Trp\*Asn\*Tyr\*Arg\*Gly\*Lys\*Lys\*Tyr\*Lys\*Ile\*C

40 ys\*Leu\*

45 Sec. con núm. de ident.:44

Arg\*Asn\*Cys\*Ala\*Phe\*Trp\*Lys\*Trp\*Arg\*Gly\*Lys\*Ser\*Tyr\*Ala\*Leu\*

50 Cys\*Lys\*

Sec. con núm. de ident.:45

Lys\*Ile\*Cys\*Ala\*Lys\*Tyr\*Asn\*Trp\*Arg\*Gly\*Lys\*Thr\*Tyr\*Lys\*Ile\*C

55 ys\*Leu\*

Sec. con núm. de ident.:46

Ala\*Ile\*Cys\*Ala\*Arg\*Trp\*Lys\*Trp\*Arg\*Gly\*Ile\*Ser\*Tyr\*Lys\*Arg\*Cy

60 s\*Arg\*

65



Sec. con núm. de ident.:47

Ile\*Phe\*Cys\*Trp\*Gly\*Tyr\*Lys\*Phe\*Arg\*Gly\*Val\*His\*Tyr\*Lys\*Ala\*C  
 5 ys\*Arg\*

Sec. con núm. de ident.:48

Lys\*Thr\*Cys\*Ala\*Lys\*Trp\*Ser\*Tyr\*Arg\*Gly\*Val\*a\*snTyr\*Gly\*Arg\*  
 10 Cys\*Arg\*

Sec. con núm. de ident.:49

Ala\*Lys\*Cys\*Ser\*Val\*Tyr\*Thr\*Trp\*Arg\*Gly\*Asn\*Lys\*Trp\*Arg\*Thr\*  
 15 Cys\*Lys\*

Sec. con núm. de ident.:50

Ile\*Arg\*Cys\*Ala\*Val\*Trp\*Lys\*Tyr\*Arg\*Gly\*Asn\*Lys\*Tyr\*Lys\*Thr\*C  
 25 ys\*Ala\*

Sec. con núm. de ident.:51

Lys\*Leu\*Cys\*Lys\*Thr\*Trp\*Gln\*Trp\*Arg\*Gly\*His\*Thr\*Trp\*Arg\*Thr  
 30 \*Cys\*Ile\*

Sec. con núm. de ident.:52

Lys\*Ile\*Cys\*Gly\*Lys\*Tyr\*His\*Phe\*Arg\*Gly\*Val\*Gln\*Tyr\*Lys\*Ala\*C  
 35 ys\*Lys\*

Sec. con núm. de ident.:53

Lys\*Lys\*Cys\*Lys\*Ala\*Tyr\*Thr\*Phe\*Arg\*Gly\*Val\*Tyr\*Trp\*Lys\*Ala\*  
 40 Cys\*Leu\*

Sec. con núm. de ident.:54

Leu\*Lys\*Cys\*Arg\*Thr\*Trp\*Asn\*Trp\*Arg\*Gly\*Lys\*Lys\*Tyr\*Ala\*Leu  
 45 \*Cys\*Lys\*

50 Listado de secuencias que son parte de la descripción

Sec. con núm. de ident.1:

55 HIS\*LYS\*CYC\*ALA\*LYS\*ILE\*LYS\*TRP\*ARG\*GLY\*VAL\*HIS\*VAL\*LYS\*TYR  
 \*CYS\*ALA

60 Sec. con núm. de ident.2:

LYS\*GLY\*CYC\*ALA\*LEU\*VAL\*LYS\*VAL\*ARG\*GLY\*LEU\*THR\*LEU\*LYS\*V  
 65 AL\*CYC\*LYS

Sec. con núm. de ident.3:

LYS\*TRP\*CYS\*ARG\*LYS\*TRP\*GLN\*TRP\*ARG\*GLY\*VAL\*LYS\*PHE\*ILE\*LY  
 5 S\*CYS\*VAL

Sec. con núm. de ident.4:

Ala\*Ile\*Cys\*Arg\*Thr\*Trp\*Lys\*Tyr\*Arg\*Gly\*His\*Lys\*Trp\*Lys\*Ala\*Cys\*Lys\*

10

Sec. con núm. de ident.5:

Arg\*Lys\*Cys\*Phe\*Pro\*Tyr\*Arg\*Phe\*Arg\*Gly\*Lys\*Arg\*Phe\*Lys\*Lys\*Cys\*Tyr\*

