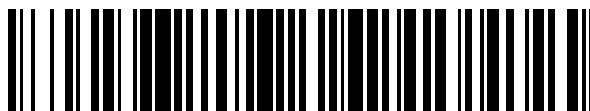


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 323**

51 Int. Cl.:

C07K 14/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2014** **PCT/EP2014/070633**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015** **WO15044356**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2014** **E 14781114 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018** **EP 3049432**

54 Título: **Análogos de temporina-SHa y usos de los mismos**

30 Prioridad:

27.09.2013 EP 13306344

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

26.11.2018

73 Titular/es:

SORBONNE UNIVERSITÉ (50.0%)
21 rue de l'École de Médecine
75006 Paris, FR y
INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE
DEVELOPPEMENT (IRD) (50.0%)

72 Inventor/es:

LADRAM, ALI;
SERENO, DENIS;
FOULON, THIERRY y
OURY, BRUNO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 691 323 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

Análogos de temporina-SHa y usos de los mismos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a péptidos antimicrobianos nuevos, a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos péptidos y al uso de los mismos, en particular como medicamento, desinfectante, conservante, plaguicida o agente de prevención de la formación de biopelículas.

Antecedentes tecnológicos de la invención

10 La evolución y propagación de la resistencia a antibióticos en las bacterias es un problema importante de salud pública en la actualidad, especialmente en el ámbito hospitalario con la aparición de cepas multirresistentes a fármacos. Los intensos esfuerzos en la investigación han conducido al desarrollo de nuevos antibióticos eficaces contra estas cepas resistentes. Sin embargo, a través del uso, surgen mecanismos de resistencia a estos fármacos y limitan su eficacia.

15 En vista de este fenómeno, los péptidos antimicrobianos (AMP) parecen muy prometedores para el diseño de nuevos agentes terapéuticos. Se cree que los péptidos antimicrobianos catiónicos son uno de los componentes clave del sistema inmunitario innato de los organismos multicelulares, que proporcionan la primera línea de defensa contra los patógenos. El interés de estos péptidos reside por una parte en su espectro muy amplio de actividad, lo que permite en particular su uso en el tratamiento de las infecciones provocadas por cepas multirresistentes a fármacos. En segundo lugar, su modo de acción se basa en la permeabilización o fragmentación rápida de la membrana del microorganismo, y por lo tanto es poco probable que conduzcan al desarrollo de mecanismos de resistencia.

20 En particular, los AMP han atraído un interés considerable como agentes potenciales contra las biopelículas bacterianas. Las biopelículas son bacterias que se adhieren entre sí, por lo que forman una comunidad, que se incrusta dentro de una matriz producida por ellas mismas. Las bacterias de las biopelículas muestran una resistencia mucho mayor hacia los antibióticos que sus homólogos independientes, y son responsables de diversas afecciones patológicas que son difíciles de tratar, tales como la infección crónica de pacientes afectados de fibrosis quística, endocarditis, cistitis, infecciones provocadas por dispositivos médicos implantados y la formación de la placa dental implicada en la caries y periodontitis. Debido a que la resistencia de las biopelículas hacia los antibióticos se debe principalmente a la velocidad de crecimiento lento y la actividad metabólica baja de las bacterias de tal comunidad, el uso de AMP parece ser una aproximación terapéutica atractiva porque, debido a su modo de acción, tienen una elevada probabilidad de actuar también sobre las bacterias de crecimiento lento o que aún no están creciendo.

25 Se han identificado péptidos antimicrobianos en vegetales, insectos, anfibios y mamíferos. La piel de los anfibios representa una fuente importante de péptidos antimicrobianos, y cada especie de rana posee su repertorio específico de péptidos, compuesto en general de 10 a 15 AMP.

30 Las ranas de la familia *Ranidae* son muy numerosas, y esta familia cuenta actualmente con 16 géneros y 338 especies. Estas ranas sintetizan y secretan una diversidad notable de AMP, que se han clasificado en 13 familias (Conlon *et al.*, 2008 y 2009). Una de tales familias, las temporinas, comprende AMP de pequeño tamaño (en general entre 10 y 14 residuos) cuyas secuencias varían ampliamente según la especie. Se han identificado más de 100 miembros de la familia de temporinas. Estas temporinas se han aislado de varias especies de *Rana* tales como, por ejemplo, *Rana temporaria* (Simmaco *et al.*, 1996), *Rana esculenta* (Simmaco *et al.*, 1990), *Rana japonica* (Isaacson *et al.*, 2002), *Rana ornativentris* (Kim *et al.*, 2001) y *Pelophylax (Rana) saharica* (Abbassi *et al.*, 2008; Abbassi *et al.*, 2010; Abbassi *et al.*, 2013).

35 A diferencia de las otras 12 familias de péptidos de *Ranidae*, las temporinas carecen del motivo "caja *Rana*", un dominio heptapeptídico C-terminal ciclado mediante un puente disulfuro (Mangoni, 2006). Además, la mayoría de las temporinas contienen un único residuo básico, que confiere una carga neta +2 a pH fisiológico. En general, las temporinas son especialmente activas contra las bacterias Gram-positivas y las levaduras, pero también exhiben propiedades antifúngicas (Rollins-Smith *et al.*, 2003) y, algunas, propiedades antivirales (Chinchar *et al.*, 2004).

40 Se descubrió que la temporina-SHa aislada de la piel de la rana norteafricana *Pelophylax saharica* exhibe una actividad antiparasitaria contra protozoos que pertenecen al género *Leishmania*, que son los agentes causales de la leishmaniosis (Abbassi *et al.*, 2008). Basándose en este descubrimiento, se obtuvieron análogos de dicha temporina que exhibían una actividad antimicrobiana mejorada mediante la sustitución de uno o más aminoácidos de la cara polar de la hélice α por un aminoácido básico (documento WO 2010/106293). Sin embargo, su toxicidad, y en particular su actividad hemolítica, constituyen un obstáculo para su uso terapéutico, en particular si se deben administrar sistemáticamente.

45 Por lo tanto, todavía existe una gran necesidad de péptidos antimicrobianos mejorados que exhiban una actividad antimicrobiana intensa y una toxicidad enormemente reducida contra las células mamíferas.

Sumario de la invención

La invención se dirige a proporcionar nuevos péptidos antimicrobianos, análogos de temporina-SHa que exhiben una actividad antimicrobiana incrementada y una actividad hemolítica reducida.

5 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un péptido de un tamaño comprendido entre 13 y 100 aminoácidos, que exhibe una actividad antimicrobiana y que comprende la secuencia F-L-X₁-G-I-X₂-G-X₃-L-G-K-L-X₄ (SEQ ID N°: 2),

10 en la que X₁ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R, H y K, X₂ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en V, R, H y K, X₃ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en M, R, H y K, y X₄ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F, L, I y W, con la condición de que cuando X₂ es V, X₃ se selecciona del grupo que consiste en K, R y H y/o X₄ se selecciona del grupo que consiste en L, I y W,

y los derivados funcionales y las sales farmacéuticamente aceptables de dicho péptido.

Preferiblemente, X₁ representa K, X₂ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en V y K, X₃ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en M y K, y X₄ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F, L y W.

15 En particular, el péptido se puede seleccionar del grupo que consiste en un péptido que comprende, o que consiste en, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en

F-L-K-G-I-K-G-M-L-G-K-L-F (SEQ ID N°: 3),

F-L-K-G-I-V-G-K-L-G-K-L-F (SEQ ID N°: 4),

F-L-K-G-I-V-G-M-L-G-K-L-L (SEQ ID N°: 5),

20 F-L-K-G-I-V-G-M-L-G-K-L-W (SEQ ID N°: 6),

F-L-K-G-I-V-G-M-L-G-K-L-I (SEQ ID N°: 7)

F-L-K-G-I-K-G-M-L-G-K-L-L (SEQ ID N°: 8),

F-L-K-G-I-K-G-M-L-G-K-L-W (SEQ ID N°: 9),

F-L-K-G-I-K-G-M-L-G-K-L-I (SEQ ID N°: 10),

25 F-L-K-G-I-V-G-K-L-G-K-L-W (SEQ ID N°: 11),

F-L-K-G-I-V-G-K-L-G-K-L-L (SEQ ID N°: 12),

F-L-K-G-I-V-G-K-L-G-K-L-I (SEQ ID N°: 13),

F-L-K-G-I-K-G-K-L-G-K-L-F (SEQ ID N°: 14),

F-L-K-G-I-K-G-K-L-G-K-L-L (SEQ ID N°: 15),

30 F-L-K-G-I-K-G-K-L-G-K-L-W (SEQ ID N°: 16), y

F-L-K-G-I-K-G-K-L-G-K-L-I (SEQ ID N°: 17).

35 Preferiblemente, el péptido comprende, o consiste en, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de SEQ ID N°: 3 a 6, 8, 9, 11, 12 y 14 a 16. Más preferiblemente, el péptido comprende, o consiste en, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de SEQ ID N°: 3 a 6 y 8, y aún más preferiblemente del grupo que consiste en las secuencias de SEQ ID N°: 3, 5 y 6.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica un péptido según la invención, un casete de expresión o un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico. La presente invención se refiere además a una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico, casete de expresión o vector de expresión.

40 La presente descripción también se refiere a un anticuerpo que se une de manera específica a un péptido según la invención.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido según la invención, y un soporte y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

45 La presente invención se refiere además a un péptido según la invención como medicamento. Preferiblemente, el medicamento se destina a tratar una infección provocada por una bacteria, un virus, un hongo o un parásito. Preferiblemente, el parásito pertenece al género *Leishmania*, y preferiblemente es *Leishmania infantum*.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un péptido según la invención como desinfectante, conservante o plaguicida.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un dispositivo médico o implante que comprende un cuerpo que tiene al menos una superficie revestida con o que incluye un péptido según la invención.

- 5 En un aspecto final, la presente invención se refiere a una planta transgénica que comprende un ácido nucleico, un casete o un vector de expresión según la invención, y que es capaz de expresar o que expresa un péptido según la invención.

Breve descripción de los dibujos

10 Figura 1: Proyección de Schiffer-Edmundson de la hélice α de temporina-SHa. Los residuos 4, 11, 7, 3 y 10 constituyen la cara polar de la hélice. Los residuos 8, 1, 12, 5, 9, 2, 13 y 6 constituyen la cara apolar de la hélice.

15 Figura 2: Estructura primaria y propiedades fisicoquímicas de temporina-SHa y análogos. Todos los péptidos están amidados en el extremo C-terminal (a). Las modificaciones (sustitución y delección) de residuos de aminoácidos se indican en negrita con respecto al péptido original de temporina-SHa. Las líneas horizontales en negrita corresponden a delecciones (-). La carga neta se calculó a pH 7,4. La hidrofobicidad media ($\langle H \rangle$) y el momento hidrófobo relativo medio ($\langle \mu H \rangle$) se calcularon con la escala CCS (escala de hidrofobicidad consenso combinada) mediante el uso de HydroMCalc (<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/HydroMCalc/HydroMCalc.html>).

20 Figura 3: Proyección de Schiffer-Edmundson de temporina-SHa y análogos de la invención. Las ruedas helicoidales se dibujaron mediante el uso de HeliQuest (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr>). "N" y "C" representan el extremo N-terminal y el extremo C-terminal, respectivamente. Se muestran los residuos apolares y polares/neutros/cargados y se representan con un tamaño proporcional al volumen del aminoácido. También se (flecha) indica el vector del momento hidrófobo ($\langle \mu H \rangle$). Todos los péptidos adoptan claramente una estructura anfipática con dos agrupamientos bien separados de residuos hidrófobos e hidrófilos/básicos localizados en lados opuestos de la rueda helicoidal.

25 Figura 4: Actividades antimicrobianas y citotóxicas de temporina-SHa y análogos sustituidos o truncados de temporina-SHa. También se indica la actividad contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos (S. *aureus* ATCC 43300 y ATCC BAA-44). ND: no determinado. a: resistente a meticilina y oxacilina. b: resistente a meticilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefalotina, ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, imipenem, oxacilina, penicilina, tetraciclina, ampicilina, doxiciclina, azitromicina, ceftriaxona, clindamicina, lincomicina, perfloxacina, rifampina, y tobramicina.

