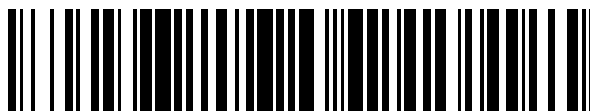


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 623**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2014 PCT/NL2014/050855**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15088344**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2014 E 14825457 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 3087092**

54 Título: **Péptido antimicrobiano y sus usos**

30 Prioridad:

12.12.2013 EP 13196989

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

28.11.2018

73 Titular/es:

**ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN H.O.D.N.
LUMC (50.0%)
Albinusdreef 2
2333 ZA Leiden, NL y
ACADEMISCH MEDISCH CENTRUM (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NIBBERING, PETRUS HENDRICUS;
DE BREIJ, ANNA;
CORDFUNKE, ROBERT ALEXANDER;
ZAAT, SEBASTIANUS ANTONIUS JOHANNES y
DRIJFHOUT, JAN WOUTER**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 691 623 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

Péptido antimicrobiano y sus usos

5 La invención se relaciona con el campo de la bioquímica y la medicina. Más específicamente la invención se refiere al campo de péptidos antimicrobianos y a contrarrestar las infecciones bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias.

10 Los péptidos antimicrobianos (AMP) son un componente esencial del sistema de defensa de los organismos en la naturaleza y ofrecen protección contra patógenos invasores. Muestran una potente actividad antimicrobiana contra bacterias grampositivas y gramnegativas, hongos, parásitos y virus. Los AMP más pequeños (usualmente alrededor de 15-40 aminoácidos) actúan fundamentalmente por disrupción de la estructura o función de las membranas celulares microbianas; no se dirigen a estructuras moleculares únicas definidas. Por lo tanto, contrario a los antibióticos convencionales, son eficaces independientemente de la actividad metabólica de las bacterias. Los AMP humanos, tales como las defensinas y catelicidina (LL-37), están presentes en leucocitos y son secretados por diversos epitelios en la piel y en superficies mucosales. Además de su actividad antimicrobiana, los AMP son importantes moléculas efectoras en la inflamación, la activación inmunitaria, y la cicatrización de heridas. Los AMP son bastante diversos en secuencia y estructura secundaria, pero comparten algunas propiedades comunes. Generalmente son catiónicos, anfipáticos y ejercen su efecto microbicida al comprometer la integridad de la membrana bacteriana. La interacción de los AMP con la superficie aniónica de la membrana de los microbios diana conduce a la permeabilización de la membrana, a la lisis celular y a la muerte. Generalmente se acepta que la membrana citoplásmica es la diana principal de la mayoría de los AMP, de manera que la acumulación de péptido en la membrana provoca un aumento de la permeabilidad y pérdida de la función de barrera, lo que resulta en fuga de los componentes citoplásmicos y muerte celular.

25 Los antibióticos convencionales matan a las bacterias por la unión a las dianas tal como un epítipo en la pared celular, o dianas en la proteína bacteriana y en la síntesis de ADN o ARN. Las bacterias patógenas desarrollan resistencia más rápidamente por la modificación de las dianas de los antibióticos de manera que los antibióticos ya no son capaces de unirse a estas dianas. Una ventaja fundamental de los AMP sobre los antibióticos convencionales es que la resistencia no se desarrolla fácilmente. Una razón para esto es que no se dirigen a estructuras moleculares únicas definidas (epítipos) como los antibióticos convencionales, sino que actúan sobre la membrana celular, matando a los microorganismos. Los AMP son particularmente útiles en contrarrestar las denominadas infecciones asociadas a biopelículas (BAI), que son aglomerados celulares de microorganismos unidos a una superficie, la mayoría bacterias pero también hongos. Las biopelículas contribuyen significativamente a la resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales. Las biopelículas se asocian a diversas condiciones patológicas en los seres humanos como la fibrosis quística, la colonización de dispositivos médicos implantados y la formación de placas dentales y heridas. Contrarrestar la infección asociada a biopelículas con antibióticos convencionales también es insuficiente por una serie de razones que incluyen la estimulación de la liberación de componentes microbianos proinflamatorios, insuficiente penetración de la biopelícula e inactivación o degradación en la sangre como resultado de la necesaria administración sistémica. Otras ventajas de los AMP sobre las bacterias convencionales incluyen el inicio rápido de la muerte, el hecho de ser biodegradables, lo que alivia la preocupación actual sobre los antibióticos residuales en el ambiente, y tienen una actividad antiinflamatoria concomitante.