15

SEQ.ID.No:6

Lys\*Lys\*Cys\*Phe\*Thr\*Trp\*Lys\*Trp\*Arg\*Gly\*Lys\*Asn\*Tyr\*Arg\*Lys\*Cys\*Gly\*

20

SEQ.ID.No:7

Arg\*Gly\*Cys\*Trp\*Arg\*Trp\*Lys\*Trp\*Arg\*Gly\*Val\*Trp\*Tyr\*Lys\*Lys\*Cys\*Leu\*

Sec. con núm. de ident.:8

25

Gly\*Lys\*Cys\*Trp\*Lys\*Trp\*Lys\*Tyr\*Arg\*Gly\*His\*Tyr\*Trp\*Arg\*Thr\*Cys\*Leu\*

Sec. con núm. de ident.9:

30

Lys\*Asn\*Cys\*Leu\*Lys\*Trp\*Lys\*Trp\*Arg\*Gly\*Ile\*Thr\*Tyr\*Arg\*Lys\*Cys\*Leu\*

Sec. con núm. de ident.10:

Ile\*Arg\*Cys\*Ala\*Thr\*Trp\*Asn\*Tyr\*Arg\*Gly\*His\*Gln\*Trp\*Lys\*Lys\*Cys\*Leu\*

35

Sec. con núm. de ident.11:

Gly\*Asn\*Cys\*Lys\*Val\*Phe\*Gln\*Tyr\*Arg\*Gly\*Lys\*Arg\*Trp\*Ala\*Arg\*Cys\*Leu\*

40

Sec. con núm. de ident.12:

Leu\*Gly\*Cys\*Lys\*Arg\*Phe\*Lys\*Phe\*Arg\*Gly\*Ile\*Thr\*Trp\*Lys\*Gly\*Cys\*Ile\*

Sec. con núm. de ident.13:

45

Leu\*Thr\*Cys\*Arg\*Lys\*Trp\*Tyr\*Tyr\*Arg\*Gly\*Val\*His\*Trp\*Lys\*Val\*Cys\*Val\*

Sec. con núm. de ident.14:

50

Ala\*Asn\*Cys\*Lys\*Ile\*Trp\*Asn\*Trp\*Arg\*Gly\*Lys\*Arg\*Tyr\*Lys\*Lys\*Cys\*Val\*

Sec. con núm. de ident.15:

Ile\*Gly\*Cys\*Leu\*Arg\*Trp\*Arg\*Tyr\*Arg\*Gly\*Val\*Thr\*Trp\*Arg\*Lys\*Cys\*Val\*

55

Sec. con núm. de ident.: 16

Lys\*Asn\*Cys\*Ile\*Lys\*Tyr\*His\*Tyr\*Arg\*Gly\*Ile\*Asn\*Tyr\*Arg\*Ser\*Cys\*Gly\*

Sec. con núm. de ident.: 17

60

Lys\*Lys\*Cys\*Gly\*Ala\*Phe\*Thr\*Tyr\*Arg\*Gly\*Val\*His\*Tyr\*Arg\*Lys\*Cys\*Val\*

Sec. con núm. de ident.: 18

65

Ala\*Val\*Cys\*Gly\*Lys\*Phe\*His\*Trp\*Arg\*Gly\*Val\*Lys\*Tyr\*Arg\*Ile\*Cys\*Lys\*