30 Figura 5: Actividad antimicrobiana y citotóxica de análogos sustituidos de temporina-SHa. ND: no determinado.

Descripción detallada de la invención

35 La temporina-SHa, anteriormente conocida como temporina-1Sa, se aisló de la piel de la rana norteafricana *Pelophylax saharica* (Abbassi *et al.*, 2008). Esta temporina se obtiene mediante la maduración postraduccional de un precursor de 50 residuos (número en la base de datos GenBank: CAO77282). Este precursor tiene un dominio N-terminal muy conservado que contiene el péptido señal y una región rica en residuos ácidos, así como un dominio C-terminal hipervariable que contiene la secuencia progenitora de temporina-SHa. *In vivo*, la forma madura de temporina se obtiene después de i) la escisión proteolítica del doblete KR que precede a la secuencia progenitora, ii) la eliminación del residuo de K C-terminal de la secuencia progenitora mediante la acción de una carboxipeptidasa, y

40 iii) la amidación del residuo C-terminal de temporina mediante el residuo de G C-terminal de la secuencia progenitora que sirve como grupo donante de amida (sustrato de la peptidil-glicina monooxigenasa α -amidante). La proteína madura es un péptido de 13 aminoácidos de longitud y que tiene la secuencia F-L-S-G-I-V-G-M-L-G-K-L-F (SEQ ID N°: 1). Las temporinas están desestructuradas en disolución acuosa, pero adoptan una estructura de hélice α en medios similares a membranas.

45 Dicho péptido exhibe actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, levaduras, y el parásito *Leishmania infantum* (Abbassi *et al.*, 2008). La acción antiparasitaria de la temporina-SHa se da contra las formas de promastigote y amastigote axénico del parásito con una CI_{50} de 18,1 μM y 22,8 μM , respectivamente.

50 El problema principal para optimizar los AMPs es que sus actividades antimicrobianas y sus actividades citolíticas reflejan un equilibrio sutil entre varios parámetros que incluyen la cationicidad, hidrofobicidad, contenido de hélice α y anfipaticidad (Giangaspero *et al.*, 2001; Yeaman *et al.*, 2003; Dennison *et al.*, 2005). Estos parámetros están estrechamente relacionados, y la simple sustitución de un residuo de aminoácido puede inducir la modificación simultánea de varias propiedades fisicoquímicas del péptido (Conlon *et al.*, 2007).

55 En estudios previos, los inventores descubrieron que la sustitución de uno o más aminoácidos de la cara polar de la hélice α de temporina-SHa por un aminoácido básico conduce a análogos de dicha temporina que tienen una actividad antimicrobiana incrementada. En particular, demostraron que la sustitución del residuo 3 de temporina-SHa de SEQ ID N°: 1 por un aminoácido básico, es decir H, R o K, incrementa la actividad contra bacterias Gram+ y

Gram-, levaduras y *Leishmania infantum*.

En la presente memoria han demostrado, de manera sorprendente, que la sustitución adicional de uno o más aminoácidos de la cara apolar de la hélice α de dicho análogo de temporina-SHa reduce enormemente la actividad citolítica a la vez que preserva la actividad antimicrobiana.

5 Definiciones

En la presente memoria, los términos "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se emplean de manera intercambiable y se refieren a una cadena de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, independientemente del número de aminoácidos que forman dicha cadena.

10 En las secuencias peptídicas descritas en la presente memoria, los aminoácidos se representan mediante su código de una letra según la siguiente nomenclatura: C: cisteína; D: ácido aspártico; E: ácido glutámico; F: fenilalanina; G: glicina; H: histidina; I: isoleucina; K: lisina; L: leucina; M: metionina; N: asparagina; P: prolina; Q: glutamina; R: arginina; S: serina; T: treonina; V: valina; W: triptófano, e Y: tirosina.

15 El término "sustitución", tal como se usa en la presente memoria con respecto a una posición o aminoácido, significa que el aminoácido de la posición particular se ha sustituido por otro aminoácido, o que hay presente un aminoácido diferente del que existe en el péptido de tipo natural (SEQ ID N°: 1).

20 La expresión "sustitución conservativa", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a una sustitución de un residuo de aminoácido por otro, que tiene propiedades químicas o físicas similares (tamaño, carga o polaridad). Como ejemplo, isoleucina, leucina, alanina y valina se pueden sustituir mutuamente de manera conservativa, igual que (i) lisina, histidina y arginina o (ii) serina y treonina o (iii) cisteína y metionina o (iv) asparagina y glutamina o (v) triptófano, tirosina y fenilalanina o (vi) ácido aspártico y ácido glutámico.

El término "microbio" o "microbiano", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a bacterias, hongos, levaduras, virus y/o parásitos.

La expresión "infección microbiana", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a una infección provocada por bacterias, hongos, levaduras, virus y/o parásitos.

25 La expresión "actividad antimicrobiana", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a una actividad antibacteriana, antiviral, antifúngica y/o antiparasitaria. Dicha actividad se puede determinar midiendo diferentes parámetros, tales como CI_{50} o CIM.

" CI_{50} " o "concentración inhibitoria semimáxima" es la concentración de una sustancia necesaria para reducir el crecimiento *in vitro* de una población de microorganismos a la mitad.

30 "CIM" o "concentración inhibitoria mínima" es la concentración más baja de una sustancia que inhibirá totalmente el crecimiento microbiano después de 18 horas de incubación, en general a 37 °C, en presencia de dicha sustancia.

35 La expresión "concentración letal, 50%" o " CL_{50} ", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a la concentración de la sustancia necesaria para destruir la mitad de una población. CL_{50} es un indicador cuantitativo de la toxicidad de una sustancia. En particular, CL_{50} se emplea en la presente memoria para determinar la actividad citolítica de un AMP, y en este caso corresponde a la concentración de péptido que induce la lisis de la mitad de la población de células.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un análogo peptídico de temporina-SHa en el que se sustituyen el residuo 3 de la cara polar y los residuos 6, 8 y/o 13 de la cara apolar de la hélice α (véanse las Figuras 1 y 2). En particular, en dicho análogo, se sustituyen los residuos 3, 6 y/o 8 por un aminoácido básico.

40 La presente invención, por lo tanto, se refiere a un análogo peptídico de temporina-SHa que exhibe una actividad antimicrobiana y que comprende, o que consiste en, la secuencia F-L- X_1 -G-I- X_2 -G- X_3 -L-G-K-L- X_4 (SEQ ID N°: 2), en la que X_1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R, H y K, X_2 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en V, R, H y K, X_3 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en M, R, H y K, y X_4 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F, L, I y W, con la condición de que cuando X_2 es V, X_3 se selecciona del grupo que consiste en K, R y H y/o X_4 se selecciona del grupo que consiste en L, I y W, y los derivados funcionales y sales farmacéuticamente aceptables de dicho péptido.

45 En una realización particular, cuando X_1 es K, X_2 es V y X_3 es K, X_4 se selecciona del grupo que consiste en L, I y W, y cuando X_1 es K, X_2 es K y X_3 es M, X_4 se selecciona del grupo que consiste en F, I y W.

50 Preferiblemente, X_1 representa K, X_2 se selecciona del grupo que consiste en V y K, X_3 se selecciona del grupo que consiste en M y K, y X_4 se selecciona del grupo que consiste en F, L y W.

Según una realización, el péptido de la invención comprende, o consiste en, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en

F-L-X₁-G-I-X₂-G-M-L-G-K-L-F (SEQ ID N°: 18),

F-L-X₁-G-I-V-G-X₃-L-G-K-L-F (SEQ ID N°: 19),

F-L-X₁-G-I-V-G-M-L-G-K-L-X₄ (SEQ ID N°: 20),

F-L-X₁-G-I-X₂-G-X₃-L-G-K-L-F (SEQ ID N°: 21),

5 F-L-X₁-G-I-X₂-G-M-L-G-K-L-X₄ (SEQ ID N°: 22),

F-L-X₁-G-I-V-G-X₃-L-G-K-L-X₄ (SEQ ID N°: 23), y

F-L-X₁-G-I-X₂-G-X₃-L-G-K-L-X₄ (SEQ ID N°: 2),

en la que X₁, X₂ y X₃, que son iguales o diferentes, se seleccionan del grupo que consiste en R, H y K, y X₄ se selecciona del grupo que consiste en I, L y W, preferiblemente del grupo que consiste en L y W.

10 En una realización preferida, X₁, X₂ y X₃ representan K en SEQ ID N°s: 2 y 18 a 23. Preferiblemente, X₄ representa L en SEQ ID N°s: 2, 20, 22 y 23.

Según una realización particular, el péptido comprende, o consiste en, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en

F-L-K-G-I-K-G-M-L-G-K-L-F (SEQ ID N°: 3),

15 F-L-K-G-I-V-G-K-L-G-K-L-F (SEQ ID N°: 4),

F-L-K-G-I-V-G-M-L-G-K-L-L (SEQ ID N°: 5),

F-L-K-G-I-V-G-M-L-G-K-L-W (SEQ ID N°: 6),

F-L-K-G-I-V-G-M-L-G-K-L-I (SEQ ID N°: 7)

F-L-K-G-I-K-G-M-L-G-K-L-L (SEQ ID N°: 8),

20 F-L-K-G-I-K-G-M-L-G-K-L-W (SEQ ID N°: 9),

F-L-K-G-I-K-G-M-L-G-K-L-I (SEQ ID N°: 10),

F-L-K-G-I-V-G-K-L-G-K-L-W (SEQ ID N°: 11),

F-L-K-G-I-V-G-K-L-G-K-L-L (SEQ ID N°: 12),

F-L-K-G-I-V-G-K-L-G-K-L-I (SEQ ID N°: 13),

25 F-L-K-G-I-K-G-K-L-G-K-L-F (SEQ ID N°: 14),

F-L-K-G-I-K-G-K-L-G-K-L-L (SEQ ID N°: 15),

F-L-K-G-I-K-G-K-L-G-K-L-W (SEQ ID N°: 16), y

F-L-K-G-I-K-G-K-L-G-K-L-I (SEQ ID N°: 17).

30 Preferiblemente, el péptido comprende, o consiste en, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de SEQ ID N°: 3 a 6, 8, 9, 11, 12 y 14 a 16. Más preferiblemente, el péptido comprende, o consiste en, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de SEQ ID N°: 3 a 6 y 8, y aún más preferiblemente del grupo que consiste en las secuencias de SEQ ID N°: 3, 5 y 6.

35 Según una realización, el péptido tiene un tamaño comprendido entre 13 y 100 aminoácidos, preferiblemente entre 13 y 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos. Según otra realización, el péptido tiene un tamaño comprendido entre 13 y 15, 20 o 25 aminoácidos. En una realización particular, el péptido tiene un tamaño de 13 aminoácidos.

40 El péptido según la invención puede ser un precursor de un péptido antimicrobiano maduro. Dicho precursor experimenta después modificaciones postraduccionales que conducen a la forma madura del AMP. Por tanto, puede comprender una secuencia señal de translocación y sitios de reconocimiento y/o escisión que posibilitan que experimente estas modificaciones postraduccionales. Según una realización particular, el péptido es un precursor de un péptido antimicrobiano maduro y comprende la secuencia F-L-G-T-I-N-L-S-L-C-E-Q-E-R-D-A-D-E-E-R-R-D-E-P-N-E-S-N-V-E-V-E-K-R-F-L-X₁-G-I-X₂-G-X₃-L-G-K-L-X₄-G-K (SEQ ID N°: 24), en la que X₁ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R, H y K, X₂ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en V, R, H y K, X₃ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en M, R, H y K, y X₄ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F, I, L y W, con la condición de que cuando X₂ es V, X₃ se selecciona del

grupo que consiste en K, R y H y/o X₄ se selecciona del grupo que consiste en L, I y W.

Los aminoácidos que constituyen el péptido de la invención pueden estar en la configuración L o D, preferiblemente la configuración L.

5 El péptido según la invención puede tener una modificación postraduccional y/o una modificación química, en particular una glicosilación, una amidación, una acilación, una acetilación o una metilación.

10 Para aumentar la biodisponibilidad del péptido mejorando su resistencia a las peptidasas, se pueden añadir grupos protectores en los extremos C- y/o N-terminales. Por ejemplo, el grupo protector del extremo N-terminal puede ser una acilación o una acetilación, y el grupo protector en el extremo C-terminal puede ser una amidación o una esterificación. Preferiblemente, el péptido de la invención comprende un grupo protector seleccionado del grupo que
 15 consiste en una amidación C-terminal y una acetilación N-terminal, y una combinación de las mismas. También se puede bloquear la acción de las proteasas mediante el uso de aminoácidos de configuración D, ciclación del péptido mediante la formación de puentes disulfuro, anillos de lactama o enlaces entre los extremos C- y N-terminales. El péptido de la invención también puede comprender enlaces pseudopeptídicos que sustituyen a los enlaces peptídicos CONH "clásicos", y que confieren una resistencia incrementada a las peptidasas, tales como CHOH-CH₂, NHCO, CH₂-O, CH₂CH₂, CO-CH₂, N-N, CH=CH, CH₂NH, y CH₂-S. En una realización preferida, el péptido según la invención tiene una amidación en su extremo C-terminal.