45 Del conjunto potencial de cientos de péptidos naturales y sintéticos, relativamente pocos han avanzado a ensayos clínicos. Entre los ejemplos están péptido magainin, omiganan, OP-145, novexatin y lytxar. Solo dos AMP, daptomicina y DPK-060, están actualmente en desarrollo clínico. Para OP-145, que se denomina, además, P60.4Ac (Peptides, 2006; 27: 649-60), se han realizado ensayos clínicos hasta la fase 2. OP-145 es un péptido de 24 aminoácidos derivado del péptido antimicrobiano endógeno humano catelicidina LL-37. OP-145 se ha desarrollado como un péptido antimicrobiano neutralizante de endotoxinas para el tratamiento tópico de la otitis media crónica. Además de ser un péptido antimicrobiano, OP-145 neutraliza LPS.

50 Los AMP conocidos actualmente, que incluyen el OP-145, todavía tienen algunos inconvenientes. Por ejemplo, diversas bacterias, tales como *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes* y *S. aureus* todas secretan proteasas que degradan numerosos péptidos antimicrobianos, tal como la catelicidina LL-37. Por lo tanto, los péptidos antimicrobianos resistentes a proteasas son ventajosos desde un punto de vista terapéutico. Además, debido al efecto lítico potencial así como también a otras propiedades de los AMP contra las membranas bacterianas pero también las de mamíferos, uno de los desafíos en el diseño de nuevos péptidos se basa en el desarrollo de AMP con alta especificidad contra microorganismos, tales como células bacterianas o fúngicas, en comparación con las membranas celulares del paciente infectado, es decir, un alto índice terapéutico (mínima concentración hemolítica/mínima actividad antimicrobiana; MHC/MEC). Otra desventaja importante de los AMP conocidos, que incluyen el OP-145, es que su actividad se afecta fuertemente por la presencia de componentes plasmáticos. Por ejemplo, para OP-145 la LC99.9 (la concentración más baja del péptido que mata ≥ 99.9 % de las bacterias) en PBS es 1.6 μM , mientras que la LC99.9 en PBS/plasma (1:1) es aproximadamente 200 μM . Esto es una desventaja en particular para los AMP administrados por vía sistémica.

65 Numerosos mecanismos pueden ser responsables de la actividad significativamente menor de los AMP en presencia de plasma, como la inactivación de péptidos por los componentes plasmáticos, tal como la degradación enzimática o la no disponibilidad del péptido debido a la unión inespecífica a los componentes plasmáticos. Los AMP que son resistentes a

los componentes plasmáticos no solo son importantes como posible agente terapéutico sistémico, sino además para el tratamiento, por ejemplo, de heridas infectadas e infección e inflamación relacionadas con los implantes médicos. En particular en infecciones en tejidos profundos puede existir una actividad proteolítica alta, que puede conducir a una inactivación de los AMP que no son resistentes a la proteólisis. Los fluidos de las heridas crónicas tienen un exceso de proteasas y los materiales que se implantan rápidamente se cubren de componentes plasmáticos de los fluidos del huésped. Tanto las heridas crónicas como los implantes médicos se asocian frecuentemente con biopelículas microbianas. En particular en el tratamiento con antibióticos para las infecciones asociadas a biopelículas, la mayoría se administran por vía sistémica y por lo tanto tienden a degradarse enzimáticamente en la sangre y los tejidos adyacentes. Por lo tanto, debido a la sensibilidad a los componentes plasmáticos, la aplicabilidad de muchos AMP, incluido OP-145, se limitará, por ejemplo, a aplicaciones tópicas. Por lo tanto, hay una necesidad evidente de AMP alternativos, que sean resistentes a los componentes plasmáticos, particularmente como potenciales agentes terapéuticos sistémicos y/o como agentes terapéuticos eficaces contra infecciones asociadas a biopelículas, por ejemplo, en heridas crónicas e implantes médicos.