- Sec. con núm. de ident.: 19  
 Ala\*Lys\*Cys\*Lys\*Ser\*Phe\*Tyr\*Tyr\*Arg\*Gly\*Lys\*Trp\*Phe\*Gly\*Lys\*Cys\*Tyr\*
- 5 Sec. con núm. de ident.:20  
 Lys\*Trp\*Cys\*Arg\*Val\*Phe\*His\*Tyr\*Arg\*Gly\*Asn\*Lys\*Trp\*Lys\*Leu\*Cys\*Tyr\*
- 10 Sec. con núm. de ident.:21  
 Ala\*Trp\*Cys\*Gly\*Ala\*Trp\*Arg\*Tyr\*Arg\*Gly\*Lys\*His\*Tyr\*Ile\*Lys\*Cys\*Arg\*
- Sec. con núm. de ident.:22  
 15 Arg\*Asn\*Cys\*Leu\*Lys\*Trp\*Thr\*Trp\*Arg\*Gly\*Ile\*Thr\*Tyr\*Leu\*Lys\*Cys\*Lys\*
- Sec. con núm. de ident.:23  
 20 Ala\*Ile\*Cys\*Arg\*Ala\*Tyr\*Lys\*Tyr\*Arg\*Gly\*His\*Lys\*Trp\*Gly\*Ile\*Cys\*Ala\*
- Sec. con núm. de ident.:24  
 Lys\*Lys\*Cys\*Ala\*Leu\*Trp\*Lys\*Phe\*Arg\*Gly\*His\*Lys\*Trp\*Val\*a\*rgCys\*Ala\*
- 25 Sec. con núm. de ident.:25  
 Leu\*Leu\*Cys\*Leu\*Lys\*Trp\*Lys\*Tyr\*Arg\*Gly\*His\*Thr\*Tyr\*Arg\*Gly\*Cys\*Leu\*
- 30 Sec. con núm. de ident.:26  
 Leu\*Lys\*Cys\*Ile\*Gly\*Trp\*Thr\*Tyr\*Arg\*Gly\*His\*Lys\*Trp\*Arg\*Ser\*Cys\*Phe\*
- Sec. con núm. de ident.:27  
 35 Lys\*Lys\*Cys\*Lys\*Gly\*Tyr\*Trp\*Trp\*Arg\*Gly\*Val\*a\*rgTyr\*Lys\*Ile\*Cys\*Lys\*
- Sec. con núm. de ident.:28  
 40 Ala\*Gly\*Cys\*Lys\*Ile\*Tyr\*Arg\*Trp\*Arg\*Gly\*His\*Thr\*Trp\*Lys\*Ile\*Cys\*Gly\*
- Sec. con núm. de ident.:29  
 Phe\*Lys\*Cys\*Gly\*Ala\*Trp\*His\*Tyr\*Arg\*Gly\*Asn\*Arg\*Trp\*Val\*Lys\*Cys\*Leu\*
- 45 Sec. con núm. de ident.:30  
 Ile\*Trp\*Cys\*Leu\*Arg\*Trp\*His\*Tyr\*Arg\*Gly\*Lys\*Lys\*Tyr\*Ala\*Val\*Cys\*Ala\*
- 50 Sec. con núm. de ident.:31  
 Ile\*Arg\*Cys\*Lys\*Lys\*Tyr\*Ser\*Phe\*Arg\*Gly\*Val\*His\*Tyr\*Val\*Ser\*Cys\*Ala\*
- Sec. con núm. de ident.:32  
 55 Gly\*Asn\*Cys\*Lys\*Gly\*Tyr\*His\*Trp\*Arg\*Gly\*His\*Lys\*Phe\*Lys\*Leu\*Cys\*Leu\*
- Sec. con núm. de ident.:33  
 60 Phe\*Leu\*Cys\*Lys\*Ser\*Trp\*Lys\*Trp\*Arg\*Gly\*Lys\*Tyr\*Tyr\*Ile\*Arg\*Cys\*Leu\*
- Sec. con núm. de ident.:34  
 Gly\*Leu\*Cys\*Arg\*Leu\*Tyr\*Lys\*Tyr\*Arg\*Gly\*Val\*Lys\*Tyr\*Lys\*Ser\*Cys\*Leu\*
- 65 Sec. con núm. de ident.:35