20 El péptido según la invención puede comprender uno o más aminoácidos que son aminoácidos infrecuentes, en particular hidroxiprolina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 6-N-metilisina, N-etilglicina, N-metilglicina, N-etilasparagina, alo-isoleucina, N-metilisoleucina, N-metilvalina, piroglutamina, ácido aminobutírico; o aminoácidos sintéticos, en particular ornitina, norleucina, norvalina y ciclohexil-alanina.

25 La invención también abarca derivados funcionales de un péptido según la invención tal como se describió anteriormente. La expresión "derivado funcional", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a péptidos que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos, sustancialmente la misma estructura helicoidal y sustancialmente la misma actividad antimicrobiana. Dichos derivados funcionales pueden ser, por ejemplo, retro-péptidos, péptidos retro-inversos, péptidos que tienen sustituciones conservativas y péptidos cuya cadena lateral de uno o más aminoácidos está sustituida por grupos que no modifican la actividad antimicrobiana del péptido de la invención. La expresión "derivado funcional" también se refiere a un péptido según la invención cuya secuencia está acortada en 1, 2, 3 o 4 aminoácidos en el extremo C-terminal y/o N-terminal, preferiblemente en 1 o 2 aminoácidos en el extremo N-terminal.

30 En una realización particular, la expresión "derivado funcional" se refiere a retro-péptidos o péptidos retro-inversos, preferiblemente péptidos retro-inversos, y/o péptidos según la invención que comprenden, o que consisten en, una secuencia acortada en 1 o 2 aminoácidos en el extremo N-terminal, es decir, L-X₁-G-I-X₂-G-X₃-L-G-K-L-X₄ (SEQ ID N°: 25) o X₁-G-I-X₂-G-X₃-L-G-K-L-X₄ (SEQ ID N°: 26), en las que X₁, X₂, X₃ y X₄ tienen el mismo significado que en las realizaciones descritas anteriormente.

35 También se describe un análogo peptídico de temporina-SHa que exhibe una actividad antimicrobiana y que comprende, o que consiste en, la secuencia X₅-X₆-I-V-X₇-M-L-X₈-K-L-F (SEQ ID N°: 27) o L-X₅-X₆-I-V-X₇-M-L-X₈-K-L-F (SEQ ID N°: 28), en las que X₅ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en S, R, H y K, y X₆, X₇ y X₈, que son iguales o diferentes, son aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, R, H y K, y en las que, cuando X₅ representa S, al menos uno de los residuos X₆, X₇ y X₈ se selecciona del grupo que consiste en R, H y K, y los derivados funcionales y sales farmacéuticamente aceptables de dicho péptido.
 40

En una realización preferida, X₅ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R, H y K, preferiblemente es K, y X₆, X₇ y X₈ representan G.

45 En una realización particular, el péptido comprende, o consiste en, la secuencia X₅-X₆-I-V-X₇-M-L-X₈-K-L-F (SEQ ID N°: 27). Preferiblemente, en esta realización, X₅ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R, H y K, preferiblemente es K, y X₆, X₇ y X₈ representan G.

50 La invención también abarca las sales farmacéuticamente aceptables de un péptido según la invención. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden ser, por ejemplo, sales de ácidos minerales farmacéuticamente aceptables tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico; sales de ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables tales como ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico, ácido málico, ácido succínico, ácido ascórbico y ácido tartárico; sales de bases minerales farmacéuticamente aceptables tales como sales de sodio, potasio, calcio, magnesio o amonio; o sales de bases orgánicas que contienen un nitrógeno salificable, usadas habitualmente en la técnica farmacéutica. Los métodos para preparar dichas sales son muy conocidos para un experto en la técnica.

55 El péptido según la invención se puede obtener mediante síntesis química clásica (en fase sólida o fase líquida homogénea) o mediante síntesis enzimática (Kullman *et al.*, 1987). También se puede obtener mediante un método que consiste en cultivar una célula hospedadora, tal como se describe más adelante en la presente memoria, que comprende un transgén que codifica el péptido y que expresa dicho péptido, y extraer dicho péptido de dichas

células hospedadoras o del medio de cultivo en el que se secretó el péptido.

El péptido según la invención exhibe una actividad antimicrobiana y una actividad citolítica reducida en comparación con temporina-SHa.

5 Preferiblemente, el péptido según la invención no exhibe actividad citolítica, o exhibe una actividad citolítica débil. En particular, el péptido de la invención puede tener una CL_{50} mayor de 30 μM para los eritrocitos; preferiblemente mayor de 40, 50, 100, 200, 500, 600, 800 μM . El valor de CL_{50} se puede obtener, por ejemplo, con eritrocitos de rata, perro, conejo, cerdo, gato o humanos, preferiblemente con eritrocitos de rata o humanos, más preferiblemente con eritrocitos de rata.

10 Además de una citotoxicidad reducida, el péptido de la invención tiene una actividad antimicrobiana que es preferiblemente igual o superior a la de temporina-SHa contra al menos una cepa bacteriana, viral, fúngica o parasitaria.

La presente invención también se refiere a un ácido nucleico que codifica un péptido según la invención.

15 En el espíritu de la invención, se entiende que "ácido nucleico" significa cualquier molécula basada en ADN o ARN. Estas pueden ser sintéticas o semisintéticas, moléculas recombinantes, posiblemente amplificadas o clonadas en vectores, modificadas químicamente, que comprenden bases no naturales o nucleótidos modificados que comprenden, por ejemplo, un enlace modificado, una base modificada de purina o pirimidina, o un carbohidrato modificado.

20 El ácido nucleico según la invención puede estar en forma de ADN y/o ARN, monocatenario o bicatenario. Según una realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADN aislada, sintetizada mediante métodos recombinantes muy conocidos para un experto en la técnica.

El ácido nucleico según la invención se puede deducir de la secuencia del péptido según la invención, y se puede adaptar el uso de los codones según la célula hospedadora en la que se va a transcribir el ácido nucleico. Estas etapas se pueden llevar a cabo según métodos muy conocidos para un experto en la técnica, y algunos de los cuales se describen en el manual de referencia Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 2001).

25 La presente invención se refiere además a un casete de expresión que comprende un ácido nucleico según la invención unido de forma operable a las secuencias necesarias para su expresión. En particular, el ácido nucleico puede estar bajo control de un promotor que permite su expresión en una célula hospedadora. En general, un casete de expresión está constituido por o comprende un promotor que permite el inicio de la transcripción, un ácido nucleico según la invención, y un terminador de la transcripción. La expresión "casete de expresión" indica una construcción de ácido nucleico que comprende una región codificante y una región reguladora, unidas de forma operable. La expresión "unido de forma operable" indica que los elementos se combinan de tal manera que la expresión de la secuencia codificante (el gen de interés) y/o el transporte del péptido codificado están bajo control del promotor transcripcional y/o del péptido señal. En general, la secuencia promotora está colocada en posición anterior al gen de interés, a una distancia de él, que es compatible con el control de la expresión. De forma similar, la secuencia del péptido señal en general está fusionada en posición anterior a la secuencia del gen de interés, y en el mismo marco de lectura que este último, y en posición posterior a cualquier promotor. Puede haber presentes secuencias espaciadoras entre los elementos reguladores y el gen, con tal de que no impidan la expresión y/o transporte. En una realización preferida, dicho casete de expresión comprende al menos una secuencia activante "potenciadora" unida de forma operable al promotor.

40 La presente invención también se refiere a un vector de expresión que comprende un ácido nucleico o un casete de expresión según la invención. Dicho vector de expresión se puede usar para transformar una célula hospedadora, y posibilita la expresión del ácido nucleico de la invención en dicha célula.

El vector puede ser un ADN o un ARN, circular o no, monocatenario o bicatenario. De manera ventajosa, se selecciona de un plásmido, un fago, un fagómido, un virus, un cósmido y un cromosoma artificial.

45 De manera ventajosa, el vector de expresión comprende elementos reguladores que permiten la expresión del ácido nucleico según la invención. Estos elementos pueden contener, por ejemplo, promotores transcripcionales, activadores transcripcionales, secuencias terminadoras, codones de inicio y terminación. Los métodos para seleccionar dichos elementos según la célula hospedadora en la que se desea la expresión son muy conocidos para un experto en la técnica.

50 El vector también puede contener elementos que permiten su selección en la célula hospedadora, tales como, por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos o un gen seleccionable que proporciona la complementación del gen respectivo delecionado del genoma de la célula hospedadora. Tales elementos son muy conocidos para un experto en la técnica, y se describen exhaustivamente en la bibliografía.

55 Cuando la célula hospedadora a transformar es una célula vegetal, el vector de expresión es preferiblemente un vector vegetal. Los ejemplos de vectores vegetales se describen en la bibliografía, e incluyen en particular los

plásmidos de T-ADN de *A. tumefaciens* pBIN19 (Bevan, 1984), pPZP100 (Hajdukewicz *et al.*, 1994), la serie pCAMBIA (R. Jefferson, CAMBIA, Australia). Los vectores de la invención pueden comprender además un origen de replicación y/o un gen marcador seleccionable y/o una secuencia de recombinación vegetal.

5 Los vectores se pueden construir mediante los métodos clásicos de la biología molecular, muy conocidos para un experto en la técnica.

La presente invención se refiere al uso de un ácido nucleico, un casete de expresión o un vector de expresión según la invención para transformar o transfectar una célula. La célula hospedadora se puede transformar/transfectar de una manera transitoria o estable, y el ácido nucleico, casete o vector puede estar contenido en la célula en forma de un episoma o en forma cromosómica.

10 La presente invención se refiere a una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico, un casete o un vector de expresión según la invención.

Según una realización, la célula hospedadora es un microorganismo, preferiblemente una bacteria o una levadura.

15 Según otra realización, la célula hospedadora es una célula animal, por ejemplo una célula de mamífero tal como las células COS o CHO (documentos US 4.889.803; US 5.047.335). En una realización particular, la célula no es humana y no es embrionaria.

Según otra realización, la célula hospedadora es una célula vegetal. La expresión "célula vegetal", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier célula que proviene de una planta y que puede constituir tejidos indiferenciados tales como callos, y tejidos diferenciados tales como embriones, partes de plantas, plantas o semillas.

20 La presente invención también se refiere a un método para producir un péptido antimicrobiano según la invención que comprende transformar o transfectar una célula con un ácido nucleico, un casete de expresión o un vector de expresión según la invención; cultivar la célula transfectada/transformada; y recuperar el péptido producido por dicha célula. Los métodos para producir péptidos recombinantes son muy conocidos para un experto en la técnica. Por ejemplo, se pueden citar los métodos específicos descritos en el documento WO 01/70968 para la producción en una línea celular humana inmortalizada, el documento WO 2005/123928 para la producción en una planta y el documento US 2005-229261 para la producción en la leche de un animal transgénico.

25 La presente invención también se refiere a un método para producir un péptido antimicrobiano según la invención que comprende insertar un ácido nucleico, un casete o un vector de expresión según la invención en un sistema de expresión *in vitro*, también denominado acelular, y recuperar el péptido producido mediante dicho sistema. Muchos sistemas de expresión *in vitro* o acelulares están disponibles comercialmente, y el uso de dichos sistemas es muy conocido para un experto en la técnica.

30 La presente invención se refiere además a un péptido según la invención como medicamento, en particular como medicamento para tratar una infección microbiana, concretamente una infección debida a una bacteria, un virus, un hongo o un parásito. También se refiere a un ácido nucleico, un casete o un vector según la invención como medicamento. El medicamento se puede destinar al uso farmacéutico o veterinario.

35 La infección microbiana puede ser una infección debida a un parásito, en particular un parásito del género *Leishmania* o *Trypanosoma*.