Un objeto de la presente invención es proporcionar péptidos antimicrobianos potentes y novedosos que superen las desventajas de los antibióticos convencionales y que tengan propiedades mejoradas con respecto a los péptidos antimicrobianos conocidos, en particular porque sean resistentes a los componentes plasmáticos. Otro objeto de la invención es proporcionar péptidos antimicrobianos que no sean alergénicos cuando se introduzcan en mamíferos, tal como los seres humanos, que tengan alta especificidad contra microorganismos patógenos y que tengan una actividad antimicrobiana particularmente alta contra microorganismos patógenos en infecciones asociadas a biopelículas. Los péptidos y polipéptidos de la invención ejercen actividades antimicrobianas potentes, de amplio espectro tanto contra microorganismos en biopelículas como contra microorganismos no organizados en biopelículas, tienen actividades antimicrobianas rápidas y pueden usarse como agentes terapéuticos, profilácticos o diagnósticos. Los polipéptidos y péptidos de la invención se diseñan para superar los problemas de duración limitada de la eficacia y de aplicabilidad limitada porque retienen su actividad antimicrobiana en sangre, en plasma y en suero, y en presencia de los componentes de los mismos.

Los presentes inventores encontraron que los péptidos P139-P163 que se basan en la secuencia LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRVPVR, son altamente eficaces contra bacterias grampositivas (resistentes a fármacos) (por ejemplo *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*) y bacterias gramnegativas (por ejemplo *Pseudomonas aeruginosa*) así como también contra hongos (*Candida albicans* y *Aspergillus niger*), véanse las Tablas 2-4 y 11, y las Figuras 1 y 2. Por lo tanto, los péptidos ejercen una actividad antimicrobiana de amplio espectro. Todos los péptidos son muy potentes, como se evidencia por sus bajos valores de IC_{99.9}, que en PBS son comparables con los de OP-145. Es importante señalar que se encontró que todos los péptidos fueron más eficaces que OP-145 en presencia de plasma. La mayoría de los péptidos fueron incluso considerablemente más potentes, con hasta 16 veces mayor actividad en presencia de plasma, que OP-145 (Tablas 2-4). Como se demostró en la Tabla 2, OP-145 tiene una IC_{99.9} en presencia de 50 % de plasma de 204.8 μM. P148 y P159 tienen una IC_{99.9} de 12.8 μM (aumento de 16 veces) en presencia de plasma. P140, P141, P144, P145, P150, P151, P152, P153, P158, P160, P161, P162 y P163 tienen una IC_{99.9} de 25.6 μM (aumento de 8 veces) en presencia de plasma. P139, P142, P143, P146, P147, P154, P156 y P157 tienen una IC_{99.9} de 51.2 μM (aumento de 4 veces) y P149 y P155 tienen una IC_{99.9} de 102.4 μM (aumento de 2 veces) en presencia de plasma.

Se demostró que P145, P148 y P159 fueron eficaces contra cultivos bacterianos tanto en la mitad de la fase logarítmica como en fase estacionaria (véanse las Tablas 2-4). Además, P145, P148 y P159 son capaces de inhibir la formación de biopelículas de *S. aureus* (véase la Figura 3). Además, P145, P148 y P159 tienen actividad inmunomoduladora demostrable porque neutralizan la endotoxina ácido lipoteicoico (LTA) y lipopolisacáridos (LPS), por lo tanto reducen la respuesta proinflamatoria (Tabla 12).

Además, se encontró que variantes más cortas de P148 que tienen al menos 16 aminoácidos, tienen una actividad antimicrobiana en PBS que es comparable con la de P148 (véase la Tabla 5). Es importante señalar que la actividad antimicrobiana en presencia de plasma también se conserva en estas variantes más cortas. Una variante más corta de P148 que tiene 14 aminoácidos tiene una actividad antimicrobiana reducida en comparación con P148, pero todavía es 5 veces más potente que OP-145 en presencia de plasma.

Por tanto, un polipéptido de acuerdo con la presente invención tiene actividad antimicrobiana alta contra microorganismos, tanto en presencia como en ausencia de plasma, ya sea residente en biopelículas o no, con óptima actividad antiinflamatoria (neutralización de compuestos microbianos) como se evidencia por la actividad neutralizante de LPS y LTA.

El efecto de los péptidos antimicrobianos de la invención sobre las infecciones asociadas a biopelículas es triple: prevendrán la formación de biopelículas y dispersarán las biopelículas existentes, matarán las bacterias, los hongos u otros microbios en el sitio de liberación y alrededor del mismo, y orquestarán respuestas inmunitarias mediante la neutralización de las endotoxinas proinflamatorias microbianas, tal como ácido lipoteicoico (LTA), peptidoglicano (PG) y lipopolisacáridos (LPS) y mediante la activación de macrófagos para aumentar sus actividades fagocíticas y microbicidas. Este control inmunitario es necesario para prevenir que el tejido adyacente a los implantes se convierta en un nicho novedoso para los patógenos.