- Lys\*Trp\*Cys\*Ile\*Lys\*Phe\*Ser\*Tyr\*Arg\*Gly\*Ile\*Trp\*Trp\*Lys\*Ala\*Cys\*Arg\*  
 Sec. con núm. de ident.:36
- 5 Leu\*Lys\*Cys\*Gly\*Thr\*Trp\*Arg\*Phe\*Arg\*Gly\*His\*Lys\*Trp\*Lys\*Val\*Cys\*Tyr\*  
 Sec. con núm. de ident.:37
- 10 Leu\*Lys\*Cys\*Lys\*Val\*Tyr\*Arg\*Phe\*Arg\*Gly\*Ile\*Arg\*Tyr\*Gly\*Lys\*Cys\*Leu\*  
 Sec. con núm. de ident.:38
- 15 Ala\*Phe\*Cys\*Ala\*Lys\*Tyr\*Arg\*Phe\*Arg\*Gly\*Lys\*Arg\*Tyr\*Val\*Gly\*Cys\*Ala\*  
 Sec. con núm. de ident.:39
- 20 Lys\*Asn\*Cys\*Phe\*Lys\*Trp\*Thr\*Tyr\*Arg\*Gly\*His\*Tyr\*Trp\*Lys\*Ser\*Cys\*Ala\*  
 Sec. con núm. de ident.:40
- 25 Lys\*Leu\*Cys\*Lys\*Leu\*Tyr\*Thr\*Tyr\*Arg\*Gly\*Lys\*Tyr\*Trp\*Gly\*Lys\*Cys\*Lys\*  
 Sec. con núm. de ident.:41
- 30 Ala\*Lys\*Cys\*Ala\*Arg\*Tyr\*Asn\*Tyr\*Arg\*Gly\*Lys\*Lys\*Trp\*Leu\*Lys\*Cys\*Arg\*  
 Sec. con núm. de ident.:42
- 35 Phe\*Gly\*Cys\*Arg\*Lys\*Phe\*Tyr\*Trp\*Arg\*Gly\*Val\*Lys\*Trp\*Lys\*Val\*Cys\*Ala\*  
 Sec. con núm. de ident.:43
- 40 Gly\*Ile\*Cys\*Lys\*Thr\*Trp\*Asn\*Tyr\*Arg\*Gly\*Lys\*Lys\*Tyr\*Lys\*Ile\*Cys\*Leu\*  
 Sec. con núm. de ident.:44
- 45 Arg\*Asn\*Cys\*Ala\*Phe\*Trp\*Lys\*Trp\*Arg\*Gly\*Lys\*Ser\*Tyr\*Ala\*Leu\*Cys\*Lys\*  
 Sec. con núm. de ident.:45
- 50 Lys\*Ile\*Cys\*Ala\*Lys\*Tyr\*Asn\*Trp\*Arg\*Gly\*Lys\*Thr\*Tyr\*Lys\*Ile\*Cys\*Leu\*  
 Sec. con núm. de ident.:46
- 55 Ala\*Ile\*Cys\*Ala\*Arg\*Trp\*Lys\*Trp\*Arg\*Gly\*Ile\*Ser\*Tyr\*Lys\*Arg\*Cys\*Arg\*  
 Sec. con núm. de ident.:47
- 60 Ile\*Phe\*Cys\*Trp\*Gly\*Tyr\*Lys\*Phe\*Arg\*Gly\*Val\*His\*Tyr\*Lys\*Ala\*Cys\*Arg\*  
 Sec. con núm. de ident.:48
- 65 Lys\*Thr\*Cys\*Ala\*Lys\*Trp\*Ser\*Tyr\*Arg\*Gly\*Val\*Asn\*Tyr\*Gly\*Arg\*Cys\*Arg\*  
 Sec. con núm. de ident.:49
- Ala\*Lys\*Cys\*Ser\*Val\*Tyr\*Thr\*Trp\*Arg\*Gly\*Asn\*Lys\*Trp\*Arg\*Thr\*Cys\*Lys\*  
 Sec. con núm. de ident.:50
- 60 Ile\*Arg\*Cys\*Ala\*Val\*Trp\*Lys\*Tyr\*Arg\*Gly\*Asn\*Lys\*Tyr\*Lys\*Thr\*Cys\*Ala\*  
 Sec. con núm. de ident.:51
- 65 Lys\*Leu\*Cys\*Lys\*Thr\*Trp\*Gln\*Trp\*Arg\*Gly\*His\*Thr\*Trp\*Arg\*Thr\*Cys\*Ile\*

Sec. con núm. de ident.:52

Lys\*Ile\*Cys\*Gly\*Lys\*Tyr\*His\*Phe\*Arg\*Gly\*Val\*Gln\*Tyr\*Lys\*Ala\*Cys\*Lys\*

5 Sec. con núm. de ident.:53

Lys\*Lys\*Cys\*Lys\*Ala\*Tyr\*Thr\*Phe\*Arg\*Gly\*Val\*Tyr\*Trp\*Lys\*Ala\*Cys\*Leu\*

10 Sec. con núm. de ident.:54

Leu\*Lys\*Cys\*Arg\*Thr\*Trp\*Asn\*Trp\*Arg\*Gly\*Lys\*Lys\*Tyr\*Ala\*Leu\*Cys\*Ly  
s\*