40 En una realización, la infección microbiana es una infección debida a un parásito del género *Leishmania*. La infección puede ser una leishmaniosis cutánea, una leishmaniosis mucocutánea o una leishmaniosis visceral. El parásito se puede seleccionar del grupo que consiste en *Leishmania aethiopica*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania arabica*, *Leishmania aristedes*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum*, *Leishmania colombiensis*, *Leishmania deanei*, *Leishmania donovani*, *Leishmania enriettii*, *Leishmania equatorensis*, *Leishmania forattinii*, *Leishmania garnhami*, *Leishmania gerbili*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania herreri*, *Leishmania hertigi*, *Leishmania killicki*, *Leishmania lainsoni*, *Leishmania major*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania naiffi*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania peruviana*, *Leishmania pifanoi*, *Leishmania shawi*, *Leishmania turanica*, *Leishmania tropica* y *Leishmania venezuelensis*. Preferiblemente, el parásito se selecciona del grupo que consiste en *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania panamensis* y *Leishmania peruviana*. De manera especialmente preferida, el parásito se selecciona del grupo que consiste en *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*, *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania killicki* y *Leishmania braziliensis*. De manera especialmente preferida, la infección es una infección por el parásito *Leishmania infantum*.

55 En otra realización, la infección microbiana es una infección debida a un parásito del género *Trypanosoma*. El parásito se puede seleccionar del grupo que consiste en *Trypanosoma avium*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma equinum*, *Trypanosoma equiperdum*, *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma lewisi*, *Trypanosoma melophagium*, *Trypanosoma percae*, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma*

rotatorium, *Trypanosoma simiae*, *Trypanosoma suis*, *Trypanosoma theileri*, *Trypanosoma triglae* y *Trypanosoma vivax*. Preferiblemente, el parásito se selecciona del grupo que consiste en *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma congolense*.

5 La infección microbiana puede ser debida a bacterias Gram-negativas. En particular, las bacterias Gram-negativas se pueden seleccionar del grupo que consiste en *Escherichia coli* y bacterias del género *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Acinetobacter* o *Klebsiella*. Preferiblemente, las bacterias Gram-negativas se seleccionan del grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae*.

10 La infección microbiana puede ser debida a bacterias Gram-positivas. En particular, las bacterias Gram-positivas se pueden seleccionar del grupo que consiste en bacterias del género *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Listeria* o *Enterococcus*. Preferiblemente, las bacterias Gram-positivas se seleccionan del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria ivanovii* y *Enterococcus faecalis*.

La infección microbiana también se puede deber a un hongo. En particular, el hongo puede ser del género *Candida* o *Aspergillus*. Por ejemplo, el hongo se puede seleccionar del grupo que consiste en *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*.

15 En una realización particular, el péptido de la invención se usa para tratar una infección bacteriana que implica la formación de una biopelícula, tal como fibrosis quística, endocarditis, cistitis, infecciones provocadas por dispositivos médicos implantados, formación de placa dental o periodontitis.

La presente invención se refiere a un péptido según la invención como agente antimicrobiano. La presente invención también se refiere a un ácido nucleico, un casete o un vector según la invención como agente antimicrobiano.

20 La presente invención se refiere a un péptido según la invención como agente estimulante del sistema inmunitario, especialmente durante una infección microbiana. La invención también se refiere a un ácido nucleico, un casete o un vector según la invención como agente estimulante del sistema inmunitario. Según una realización particular de la invención, el péptido según la invención tiene propiedades quimiotácticas. El péptido induce la incorporación de células inmunitarias al sitio de infección e incrementa la eficacia de la respuesta inmunitaria a las infecciones.

25 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende, o que consiste básicamente en, al menos un péptido según la invención y un soporte y/o excipiente farmacéuticamente aceptables. En particular, la composición farmacéutica puede comprender, o consistir en, 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos según la invención y un soporte y/o excipiente farmacéuticamente aceptables.

30 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende, o que consiste básicamente en, al menos un ácido nucleico, casete o vector según la invención y un soporte y/o excipiente farmacéuticamente aceptables.

35 Los excipientes y soportes farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en la composición según la invención son muy conocidos para un experto en la técnica (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer y L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]), y comprenden en particular soluciones salinas fisiológicas y tampones fosfato.

40 La composición farmacéutica según la invención puede ser adecuada para administración local o sistémica, en particular para administración oral, sublingual, cutánea, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, tópica, intratraqueal, intranasal, transdérmica, rectal, intraocular o intraauricular. Preferiblemente, la composición farmacéutica según la invención es adecuada para administración cutánea, oral, tópica, intramuscular, intravenosa, transdérmica o subcutánea. Según una realización particular, la composición farmacéutica según la invención es adecuada para administración tópica. La composición farmacéutica según la invención puede estar en forma de comprimidos, cápsulas, cápsulas blandas, granulados, suspensiones, emulsiones, soluciones, geles, pastas, pomadas, cremas, esparadrapos, pociones, supositorios, enemas, inyectables, implantes, parches, esprays o aerosoles.

Según una realización, la composición según la invención comprende de 1 a 2000 mg de péptido según la invención. Preferiblemente, la composición según la invención comprende de 50 a 100, 150, 200, 250, 500, 750, 1000 o 1500 mg de péptido según la invención.

50 La composición según la invención puede comprender además sustancias activas adicionales, tales como otros agentes antimicrobianos, en particular péptidos antimicrobianos o antibióticos. La composición también puede comprender además sustancias que pueden potenciar la actividad del péptido según la invención.

55 La presente invención se refiere al uso de un péptido según la invención para preparar un medicamento para tratar una infección microbiana. La invención también se refiere al uso de un ácido nucleico, un casete o un vector según la invención para preparar un medicamento para tratar una infección microbiana.

La presente invención se refiere a un péptido según la invención para el uso en el tratamiento de una infección microbiana. La presente invención también se refiere a un ácido nucleico, un casete o un vector según la invención para el uso en el tratamiento de una infección microbiana.

El tratamiento puede ser curativo o preventivo.

- 5 El sujeto a tratar es un animal, preferiblemente un mamífero. Según una realización particular, el sujeto a tratar es un ser humano.

La presente invención también se refiere a un método para tratar una infección microbiana que comprende administrar una dosis terapéuticamente eficaz de un péptido, un ácido nucleico, un casete o un vector según la invención.

- 10 La expresión "dosis terapéuticamente eficaz", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a la cantidad de péptido, ácido nucleico, casete o vector según la invención necesaria para observar una actividad antimicrobiana sobre la bacteria, virus, hongo o parásito responsable de la infección. La cantidad de péptido, ácido nucleico, casete o vector según la invención a administrar y la duración del tratamiento los determina una persona experta en la técnica según el estado fisiológico del sujeto a tratar, el agente patógeno y la actividad antimicrobiana del péptido
15 hacia dicho agente patógeno.

En una realización particular, la infección microbiana a tratar es una leishmaniosis.

En otra realización particular, la infección microbiana a tratar es una infección bacteriana que implica la formación de una biopelícula, tal como fibrosis quística, endocarditis, cistitis, infecciones provocadas por dispositivos médicos implantados, formación de placa dental o periodontitis.

- 20 Una dosis eficaz del péptido de la invención puede comprender, pero sin limitación, entre aproximadamente 1 y 40 mg/kg de peso corporal. La frecuencia de la administración puede ser, por ejemplo, cada 4 a 24 horas, preferiblemente cada 8 a 12 horas. La duración del tratamiento puede ser, por ejemplo, de 1 a 30 días, preferiblemente de 10 a 20 días, y lo más preferiblemente de 5 a 10 días.

- 25 La presente invención también se refiere al uso del péptido según la invención como conservante, desinfectante o plaguicida.

Los productos alimentarios se pueden tratar con un péptido según la invención para eliminar o prevenir el riesgo de infección por microorganismos, y de ese modo mejorar su conservación. En este caso, el péptido se usa como conservante.

- 30 El péptido según la invención se puede usar como plaguicida. En este caso, el péptido se usa para prevenir o tratar infecciones de plantas por fitopatógenos.

El péptido según la invención también se puede usar como desinfectante. El término "desinfectante" se refiere a una actividad antimicrobiana del péptido sobre una superficie (por ejemplo, paredes, puertas, equipo médico), un líquido (por ejemplo, agua) o un gas (por ejemplo, un gas anestésico).

- 35 Las biopelículas son responsables de aproximadamente un 60% de las infecciones nosocomiales. Se deben básicamente a la colonización microbiana de los biomateriales implantados. La erradicación de una biopelícula bacteriana es un problema clínico importante, teniendo en cuenta que los antibióticos activos normalmente sobre las bacterias en estado planctónico a menudo resultan ser mucho menos eficaces contra las estructuras organizadas en una biopelícula. El efecto de los péptidos antimicrobianos sobre este tipo de biopelícula se ha demostrado en estudios previos llevados a cabo con temporina-A (Cirioni *et al.*, 2003).

- 40 Según una realización, el péptido según la invención se usa para la eliminación de biopelículas bacterianas. Según una realización preferida, el péptido según la invención se usa en particular para desinfectar el equipo quirúrgico o protésico.

- 45 La presente invención se refiere además a un dispositivo médico o implante que comprende un cuerpo que tiene al menos una superficie revestida con o que incluye un péptido según la invención. La presente invención se refiere además a un método para preparar un dispositivo médico o implante que comprende aplicar un revestimiento del péptido según la invención, o ponerlo en contacto, con al menos una superficie del dispositivo o implante.

Este tipo de dispositivo médico o implante y el uso y los métodos de preparación del mismo se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente WO 2005/006938.

- 50 La superficie revestida con o que incluye un péptido según la invención puede estar compuesta de materiales termoplásticos o poliméricos tales como polietileno, Dacron, nailon, poliésteres, politetrafluoroetileno, poliuretano, látex, elastómeros de silicona y similares, o de materiales metálicos tales como oro. En una realización particular, el péptido de la invención se une de manera covalente a una superficie funcionalizada, preferiblemente una superficie metálica, por medio de su extremo N-terminal o C-terminal. Opcionalmente, el péptido se puede unir a la superficie a

través de un brazo espaciador.

Preferiblemente, la superficie se puede revestir con un péptido a una densidad de 0,4 a 300 mg/cm².

De manera alternativa, el dispositivo o implante, en particular un dispositivo protésico osteoarticular, se puede revestir con una mezcla de cemento que comprende un péptido según la invención.

- 5 El péptido se puede combinar con otra molécula activa, preferiblemente un antibiótico.

El dispositivo o implante puede ser, por ejemplo, catéteres intravasculares, peritoneales, pleurales y urológicos; válvulas cardíacas; marcapasos cardíacos; derivaciones vasculares; derivaciones coronarias; implantes dentales o prótesis ortopédicas o intraoculares.

- 10 La presente descripción se refiere a una composición alimentaria que comprende al menos un péptido según la invención.

La presente descripción se refiere además a una composición agroquímica que comprende al menos un péptido según la invención.

La presente invención se refiere a una planta transgénica que comprende un ácido nucleico, un casete o un vector de expresión según la invención, y que es capaz de expresar o que expresa un péptido según la invención.

- 15 La introducción de ácidos nucleicos, casetes o vectores de expresión de la invención en una célula o un tejido vegetal, que incluye una semilla o planta, se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido para un experto en la técnica. Los métodos de transgénesis vegetal son muy conocidos en ese campo, y comprenden, por ejemplo, el uso de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Hooykaa y Schilperoort, 1992), electroporación, transferencia conjugativa, técnicas biolísticas (Russel *et al.*, 1992) o microinyección en embriones o protoplastos vegetales. Se conocen bien otras técnicas de transgénesis vegetal, o se describen otros protocolos que implementan las técnicas precedentes en la técnica anterior (Siemens y Schieder, 1996), y se pueden aplicar a la presente invención. La planta transgénica según la invención se puede obtener en particular según el método descrito en la solicitud de patente WO 00/055337.
- 20

- 25 La planta transgénica puede pertenecer a cualquier especie vegetal. Puede ser monocotiledónea o dicotiledónea. Más en particular, la planta transgénica de la invención es una planta cultivada destinada o no a alimentación animal o humana o sobre la cual se posa el flebotomo, el insecto vector de la leishmaniosis, para alimentarse, tal como maíz, trigo, colza, soja, alfalfa, lino, arroz, caña de azúcar, remolacha, tabaco, algodón, girasol, tomate, repollo, zanahoria, patata, o árboles frutales tales como limonero, manzano, albaricoquero, melocotonero y avellano, o plantas identificadas hasta la fecha como fuentes de alimento con azúcar para los flebotomos tales como *Ricinus communis*, *Capparis spinosa*, *Solanum jasminoides*, *Solanum luteum* o *Bougainvillea glabra*.
- 30

Según una realización, la expresión del péptido según la invención permite que la planta transgénica tenga una resistencia incrementada hacia patógenos, y más en particular hacia fitopatógenos. El uso de tal planta transgénica hace posible reducir considerablemente la pulverización o aplicación de plaguicidas sobre los cultivos, y de ese modo se minimizan los efectos ambientales perjudiciales de estos productos.