15

20

25

30

35

## Reivindicaciones

- 5 1. Péptido que consiste en una secuencia A-B-C-D-C'-B'-A', en donde: la unidad A consiste en 2 aminoácidos, y la unidad A' consiste en 1 aminoácido, ambas unidades B y B' son Cys, cada unidad C consiste independientemente en 5 aminoácidos, seleccionados tanto del grupo (a) de aminoácidos hidrofóbicos, como del grupo (b) de aminoácidos básicos o aminoácidos formadores de enlaces de hidrógeno; la unidad D es -Arg-Gly-, en donde:
- 10 (i) dichos aminoácidos hidrofóbicos se seleccionan de: Ala, Phe, Ileu, Leu, Pro, Tyr, Trp y Val;  
(ii) dichos aminoácidos básicos se seleccionan de: Lys, His, Arg;  
(iii) dichos aminoácidos formadores de enlaces de hidrógeno se seleccionan de Asn, Gln, Ser, Thr;
- 15 y en donde la subestructura C-D-C' como un todo contiene de 5 a 9 puntos de alternancia entre aminoácido del grupo (a) y aminoácido del grupo (b), o viceversa, en donde el péptido está en la forma cíclica por medio de la formación de un puente disulfuro entre las dos unidades B, y en donde los aminoácidos hidrofóbicos son entre 30 y 50 % de la cantidad total de aminoácidos del péptido, dicho péptido es para el uso en el tratamiento de infecciones del cuerpo humano o animal causadas por bacterias, hongos y/o levaduras.
- 20 2. Péptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los aminoácidos hidrofóbicos son entre 35 y 45 % de la cantidad total de los aminoácidos del péptido.
- 25 3. Péptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde al menos una de las unidades C y C' comprende Lys.
- 30 4. Péptido para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde ambas unidades C y C' comprenden Lys.
- 35 5. Péptido para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el aminoácido adyacente a Gly de la unidad D es un aminoácido hidrofóbico.
6. Péptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el aminoácido adyacente a Gly de la unidad D es un aminoácido aromático hidrofóbico.
- 40 7. Péptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos una de las unidades C y C' comprende Lys, y todos los aminoácidos en las posiciones 6, 8, 13 (numeradas de A a A') pertenecen a dicho grupo (i) de aminoácidos hidrofóbicos.
- 45 8. Péptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el aminoácido en la posición 11 también pertenece a dicho grupo (i) de aminoácidos hidrofóbicos.
- 50 9. Péptido para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde las unidades A y A' comprenden, independientemente entre sí, uno o más aminoácidos seleccionados de His, Lys, Gly, Tyr, Ala, Val.
- 55 10. Péptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado de las sec. con núm. de ident.: 1-54 y homólogos de cada una de dichas sec. con núm. de ident.: 1-54, caracterizados porque dichos homólogos están modificados por solo un aminoácido en cualquier posición entre la núm. 1 y 17, donde dicha modificación no involucra a los aminoácidos en las posiciones 3, 9, 10, 16, y la modificación consiste en sustituir un aminoácido con otro aminoácido perteneciente al mismo grupo (a) o (b).
- 60 11. Péptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, seleccionado de la sec. con núm. de ident.: 1, sec. con núm. de ident. 2, sec. con núm. de ident. 3.
- 65 12. Péptido para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el tratamiento de infecciones de uno o más de *Staphylococcus* spp., por ejemplo, *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), *Enterococcus* spp., por ejemplo, *Enterococcus faecalis*; *Pseudomonas* spp., por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Mycobacterium* spp., por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*; *Enterobacter* spp.; *Campylobacter* spp.; *Salmonella* spp.; *Streptococcus* spp., por ejemplo *Streptococcus* grupo A o B, *Streptococcus pneumoniae*, *Helicobacter* spp., por ejemplo *Helicobacter pylori*; *Neisseria* spp., por ejemplo *Neisseria gonorrea*, *Neisseria meningitidis*; *Borrelia burgdorferi*, *Shigella* spp., por ejemplo, *Shigella flexneri*; *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Haemophilus* spp. por ejemplo, *Haemophilus influenzae*; *Francisella tularensis*, *Bacillus* spp., por ejemplo, *Bacillus anthracis*; *Clostridia* spp., *Clostridium botulinum*, *Yersinia* spp., por ejemplo, *Yersinia pestis*; *Treponema* spp.; *Burkholderia* spp.; por ejemplo, *Burkholderia cepacia*, *B. mallei* y *B. pseudomallei*; *Stenotrophomonas* spp., por ejemplo, *Stenotrophomonas maltophilia*; *Candida* spp. (por ejemplo *C. albicans*), *Epidermophyton* spp., *Exophiala* spp., *Microsporium* spp., *Trichophyton* spp. (por ejemplo *T. rubrum* y *T.*

interdigitale), *Tinea* spp., *Aspergillus* spp., *Blastomyces* spp., *Blastoschizomyces* spp., *Coccidioides* spp., *Cryptococcus* spp. (por ejemplo *Cryptococcus neoformans*), *Histoplasma* spp., *Paracoccidiomyces* spp., *Sporotrix* spp., *Absidz* spp., *Cladophialophora* spp., *Fonsecaea* spp., *Phialophora* spp., *Lacazia* spp., *Ari rographis* spp., *Acremonium* spp., *Actinomadura* spp., *Apophysomyces* spp., *Emmonsia* spp., *Basidiobolus* spp., *Beauveria* spp., *Chrysosporium* spp., *Conidiobolus* spp., *Cunninghamella* spp., *Fusarium* spp., *Geotrichum* spp., *Graphium* spp., *Leptosphaeria* spp., *Malassezia* spp., (por ejemplo *Malassezia furfur*), *Mucor* spp., *Neotestudina* spp., *Nocardia* spp., *Nocardiosis* spp., *Paecilomyces* spp., *Phoma* spp., *Piedraia* spp., *Pneumocystis* spp., *Pseudallescheria* spp., *Pyrenochaeta* spp., *Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharorra ces* spp., *Scedosporium* spp., *Scopulariopsis* spp., *Sporobolomyces* spp., *Syncephalastrum* spp., *Trichoderma* spp., *Trichosporon* spp., *Ulocladium* spp., *Ustilago* spp., *Verticillium* spp., *Wangiella* spp..

13. Péptido que consiste en una secuencia A-B-C-D-C'-B'-A', en donde: la unidad A consiste en 2 aminoácidos, y la unidad A' consiste en 1 aminoácido, ambas unidades B y B' son Cys; cada unidad C consiste independientemente en 5 aminoácidos, seleccionados tanto del grupo (a) de aminoácidos hidrofóbicos, como del grupo (b) de aminoácidos básicos o aminoácidos formadores de enlaces de hidrógeno; la unidad D es -Arg-Gly-, en donde:

- (i) dichos aminoácidos hidrofóbicos se seleccionan de: Ala, Phe, Ileu, Leu, Pro, Tyr, Trp y Val;  
 (ii) dichos aminoácidos básicos se seleccionan de: Lys, His, Arg;  
 (iii) dichos aminoácidos formadores de enlaces de hidrógeno se seleccionan de Asn, Gln, Ser, Thr;

y en donde la subestructura C-D-C' como un todo contiene de 5 a 9 puntos de alternancia entre aminoácido del grupo (a) y aminoácido del grupo (b), o viceversa, en donde el péptido está en la forma cíclica por medio de la formación de un puente disulfuro entre las dos unidades B, y

en donde los aminoácidos hidrofóbicos son entre 30 y 50 % de la cantidad total de aminoácidos del péptido, dicho péptido se selecciona de las sec. con núm. de ident.: 1-54, y los homólogos de cada una de dichas sec. con núm. de ident.: 1-54, caracterizados porque dichos homólogos están modificados por solo un aminoácido en cualquier posición entre la núm. 1 y 17, donde dicha modificación no involucra a los aminoácidos en las posiciones 3, 9, 10, 16, y la modificación consiste en sustituir un aminoácido con otro aminoácido perteneciente al mismo grupo (a) o (b).

14. Péptido de acuerdo con la reivindicación 13, seleccionado de la sec. con núm. de ident.: 1, sec. con núm. de ident. 2, sec. con núm. de ident. 3.
15. Composición farmacéutica para el uso en seres humanos o animales, que comprende uno o más péptidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12.