- 35 Según otra realización, la planta transgénica expresa un péptido según la invención, que se administra a un animal que incluye flebotomos o un ser humano mediante la ingestión de dicha planta o sus jugos. En este caso, el péptido no tiene necesariamente un efecto sobre los fitopatógenos, pero muestra actividad antimicrobiana contra uno o más patógenos del animal, lo que incluye los parásitos de leishmania presentes en el intestino de los flebotomos vectores de la leishmaniosis humana y animal o el ser humano al que se administra. Las plantas transgénicas, en las que los flebotomos se alimentan de azúcares, administran directamente al intestino del insecto vector un péptido antimicrobiano de la invención que destruye el parásito presente eventualmente en el insecto vector directamente o bloqueando su desarrollo destruyendo las bacterias de la flora intestinal del insecto vector, necesarias para la diferenciación o multiplicación del parásito. Las plantas transgénicas constituyen de hecho un medio eficaz de control indirecto de la transmisión de la leishmaniosis.
- 40

- 45 También se describe un anticuerpo específico del péptido según la invención. El término "anticuerpo", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere en particular a anticuerpos policlonales o monoclonales, fragmentos de los mismos (por ejemplo, los fragmentos F(ab')₂, F(ab)), anticuerpos de cadena simple o minicuerpos, o cualquier polipéptido que comprenda un dominio del anticuerpo inicial que reconozca el péptido de la invención, en particular CDRs (regiones determinantes de la complementariedad). Por ejemplo, estos son anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar a partir de hibridomas según métodos muy conocidos para un experto en la técnica. Los diferentes métodos para preparar anticuerpos son muy conocidos para un experto en la técnica.
- 50

- También se describe el uso de un anticuerpo según la invención para detectar un péptido según la invención. Además, se describe el uso de un anticuerpo según la invención para realizar medidas cuantitativas de un péptido según la invención, en particular para ensayos inmunológicos. Dichas medidas pueden permitir en particular una
- 55

determinación de la expresión del péptido de la invención en una célula hospedadora o una planta transgénica según la invención.

Otras características y ventajas de la invención serán más evidentes en los siguientes ejemplos, que se proporcionan con fines ilustrativos y no como limitación.

5 Ejemplos

Materiales y métodos

Síntesis peptídica en fase sólida

La síntesis peptídica en fase sólida se llevó a cabo con la ayuda de un sintetizador de péptidos automatizado (Applied Biosystems 433A) según el protocolo descrito por Vanhoye *et al.* (Vanhoye *et al.*, 2004), y mediante el uso de aminoácidos protegidos con Fmoc (Novabiochem, Suiza) y resina Rink Amide MBHA (Senn Chemicals, Suiza).

Los péptidos en bruto liofilizados se purificaron mediante RP-HPLC en una columna semipreparativa Phenomenex Luna® C18(2) (10 µm, 250x10 mm) con elución a un caudal de 5 mL/min con un gradiente lineal del 0-70% de acetonitrilo (0,07% de trifluoroacetato) en un 0,1% de trifluoroacetato/agua (1% de acetonitrilo/min). Se estudió la homogeneidad e identidad de los péptidos sintéticos mediante espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF) (Voyager DE-PRO Applied Biosystems) y RP-HPLC en una columna analítica C18 (Modulocart QS Uptisphere® 5ODB, 5 µm, 250x4,6 mm, Interchim) mediante el uso de las condiciones anteriores con un caudal de 0,75 mL/min.

Ensayos de actividad antibacteriana

Se usaron las siguientes cepas para los ensayos de actividad antibacteriana: *Escherichia coli* (ATCC 25922 y ML-35p), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 y ST1065), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Listeria ivanovii*, *Salmonella enterica* (serotipo Enteritidis), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606) y *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883). También se usaron dos cepas resistentes a antibióticos (*S. aureus* ATCC 43300 y ATCC BAA-44).

Para cada cepa, se preparó un inóculo estándar de aproximadamente 10^6 bacterias/mL (fase de crecimiento exponencial). Para este fin, una colonia aislada en agar LB previamente inoculado con una de las cepas se cultivó en 4 mL de caldo LB, excepto para *S. pyogenes* y *L. ivanovii*, que se cultivaron en BHI (infusión cerebro-corazón) a partir de una colonia aislada en agar BHI. Los cultivos líquidos se incubaron después durante 2 a 3 hrs a 37 °C con agitación para que las bacterias alcanzasen la fase de crecimiento exponencial. Tras la centrifugación, la mayoría de las suspensiones bacterianas se diluyeron en caldo Mueller-Hinton (MH) hasta una DO_{630nm} de 0,01, que corresponde a una concentración de aproximadamente 10^6 ufc/mL (ufc: unidad formadora de colonias). Se usó un medio diferente para *E. faecalis* (LB) y para *S. pyogenes* y *L. ivanovii* (BHI).

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cada péptido mediante un ensayo de inhibición del crecimiento en caldo. La CIM se define como la concentración más baja de péptido capaz de inhibir el crecimiento de la cepa bacteriana ensayada tras 18 hrs de incubación a 37 °C. El ensayo se llevó a cabo en una placa de microtitulación estéril de 96 pocillos. Primero se preparó una serie de concentraciones crecientes de péptido (2 a 400 µM) en agua MilliQ estéril. Se mezclaron 50 µL de cada concentración de péptido en el pocillo con 50 µL de suspensión bacteriana (10^6 ufc/mL). La placa de microtitulación se incubó después durante 18 hrs a 37 °C con agitación. Se determinó el crecimiento bacteriano midiendo la DO a 630 nm (turbidez) en un lector de placas. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado para cada concentración de péptido, y se llevaron a cabo al menos tres experimentos independientes para determinar el valor de CIM.

El control negativo de inhibición del crecimiento se obtuvo sustituyendo la disolución que contenía el péptido con 50 µL de agua MilliQ estéril. El control positivo que permitió la inhibición completa del crecimiento bacteriano se obtuvo sustituyendo la disolución que contenía el péptido con 50 µL de formaldehído al 0,7%.

Ensayos de actividad antifúngica

Se usaron tres cepas de levadura: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019). Estas cepas se cultivaron primero en agar YPD durante un mínimo de 48 hrs. Después se prepararon suspensiones de levaduras, exactamente como para las bacterias, y se ajustaron a 10^6 ufc/mL en caldo YPD.

El ensayo de actividad antifúngica corresponde al ensayo de inhibición del crecimiento en el caldo usado para las bacterias (véase anteriormente), en el que el medio MH se sustituyó por medio YPD. Las cepas fúngicas se incubaron a 30 °C.

Ensayos de actividad anti-leishmania

Se determinó la actividad leishmanicida de los péptidos en la forma de promastigote de *Leishmania infantum* (cepa

MHOM/MA/67/ITMAP-263), responsable de la leishmaniosis visceral.

5 Los promastigotes se mantuvieron a 26 °C con uno o dos pases semanales, dependiendo del número de parásitos en el inóculo, en medio SDM 79 complementado con un 10 al 20% de suero de ternero fetal descomplementado y 5 mg/mL de hemina porcina y en presencia de 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (Brun et al., 1979). Partiendo de un inóculo de 10⁵ células/mL en fase de crecimiento logarítmico, los promastigotes alcanzaron una densidad celular de 1 a 2 x 10⁸ parásitos/mL en fase estacionaria después de 5 días de cultivo en matraces de cultivo de 25 cm². Las densidades celulares se determinaron mediante citometría de flujo en presencia de yoduro de propidio en un citómetro Facscan (Excalibur, Becton-Dickinson, Ivry, Francia).

10 Los ensayos de actividad anti-leishmania se llevaron a cabo con una línea de parásitos que expresaban la luciferasa. Esta línea de parásitos se obtuvo transformando la cepa *Leishmania infantum* con el vector pGM-αNEO-αLUC que contenía el gen indicador *LUC* que codifica la luciferasa de luciérnaga, y el gen de resistencia a neomicina (NEO) tal como se describió en Roy et al. (2000).

Ensayos de actividad anti-leishmania sobre promastigotes que expresan la luciferasa:

15 Se alicuotaron 80 µL de una suspensión de promastigotes (10⁵ parásitos/pocillo) en cada pocillo de una placa de microtitulación junto con 20 µL de disolución de péptido (concentración final de 50 a 3,125 µM). Para el control negativo, se sustituyó la disolución de péptido por 20 µL de medio SDM79. El control positivo se llevó a cabo con 20 µL de la disolución con la concentración de péptido más alta. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado para cada concentración de péptido.

20 Después de 72 hrs de incubación a 26 °C, se añadieron 50 µL de tampón de lisis Steady Glo (Promega) a cada pocillo. Después de una incubación de 5 min a temperatura ambiente, se comprobó la lisis celular con un microscopio. La luminiscencia emitida se midió con un lector de placas de luminiscencia (Victor, PerkinElmer). Es proporcional al número de parásitos viables en el medio. Se calculó el crecimiento en porcentaje según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de crecimiento} = [(L \text{ media} - \text{fnd})_{\text{péptido}} \times 100] / (L \text{ media} - \text{fnd})_{\text{control negativo}}$$

25 en la que L media: luminiscencia media y fnd: fondo que corresponde a la luminiscencia emitida por el medio de cultivo. Se determinó la concentración que inhibió el crecimiento de promastigotes en un 50% (CL₅₀).

Ensayos de citotoxicidad en eritrocitos de rata, monocitos humanos, macrófagos, células de carcinoma hepatocelular y fibroblastos:

30 Se determinó la actividad citotóxica de los péptidos antimicrobianos en eritrocitos de rata, la línea celular de monocitos de leucemia humana THP-1, macrófagos derivados de monocitos THP-1, en células derivadas de hepatoma humano HepG2 (línea celular de carcinoma hepatocelular humano) y fibroblastos humanos. Los macrófagos son las células hospedadoras para *Leishmania*.

Ensayo hemolítico

35 Se estudió la actividad hemolítica de los péptidos antimicrobianos mediante el uso de eritrocitos de rata. La hemólisis de eritrocitos se manifiesta por la liberación al medio de reacción de hemoglobina, cuya concentración se determina de manera espectrofotométrica a 450 nm.

40 Se separaron los eritrocitos del plasma y los leucocitos mediante centrifugación de la sangre (900 x g, 10 min). El sedimento que contenía los eritrocitos se lavó tres veces con tampón PBS, pH 7,4. Después de realizar un recuento en una cámara Malassez, se preparó una disolución de reserva de 4 x 10⁸ eritrocitos/mL en el mismo tampón. Se preparó una serie de concentraciones de los péptidos a ensayar (2 a 400 µM).

45 El ensayo se llevó a cabo como sigue: Se añadieron 50 µL de las diferentes concentraciones de péptidos a 50 µL de la suspensión de eritrocitos. Después de 1 hr de incubación a 37 °C seguido de centrifugación (12.000 x g, 15 seg), se midió la absorbancia del sobrenadante a 450 nm. El control negativo para este ensayo (0% de hemólisis) contuvo 50 µL de tampón PBS en lugar de la disolución de péptido. El control positivo (100% de hemólisis) contuvo 50 µL de Triton X-100 al 0,1% en lugar de la disolución de péptido.

El valor de CL₅₀ obtenido es la media de tres experimentos llevados a cabo por triplicado, y corresponde a la concentración de péptido que induce la hemólisis del 50% de las células.

Ensayo de citotoxicidad en monocitos:

50 Las células se cultivaron en medio RPMI (10% de FCS, 1/100 Glutamax® (Invitrogen) y 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina) hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. Después de realizar un recuento en una cámara de recuento Thoma, la densidad celular se ajustó a 6,25 x 10⁵ células/mL en medio RPMI 1640. Se prepararon disoluciones de cinco concentraciones de los péptidos antimicrobianos en este medio RPMI (250 a 15,6 µM).

Las células se alicuotaron en 80 μL de suspensión celular por pocillo (que correspondió a 5×10^4 monocitos/pocillo o 5×10^5 células/mL final) y se mezclaron con 20 μL de disolución de péptidos (50 a 3,125 μM de concentración final). Se llevaron a cabo controles negativos y positivos según el mismo protocolo que para los ensayos de actividad anti-leishmania. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado para cada concentración de péptido. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO_2 durante 72 hrs.