**Figure 1**

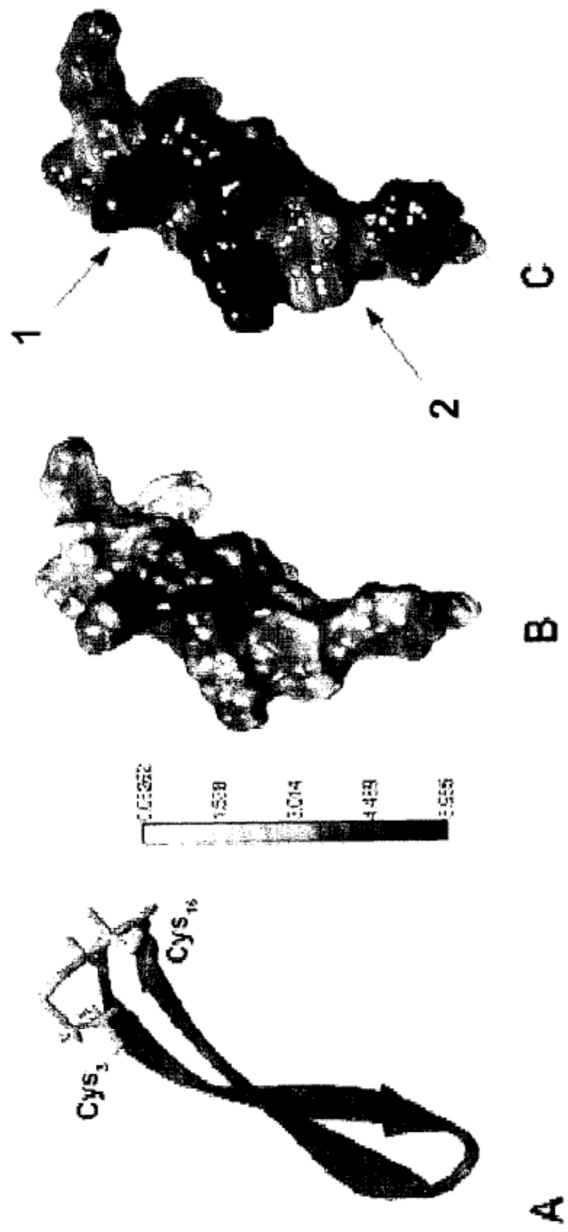
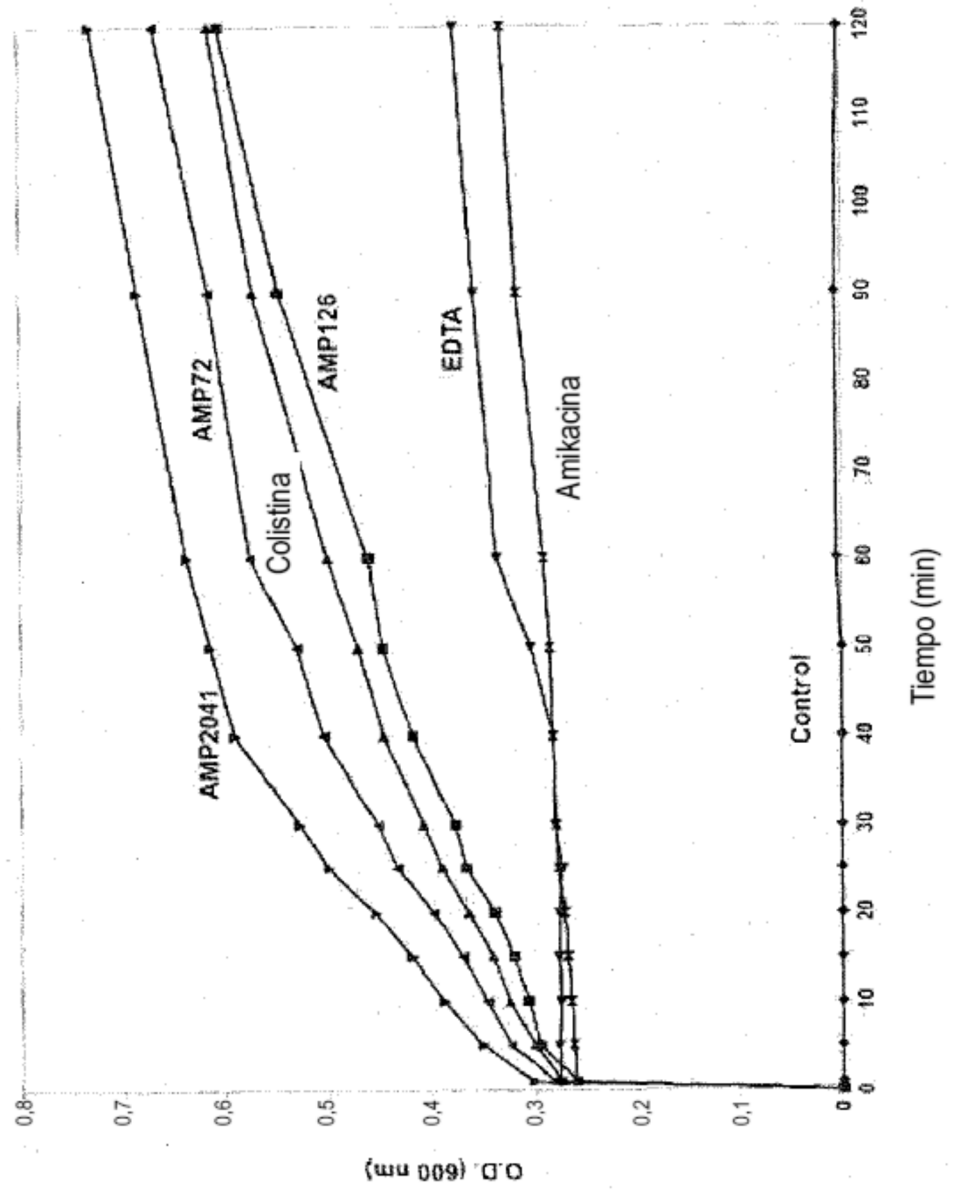