Después de 72 hrs, se calculó indirectamente el número de células viables mediante el ensayo MTT (Mosmann, 1983). MTT (o bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio), que es de color amarillo, se reduce hasta formazano, que es de color azul, por la acción de la succinato-tetrazolio reductasa, que está presente en la cadena respiratoria mitocondrial de las células metabólicamente activas. El formazano azul se puede detectar de manera espectrofotométrica a 570 nm.

Una disolución de MTT de 10 mg/mL en tampón PBS (pH 7,4), filtrada en un filtro de 0,22 μm , se alicuotó a 10 μL por pocillo. Las placas se incubaron después durante 4 hrs a 37 °C. La reacción enzimática se detuvo añadiendo 100 μl de una mezcla del 50% de isopropanol/10% de SDS, y las placas se incubaron después a temperatura ambiente durante 30 min con agitación. Después se midió la DO a 570 nm de cada pocillo (lector de placas Victor, PerkinElmer). Se calculó el porcentaje de crecimiento como sigue:

$$\% \text{ de crecimiento} = [(DO \text{ media} - \text{fnd})_{\text{péptido}} \times 100] / (DO \text{ media} - \text{fnd})_{\text{control negativo}}$$

en la que fnd es el fondo que corresponde a la absorbancia del medio de cultivo. El control negativo (100% de crecimiento) no contuvo péptido.

Después se determinó la Cl_{50} a partir del porcentaje de crecimiento.

Ensayo de citotoxicidad en macrófagos derivados de monocitos humanos THP-1:

La viabilidad de los macrófagos se determinó mediante el uso de un microensayo basado en azul tripán. Se colocaron células THP-1 de una suspensión de cultivo en una fase de crecimiento semilogarítmica a una densidad de 5×10^5 células/mL en placas de 96 pocillos (100 μL /pocillo, es decir, 5×10^4 células/pocillo) y se diferenciaron como se describió anteriormente. Tras la incubación durante 72 hrs a 37 °C con un 5% de CO_2 , en presencia de péptido (60 μM a 7,5 μM , concentraciones finales), los macrófagos adherentes se lavaron una vez con medio RPMI 1640 precalentado y se tiñeron durante 5 min, con 100 μL de azul tripán diluido a la mitad en medio RPMI 1640. Los pocillos se lavaron después dos veces con 100 μL de medio RPMI 1640. Los leucocitos vivos se contaron microscópicamente en tres focos por pocillo mediante el uso de un ocular reticulado.

Se calculó el índice de viabilidad (VI) para cada concentración de péptido mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$VI = [N \text{ medio}_{\text{péptido}} \times 100] / N \text{ medio}_{\text{control negativo}}$$

en la que N medio es el número medio de parásitos viables. El control negativo (100% de crecimiento) contuvo 20 μL de medio RPMI en lugar de la disolución de péptido.

El valor de CL_{50} , que corresponde a la concentración de péptido que induce una lisis del 50% de las células, se determinó a partir de los índices de viabilidad. Se llevaron a cabo ensayos por sextuplicado para cada concentración de péptido, y se llevaron a cabo al menos dos experimentos independientes para determinar el valor de CL_{50} .

Ensayo de citotoxicidad en células derivadas de hepatoma humano HepG2:

Se sembraron células derivadas de hepatoma humano HepG2 en una placa de 96 pocillos a una densidad de 5×10^5 células/mL (100 μL /pocillo, es decir, 5×10^4 células/pocillo) en medio MEM complementado con un 10% de suero de ternero fetal descomplementado, 1/100 de Glutamax® (Invitrogen), 100 UI de penicilina/mL y 100 μg de estreptomycin/mL, y se dejaron crecer y adherirse durante 72 hrs a 37 °C y 5% de CO_2 . Se añadieron diluciones en serie del péptido en 100 μL de medio MEM complementado (100 μM a 600 μM). Tras la incubación durante 72 hrs, se estudió la viabilidad celular mediante el uso del microensayo basado en MTT como se describió anteriormente para los monocitos humanos THP-1.

Después se determinó la CL_{50} a partir de los porcentajes calculados de crecimiento para cada concentración de péptido. Se llevaron a cabo ensayos por triplicado para cada concentración de péptido, y se llevaron a cabo al menos tres experimentos independientes para determinar el valor de CL_{50} .

Ensayo de citotoxicidad en fibroblastos:

Se cultivaron fibroblastos de prepucio humano en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Invitrogen) complementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS; Invitrogen), glutamina 4 mM, 500 U/ml de penicilina, y 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin a 37 °C en un 5% de CO_2 . Se sembraron 10^4 células por pocillo (placa de 96 pocillos). Después de 24 hrs, se añadieron diluciones en serie de péptido y el compuesto de tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) se añadió directamente a los pocillos de cultivo tras una fase de proliferación de 72 hrs. El formazano coloreado biorreducido producido por las células viables se cuantificó con

un lector de placas de 96 pocillos (absorbancia, 490 nm). Se determinó la CL_{50} mediante un análisis de regresión no lineal.

Resultados

5 Basándose en sus propiedades fisicoquímicas, se diseñó una serie de análogos delecionados o sustituidos de temporina-SHa para obtener una actividad antimicrobiana potente y una citotoxicidad reducida (Fig. 2). Se determinó la actividad antimicrobiana de estos análogos sobre diferentes cepas de referencia bacterianas Gram-positivas, Gram-negativas y resistentes a antibióticos, y sobre cepas fúngicas.

10 *L. infantum*, el principal agente causal de la leishmaniasis visceral humana en la cuenca mediterránea y Latinoamérica, se seleccionó como especie de *Leishmania* de referencia (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263) para determinar la actividad anti-leishmania de los análogos de temporina-SHa de la invención.

15 Se llevaron a cabo ensayos de actividad sobre la forma de promastigote, que es la etapa del desarrollo presente en el insecto vector, el flebótomo. La determinación de la actividad metabólica de *Leishmania infantum* que expresa el gen de luciferasa se basa en la oxidación de luciferina por la luciferasa en presencia de ATP. Este proceso conduce a la emisión de fotones, cuya intensidad de señal es proporcional al número de parásitos viables, y por lo tanto al porcentaje del crecimiento.

20 Las actividades antimicrobianas y antiparasitarias se deben determinar comparativamente con la toxicidad de los péptidos hacia las células del hospedador. La citotoxicidad de estos péptidos se determinó, por lo tanto, en eritrocitos de rata, la línea celular HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), fibroblastos humanos, la línea celular de monocitos de leucemia humana THP-1 y los macrófagos derivados de monocitos THP-1. Los eritrocitos, la línea celular HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) y los fibroblastos humanos son tipos celulares de referencia usados habitualmente en farmacología para estudiar la citotoxicidad de los fármacos. Los macrófagos son las células hospedadoras naturales de *Leishmania* en los mamíferos.

Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM), las concentraciones inhibitorias 50 (CI_{50}) y las concentraciones letales 50 (CL_{50}) se muestran en las Figuras 4 y 5.

25 *Actividades antibacterianas y antifúngicas*

Los resultados indican que $[K^3]$ temporina-SHa es un potente agente antimicrobiano de amplio espectro que actúa con la misma eficacia ($CIM = 3-6 \mu M$) contra cepas bacterianas Gram-positivas (que incluyen las cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos) y Gram-negativas de interés clínico, así como levaduras (Figura 4). Las deleciones internas (deleción de los residuos V^6 y M^8), y el truncamiento C-terminal de dos residuos en la secuencia de $[K^3]$ temporina-SHa conducen a péptidos inactivos (datos no mostrados), excepto para $[K^3]$ temporina-SHa(3-13), que conserva la actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Figura 4). De manera interesante, este análogo truncado N-terminal es dos veces más activo que temporina-SHa contra levaduras (*C. albicans* y *parapsilosis*) y *P. aeruginosa* (una cepa Gram-negativa resistente a la mayoría de temporinas), y ha perdido su actividad hemolítica ($CL_{50} = 618 \mu M$). La ausencia de actividad hacia el análogo truncado C-terminal $[K^3]$ temporina-SHa(1-11) que tiene propiedades fisicoquímicas similares a $[K^3]$ temporina-SHa(3-13) revela que la cola hidrófoba C-terminal de temporina-SHa es esencial para la actividad antimicrobiana. El hecho de que el análogo truncado N-ter y C-ter $[K^3]$ temporina-SHa(3-11) sea también inactivo confirma la importancia del extremo C-terminal.

40 Los resultados de la Figura 5 revelan que $[K^3, L^{13}]$ y $[K^3, W^{13}]$ temporina-SHa, dos análogos con propiedades fisicoquímicas idénticas a $[K^3]$ temporina-SHa, exhiben una actividad potente con un espectro antimicrobiano similar a $[K^3]$ temporina-SHa, pero, de manera interesante, con una actividad hemolítica inferior (dos veces inferior en particular para $[K^3, L^{13}]$ temporina-SHa). Los análogos igualmente activos $[K^3, K^6]$, $[K^3, K^8]$, y $[K^3, K^8, L^{13}]$ temporina-SHa tienen varias características que los hacen muy atractivos. De hecho, a pesar de su eficacia inferior en comparación con $[K^3]$ temporina-SHa, estos análogos conservan una buena actividad contra la mayoría de las cepas ensayadas (bacterias y levaduras), y no son hemolíticos ($CL_{50} > 500 \mu M$). También son más activos que temporina-SHa contra *P. aeruginosa* (cuádruple) y *Candida* (doble).

45 *Actividad antiparasitaria*

Todos los análogos sustituidos de Temporina-SHa exhiben una disminución desigual de su actividad en promastigotes de *L. infantum*, que se aproxima al nivel de citotoxicidad en monocitos para los análogos, $[K^3, K^6]$, $[K^3, K^8]$ y $[K^3, K^8, L^{13}]$ temporina-SHa (Figura 5). Como para las bacterias, la actividad anti-leishmania de los análogos $[K^3, L^{13}]$ y $[K^3, W^{13}]$ temporina-SHa se ve poco alterada.

Conclusión

La temporina-SHa y sus análogos exhiben un amplio espectro de actividades, ya que son capaces de prevenir el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, que son procariotas, así como de levaduras, que son eucariotas.

[K³]temporina-SHa, con un residuo de Lys en vez de un residuo de Ser en la cara polar de la hélice α , representa un análogo antimicrobiano más potente en comparación con temporina-SHa.

La delección de dos residuos (F y L) en la región N-terminal de [K³]temporina-SHa proporcionó el análogo [K³]temporina-SHa(3-13), que está desprovisto de actividad hemolítica y tiene una mejor actividad que temporina-SHa (doble) contra *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *P. aeruginosa*.

De manera interesante, los análogos [K³,L¹³] y [K³,W¹³]temporina-SHa son tan potentes como [K³]temporina-SHa y menos hemolíticos. Además, exhiben una actividad leishmanicida moderada hacia promastigotes de *L. infantum* (similar a temporina-SHa) con una citotoxicidad reducida hacia la célula hospedadora (macrófago) para [K³,L¹³]temporina-SHa.

Finalmente, se demostró que una inserción adicional de un residuo de Lys en la posición 6 o 8 en la secuencia de [K³]temporina-SHa (análogos [K³,K⁶], [K³,K⁸] y [K³,K⁸,L¹³]temporina-SHa) conduce a buenos agentes antimicrobianos contra bacterias y levaduras sin actividad hemolítica.