Figura 2a



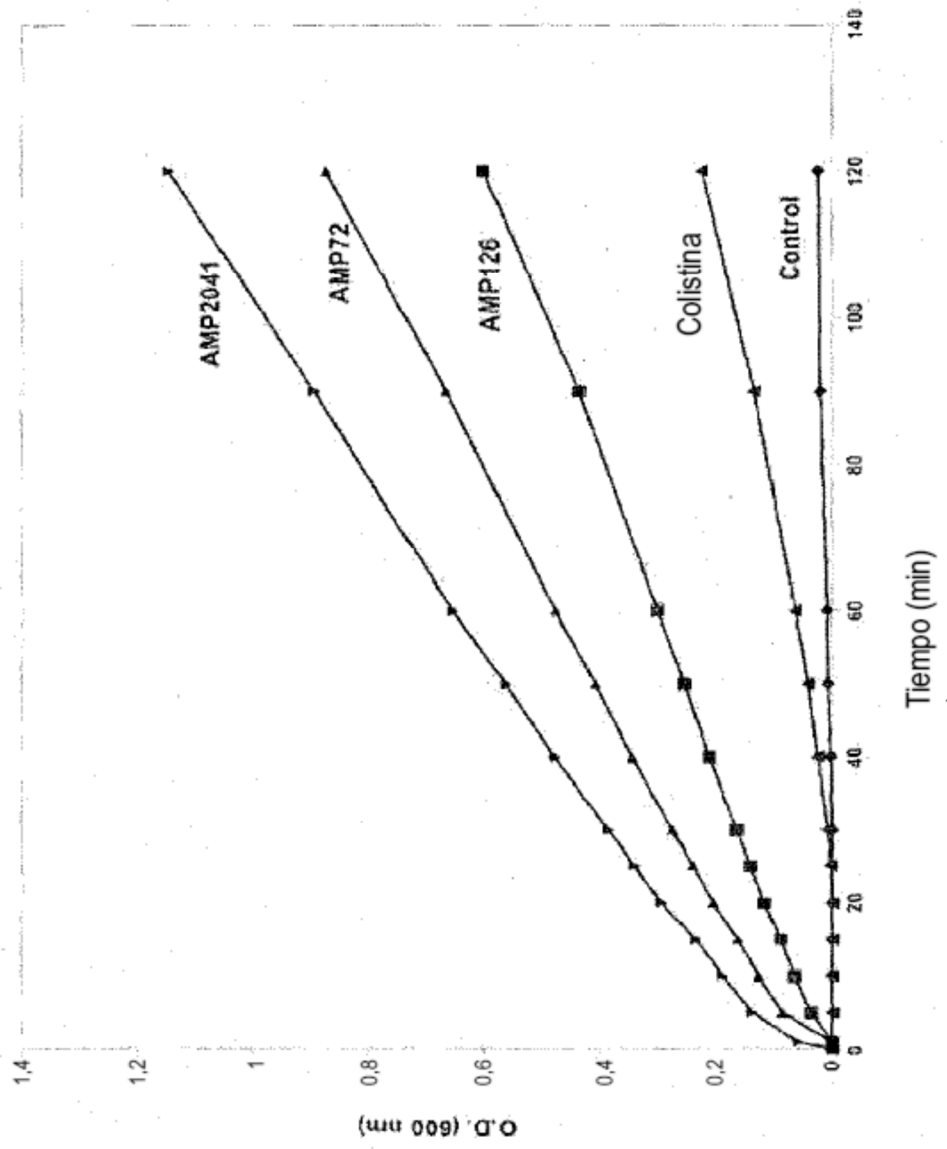


Figura 2b

**Figura 3**