Referencias bibliográficas

- Abbassi F, Oury B, Blasco T, Sereno D, Bolbach G, Nicolas P, Hani K, Amiche M, Ladram A (2008) Isolation, characterization and molecular cloning of new temporins from the skin of the North African ranid *Pelophylax saharica*. *Peptides* 29: 1526-33.
- Abbassi F, Raja Z, Oury B, Gazanion E, Piesse C, Sereno D, Nicolas P, Foulon T, Ladram A (2013) Antibacterial and leishmanicidal activities of temporin-SHd, a 17-residue long membrane-damaging peptide. *Biochimie* 95: 388-99.
- Abbassi F, Lequin O, Piesse C, Goasdoué N, Foulon T, Nicolas P, Ladram A (2010) Temporin-SHf, a new type of phe-rich and hydrophobic ultrashort antimicrobial peptide. *J Biol Chem* 285: 16880-92.
- Brun R, Schönenberger M (1979) Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. *Acta Trop.* 36: 289-92.
- Bevan M (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12: 8711-21.
- Camargo, E. P. 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Instit. Med. Trop. Sao Paulo* 6 : 93-100.
- Chinchar VG, Bryan L, Silphadaung U, Noga E, Wade D, Rollins-Smith L (2004) Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. *Virology* 323: 268-75.
- Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Dell'Acqua G, Gov Y, Kamysz W, Lukasiak J, Mocchegiani F, Orlando F, D'Amato G, Balaban N, Saba V, Scalise G (2003) Prophylactic efficacy of topical temporin A and RNAIII inhibiting peptide in a subcutaneous rat Pouch model of graft infection attributable to *Staphylococci* with intermediate resistance to glycopeptides. *Circulation* 108: 767-71.
- Conlon JM (2008) Reflections on a systematic nomenclature for antimicrobial peptides from the skins of frogs of the family Ranidae. *Peptides* 29: 1815-9.
- Conlon JM, Kolodziejek J, Nowotny N (2009) Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs. *Biochim. Biophys. Acta*, 1788: 1556-63.
- Cunningham, I. 1977. New culture medium for maintenance of tsetse tissues and growth of trypanosomatids. *J. Protozool.* 24: 325-329
- Dennison SR, Wallace J, Harris F, Phoenix DA (2005) Amphiphilic α -helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships. *Protein Pept. Lett.* 12: 31-9.
- Gianguaspero A, Sandri L, Tossi A (2001) Amphipathic α helical antimicrobial peptides: A systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. *Eur. J. Biochem.* 268: 5589-600.
- Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P (1994) The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 25: 989-94.
- Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1992) *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol.* 19: 15-38.
- Isaacson T, Soto A, Iwamuro S, Knoop FC, Conlon JM (2002) Antimicrobial peptides with atypical structural features from the skin of the Japanese brown frog *Rana japonica*. *Peptides* 23: 419-25.
- Kim JB, Iwamuro S, Knoop FC, Conlon JM (2001) Antimicrobial peptides from the skin of the Japanese mountain brown frog, *Rana ornativentris*. *J. Pept. Res.* 58: 349-56.

- Kullmann W (1987) Enzymatic peptide synthesis, CRC Press, Florida.
- Lemesre, J-L., D. Sereno, S. Daulouède, B. Veyret, N. Brajon, y P. Vincendeau. 1997. Leishmania spp.: nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically grown amastigote forms. Exp. Parasitol. 86: 58-68
- Mangoni ML (2006) Temporins, anti-infective peptides with expanding properties. Cell. Mol. Life Sci. 63: 1060-9.
- 5 Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65: 55-63.
- Rollins-Smith LA, Carey C, Conlon JM, Reinert LK, Doersam JK, Bergman T et al (2003) Activities of temporin family peptides against the chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) associated with global amphibian declines. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 1157-60.
- 10 Roy G, Dumas C, Sereno D, Wu Y, Singh AK, Tremblay MJ, Ouellette M, Olivier M, Papadopoulou B (2000) Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models. Mol. Biochem. Parasitol. 110: 195-206.
- Russell JA, Roy MK, Sanford JC (1992) Major improvements in biolistic transformation of suspension-cultured tobacco cells. In Vitro Cell. Dev. Biol., 28P, págs. 97-105.
- 15 Sambrook J, Russell D (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, tercera edición, Cold Spring Harbor.
- Sereno D, Lemesre JL (1997) Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 972-6.
- Siemens, J, Schieder O (1996) Transgenic plants: genetic transformation - recent developments and the state of the art. Plant Tissue Cult. Biotechnol. 2: 66-75.
- 20 Simmaco M, De Biase G, Severini C, Aita M, Falconieri G, Erspamer, Barra D, Bossa F (1990) Purification and characterization of bioactive peptides from skin extract of *Rana esculenta*. Biochem. Biophys. Acta 1033: 318- 23.
- Simmaco M, Mignogna G, Canofeni S, Miele R, Mangoni ML, Barra D (1996) Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. Eur. J. Biochem. 242: 788-92.
- 25 Vanhoye D, Bruston F, El Amri S, Ladram A, Amiche M, Nicolas P (2004) Membrane association, electrostatic sequestration and cytotoxicity of Gly-Leu-rich peptide orthologs with differing functions. Biochemistry 43: 8391-409.
- Yeaman MR, Yount NY (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacol. Rev. 55: 27-55.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6) INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT

- 5 <120> Análogos def temporina-SHa y usos de los mismos
 <130> B1684PC
- 10 <160> 30
 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
 <211> 13
- 15 <212> PRT
 <213> Pelophylax saharica
- <400> 1
 Phe Leu Ser Gly Ile Val Gly Met Leu Gly Lys Leu Phe
 1 5 10
- 20 <210> 2
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
 <223> Análogo de temporina-SHa
- <220>
- 30 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(3)
 <223> X es X1 y representa R, H o K
- <220>
- 35 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (6)..(6)
 <223> X es X2 y representa V, R, H o K
- <220>
- 40 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (8)..(8)
 <223> X es X3 y representa M, R, H o K
- <220>
- 45 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (13)..(13)
 <223> X es X4 y representa F, L, I o W
- <400> 2
 Phe Leu Xaa Gly Ile Xaa Gly Xaa Leu Gly Lys Leu Xaa
 1 5 10
- 50 <210> 3
 <211> 13
 <212> PRT
- 55 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Análogo [K3, K6]
- 60 <400> 3
 Phe Leu Lys Gly Ile Lys Gly Met Leu Gly Lys Leu Phe
 1 5 10

<210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Análogo [K3, K8]
 <400> 4
 Phe Leu Lys Gly Ile Val Gly Lys Leu Gly Lys Leu Phe
 10 1 5 10
 <210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Análogo [K3, L13]
 20 <400> 5
 Phe Leu Lys Gly Ile Val Gly Met Leu Gly Lys Leu Leu
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 13
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Análogo [K3, W13]
 30 <400> 6
 Phe Leu Lys Gly Ile Val Gly Met Leu Gly Lys Leu Trp
 1 5 10
 <210> 7
 35 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Analog [K3, I13]
 <400> 7
 Phe Leu Lys Gly Ile Val Gly Met Leu Gly Lys Leu Ile
 45 1 5 10
 <210> 8
 <211> 13
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Analog [K3, K6, L13]
 55 <400> 8
 Phe Leu Lys Gly Ile Lys Gly Met Leu Gly Lys Leu Leu
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 13
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Analog [K3, K6, W13]

<400> 9
 Phe Leu Lys Gly Ile Lys Gly Met Leu Gly Lys Leu Trp
 5 1 5 10

<210> 10
 <211> 13
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Analog [K3, K6, I13]

15 <400> 10
 Phe Leu Lys Gly Ile Lys Gly Met Leu Gly Lys Leu Ile
 1 5 10

20 <210> 11
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Analog [K3, K8, W13]

25 <400> 11
 Phe Leu Lys Gly Ile Val Gly Lys Leu Gly Lys Leu Trp
 1 5 10

30 <210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Analog [K3, K8, L13]

35 <400> 12
 Phe Leu Lys Gly Ile Val Gly Lys Leu Gly Lys Leu Leu
 1 5 10

40 <210> 13
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Analog [K3, K8, I13]

45 <400> 13
 Phe Leu Lys Gly Ile Val Gly Lys Leu Gly Lys Leu Ile
 1 5 10

50 <210> 14
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Análogo [K3, K6, K8]

<400> 14
 Phe Leu Lys Gly Ile Lys Gly Lys Leu Gly Lys Leu Phe
 60 1 5 10

<210> 15
 <211> 13
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Análogo [K3, K6, K8, L13]
 10 <400> 15
 Phe Leu Lys Gly Ile Lys Gly Lys Leu Gly Lys Leu Leu
 1 5 10

 <210> 16
 <211> 13
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Analog [K3, K6, K8, W13]
 20 <400> 16
 Phe Leu Lys Gly Ile Lys Gly Lys Leu Gly Lys Leu Trp
 1 5 10
 25 <210> 17
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Análogo [K3, K6, K8, I13]

 <400> 17
 35 Phe Leu Lys Gly Ile Lys Gly Lys Leu Gly Lys Leu Ile
 1 5 10

 <210> 18
 <211> 13
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Análogo de temporina-SHa en el que los residuos 3 y 6 están sustituidos
 45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(3)
 <223> X es X1 y representa R, H o K
 50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (6)..(6)
 <223> X es X2 y representa R, H o K
 55 <400> 18
 Phe Leu Xaa Gly Ile Xaa Gly Met Leu Gly Lys Leu Phe
 1 5 10

 <210> 19
 <211> 13
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>

ES 2 691 323 T3

<223> Análogo de temporina-SHa en el que los residuos 3 y 8 están sustituidos

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
5 <222> (3)..(3)
<223> X es X1 y representa R, H o K

<220>
10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (8)..(8)
<223> X es X3 y representa R, H o K

<400> 19
Phe Leu Xaa Gly Ile Val Gly Xaa Leu Gly Lys Leu Phe
1 5 10

15 <210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Análogo de temporina-SHa en el que los residuos 3 y 13 están sustituidos

<220>
25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (3)..(3)
<223> X es X1 y representa R, H o K

<220>
30 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (13)..(13)
<223> X es X4 y representa I, L o W

<400> 20
Phe Leu Xaa Gly Ile Val Gly Met Leu Gly Lys Leu Xaa
35 1 5 10

<210> 21
<211> 13
<212> PRT
40 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Análogo de temporina-SHa en el que los residuos 3, 6 y 8 están sustituidos

45 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (3)..(3)
<223> X es X1 y representa R, H o K

50 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (6)..(6)
<223> X es X2 y representa R, H o K

55 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (8)..(8)
<223> X es X3 y representa R, H o K

60 <400> 21
Phe Leu Xaa Gly Ile Xaa Gly Xaa Leu Gly Lys Leu Phe
1 5 10

<210> 22

- <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> Análogo de temporina-SHa en el que los residuos 3, 6 y 13 están sustituidos
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 10 <222> (3)..(3)
 <223> X es X1 y representa R, H o K
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 15 <222> (6)..(6)
 <223> X es X2 y representa R, H o K
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 20 <222> (13)..(13)
 <223> X es X4 y representa I, L o W
- <400> 22
 Phe Leu Xaa Gly Ile Xaa Gly Met Leu Gly Lys Leu Xaa
 1 5 10
- 25 <210> 23
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
 <223> Análogo de temporina-SHa en el que los residuos 3, 8 y 13 están sustituidos
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 35 <222> (3)..(3)
 <223> X es X1 y representa R, H o K
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 40 <222> (8)..(8)
 <223> X es X3 y representa R, H o K
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 45 <222> (13)..(13)
 <223> X es X4 y representa L, I o W
- <400> 23
 Phe Leu Xaa Gly Ile Val Gly Xaa Leu Gly Lys Leu Xaa
 50 1 5 10
- <210> 24
 <211> 50
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Precursor del análogo de temporina-SHa
- 60 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (38)..(38)
 <223> X es X1 y representa R, H o K

ES 2 691 323 T3

- 5
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (41)..(41)
 <223> X es X2 y representa V, R, H o K
- 10
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (43)..(43)
 <223> X es X3 y representa M, R, H o K
- 15
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (48)..(48)
 <223> X es X4 y representa F, L, I o W
- <400> 24
 Phe Leu Gly Thr Ile Asn Leu Ser Leu Cys Glu Gln Glu Arg Asp Ala
 1 5 10 15
- Asp Glu Glu Glu Arg Arg Asp Glu Pro Asn Glu Ser Asn Val Glu Val
 20 25 30
- Glu Lys Arg Phe Leu Xaa Gly Ile Xaa Gly Xaa Leu Gly Lys Leu Xaa
 35 40 45
- Gly Lys
 50
- 20
 <210> 25
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 25
 <220>
 <223> Análogo de temporina-SHa en el que los residuos 3, 6 y 8 y/o 13 están sustituidos y donde la secuencia está acortada por un aminoácido en el extremos N-terminal
- 30
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (2)..(2)
 <223> X es X1 y representa R, H o K
- 35
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (5)..(5)
 <223> X es X2 y representa V, R, H o K
- 40
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (7)..(7)
 <223> X es X3 y representa M, R, H o K
- 45
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (12)..(12)
 <223> X es X4 y representa F, L, I o W
- <400> 25
 Leu Xaa Gly Ile Xaa Gly Xaa Leu Gly Lys Leu Xaa
 1 5 10
- 50
 <210> 26
 <211> 11
 <212> PRT

ES 2 691 323 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Análogo de temporina-SHa en la que los residuos 3, 4, 7 y/o 10 están sustituidos y donde la secuencia está acortada por un aminoácido en el extremo N-terminal

5

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> X es X5 y representa S, R, H o K

10

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (3)..(3)
<223> X es X6 y representa G, R, H o K

15

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (6)..(6)
<223> X es X7 y representa G, R, H o K

20

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (9)..(9)
<223> X es X8 y representa G, R, H o K

25

<400> 28
Leu Xaa Xaa Ile Val Xaa Met Leu Xaa Lys Leu Phe
1 5 10

30

<210> 29
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35

<220>
<223> Analog [K3]

<400> 29
Phe Leu Lys Gly Ile Val Gly Met Leu Gly Lys Leu Phe
1 5 10

40

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45

<220>
<223> Análogo [K3(3-13)]

<400> 30
Lys Gly Ile Val Gly Met Leu Gly Lys Leu Phe
1 5 10

50

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de un tamaño comprendido entre 13 y 100 aminoácidos, que exhibe una actividad antimicrobiana y que comprende la secuencia F-L-X₁-G-I-X₂-G-X₃-L-G-K-L-X₄ (SEQ ID N°: 2), en la que
- X₁ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R, H y K,
- 5 X₂ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en V, R, H y K,
- X₃ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en M, R, H y K, y
- X₄ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F, I, L y W,
- con la condición de que cuando X₂ es V, X₃ se selecciona del grupo que consiste en K, R y H y/o X₄ se selecciona del grupo que consiste en L, I y W,
- 10 y los derivados funcionales y las sales farmacéuticamente aceptables de dicho péptido, en los que los derivados funcionales se seleccionan de retropéptidos, péptidos retro-inversos, y péptidos en los que la secuencia de SEQ ID N° :2 está acortada en 1 o 2 aminoácidos en el extremo N-terminal.
2. Un péptido según la reivindicación 1, en el que X₁ representa K, X₂ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en V y K, X₃ es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en M y K, y X₄ es un aminoácido seleccionado del grupo F, L y W.
- 15 3. Un péptido según la reivindicación 1 o 2, en el que el péptido comprende, o consiste en, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de SEQ ID N°: 3 a 17, preferiblemente del grupo que consiste en las secuencias de SEQ ID N°: 3 a 6, 8, 9, 11, 12 y 14 a 16, y más preferiblemente del grupo que consiste en las secuencias de SEQ ID N°: 3 a 6 y 8.
- 20 4. Un ácido nucleico que codifica un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Un casete de expresión que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 4.
6. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 4 o un casete de expresión según la reivindicación 5.
7. Una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 4, un casete de expresión según la reivindicación 5 o un vector de expresión según la reivindicación 6, en la que dicha célula hospedadora no es humana y no es embrionaria.
- 25 8. Una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y un soporte y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. Un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso como medicamento.
- 30 10. Un péptido para el uso según la reivindicación 9, en el que el medicamento se destina a tratar una infección debida a una bacteria, un virus, un hongo o un parásito.
11. Un péptido para el uso según la reivindicación 10, en el que el parásito pertenece al género *Leishmania*.
12. Un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un ácido nucleico según la reivindicación 4, un casete de expresión según la reivindicación 5 o un vector según la reivindicación 6 para el uso en el tratamiento de una infección microbiana.
- 35 13. El uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como desinfectante, conservante o plaguicida.
14. Un dispositivo médico o implante que comprende un cuerpo que tiene al menos una superficie revestida con o que incluye un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 40 15. Una planta transgénica que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 4, un casete de expresión según la reivindicación 5 o un vector según la reivindicación 6, y que es capaz de expresar o que expresa un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

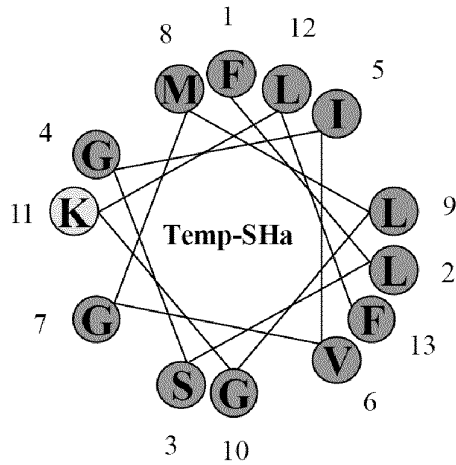


Figura 1

Péptido de la invención <i>Abreviatura usada</i>	Secuencia	<H>	<μH>	Carga neta
Temporina-SHa <i>SHa</i>	FLSGIVGMLGKLF _a (SEQ ID NO: 1)	3,46	0,72	+2
[K ³]temporina-SHa <i>K³</i>	FLKGVGMLGKLF _a (SEQ ID NO: 29)	3,03	0,78	+3
[K ³]temporina-SHa(3-13) <i>K³(3-13)</i>	--KGVGMLGKLF _a (SEQ ID NO: 30)	1,79	0,74	+3
[K ³ -K ⁶]temporina-SHa <i>[K³,K⁶]</i>	FLKGIKGM LGKLF _a (SEQ ID NO: 3)	1,96	0,77	+4
[K ³ ,K ⁸]temporina-SHa <i>[K³,K⁸]</i>	FLKGVGKLGKLF _a (SEQ ID NO: 4)	1,92	0,76	+4
[K ³ -L ¹³]temporina-SHa <i>[K³-L¹³]</i>	FLKGVGMLGKLL _a (SEQ ID NO: 5)	3,01	0,77	+3
[K ³ ,K ⁶ ,L ¹³]temporina-SHa <i>[K³,K⁶,L¹³]</i>	FLKGIKGM LGKLL _a (SEQ ID NO: 8)	1,93	0,76	+4
[K ³ ,W ¹³]temporina-SHa <i>[K³,W¹³]</i>	FLKGVGMLGKLW _a (SEQ ID NO: 6)	3,01	0,77	+3

Figura 2

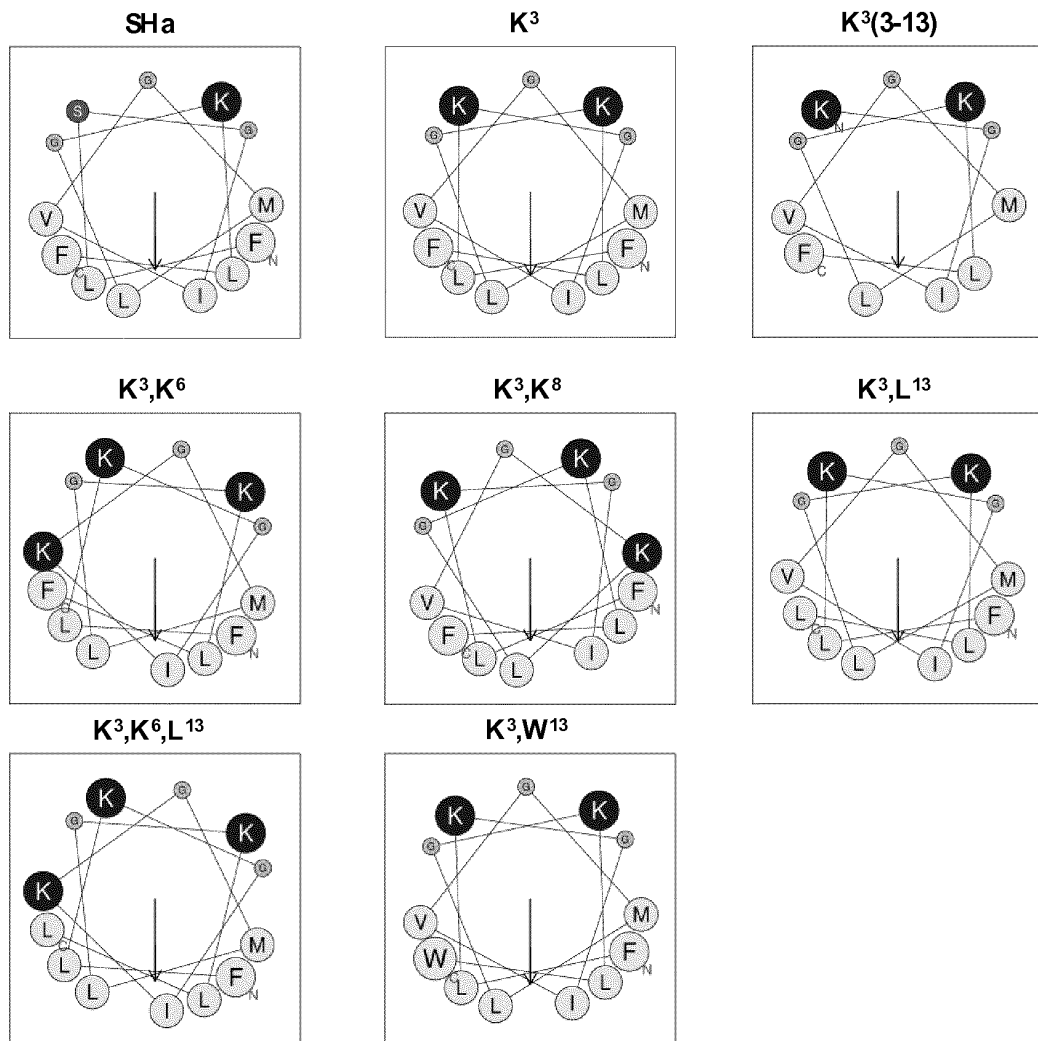


Figura 3

	SHa	K ³	K ³ (3-13)
Bacterias Gram-negativas (CIM, µM)			
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10	3	30
<i>E. coli</i> ML-35p	12	3	25
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	50	6	25
<i>S. enterica</i> (serotipo Enteritidis)	25	6	100
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	6	3	50
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	12	3	100
Bacterias Gram-positivas (CIM, µM)			
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3	3	40
<i>S. aureus</i> ST1065	6	3	40
<i>S. aureus</i> ATCC 43300 ^a	6	3	ND
<i>S. aureus</i> ATCC BAA-44 ^b	6	3	ND
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	6	1	50
<i>Listeria ivanovii</i>	6	3	12
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	12	6	> 200
Levaduras (CIM, µM)			
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	25	6	12
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	100	25	50
<i>S. cerevisiae</i>	12	3	12
Parásitos de <i>Leishmania</i> (CI₅₀, µM)			
Promastigotes de <i>L. infantum</i>	18	10	90
Células (CI₅₀ o CL₅₀, µM)			
Eritrocitos de rata (CL ₅₀ , µM)	25	26	618
Monocitos THP-1 humanos (CI ₅₀ , µM)	> 60	48	ND
Macrófagos THP-1 humanos (CL ₅₀ , µM)	> 60	47	ND
HepG2 (CL ₅₀ , µM)	560	358	ND
Fibroblastos humanos (CL ₅₀ , µM)	> 100	> 100	ND

Figura 4

ES 2 691 323 T3

	K ³ ,K ⁶	K ³ ,K ⁸	K ³ ,L ¹³	K ³ ,K ⁶ ,L ¹³	K ³ ,W ¹³
Bacterias Gram-negativas (CIM, µM)					
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12	12	6	12	3
<i>E. coli</i> ML-35p	3	6	3	6	3
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	12	12	12	12	6
<i>S. enterica</i> (serotipo Enteritidis)	50	25	6	50	6
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	25	25	6	25	6
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	25	25	6	50	3
Bacterias Gram-positivas (CIM, µM)					
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	6	6	3	12	3
<i>S. aureus</i> ST1065	6	6	3	12	3
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	3	3	3	6	3
<i>Listeria ivanovii</i>	6	12	3	12	3
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	50	50	12	100	6
Levaduras (CIM, µM)					
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	12	12	6	12	6
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	25	25	25	50	50
<i>S. cerevisiae</i>	6	6	3	6	6
Parásitos de <i>Leishmania</i> (CI₅₀, µM)					
Promastigotes de <i>L. infantum</i>	57	46	28	56	26
Células (CI₅₀ o CL₅₀, µM)					
Eritrocitos de rata (CL ₅₀ , µM)	590	530	45	> 800	32
Monocitos THP-1 humanos (CI ₅₀ , µM)	55	60	ND	51	ND
Macrófagos THP-1 humanos (CL ₅₀ , µM)	ND	ND	61	ND	25
HepG2 (CL ₅₀ , µM)	ND	ND	376	295	ND
Fibroblastos humanos (CL ₅₀ , µM)	ND	ND	ND	ND	ND

Figura 5