- En consecuencia, la presente invención proporciona un polipéptido recombinante o aislado que comprende una secuencia de aminoácidos LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRVPVR, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos, dicho polipéptido tiene actividad antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, antifúngica y/o antiparasitaria, y tiene actividad antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, antifúngica y/o antiparasitaria *in vitro* contra al menos una especie microbiana en presencia de 50 % de plasma que es al menos 1.3 veces mayor que la actividad de OP-145 cuando se determina en las mismas condiciones, dicha variante de secuencia tiene al menos 14 aminoácidos y tiene opcionalmente:
- 1 a 8 de las siguientes sustituciones de aminoácidos:
 - sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de L, V, F, A, I, W, Y o Q por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo;
 - sustitución de R y/o K por A o un aminoácido cargado positivamente;
 - una o más sustituciones de un aminoácido por el D-aminoácido correspondiente; una o más sustituciones de un aminoácido por el aminoácido no natural correspondiente, de manera que dicho aminoácido no natural correspondiente es un derivado del aminoácido natural de referencia; y/o
 - una secuencia retroinversa de al menos 14 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia de aminoácidos, en donde dicha variante de secuencia tiene al menos una secuencia de aminoácidos KRLVKILKRWWRYL que tiene opcionalmente una o más sustituciones de aminoácidos como se definió anteriormente.

En las secuencias de aminoácidos o en sus variantes, como se define en la presente descripción, los aminoácidos se designan por los símbolos de una única letra. Los expertos en la técnica conocen bien estos símbolos de letras únicas y los símbolos de tres letras que tienen los siguientes significados: A (Ala) es alanina, C (Cys) es cisteína, D (Asp) es ácido aspártico, E (Glu) es ácido glutámico, F (Phe) es fenilalanina, G (Gly) es glicina, H (His) es histidina, I (Ile) es isoleucina, K (Lys) es lisina, L (Leu) es leucina, M (Met) es metionina, N (Asn) es asparagina, P (Pro) es prolina, Q (Gln) es glutamina, R (Arg) es arginina, S (Ser) es serina, T (Thr) es treonina, V (Val) es valina, W (Trp) es triptofano, Y (Tyr) es tirosina. Como se usa en la presente descripción, un "aminoácido cargado positivamente" se refiere a un aminoácido que tiene carga positiva a pH fisiológico, es decir a un pH de 7.3-7.4.

Un polipéptido de la invención tiene actividad antimicrobiana, preferentemente actividad antibacteriana, antiviral y/o antifúngica, con mayor preferencia actividad antibacteriana y/o antifúngica. Además, un polipéptido de la invención tiene, preferentemente, tanto actividad antimicrobiana como antiinflamatoria. El término "actividad antimicrobiana" de un polipéptido como se usa en la presente descripción se refiere a contrarrestar el crecimiento o la proliferación de al menos un microbio, por ejemplo una bacteria, un virus y/o un hongo, e incluye inhibición, reducción o prevención del crecimiento o la proliferación así como también matar al microbio. Un microbio es un organismo que es microscópico, es decir usualmente demasiado pequeño para ser visto a simple vista por el ojo humano. Los microbios son muy diversos, e incluyen bacterias, virus, hongos, arqueobacterias, protozoarios y algas microscópicas. De manera similar, los términos "actividad antibacteriana", "actividad antiviral", "actividad antifúngica" y "actividad antiparasitaria" como se usan en la presente descripción se refieren en general a contrarrestar el crecimiento o la proliferación de una bacteria, un virus, un hongo y un parásito respectivamente, e incluyen inhibición, reducción o prevención del crecimiento o la proliferación así como también matar a los microbios. La actividad antimicrobiana se expresa, por ejemplo, como la concentración inhibitoria (IC) o concentración letal (LC). ICx o LCx como se usan en la presente descripción se refieren a la concentración más baja del péptido que mata al menos x % de microbios después de 2 horas. Por ejemplo, IC99.9 y LC99.9 se refieren a la concentración más baja del péptido que mata ≥ 99.9 % de los microbios. Las actividades antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, antifúngica y antiparasitaria se pueden medir por métodos conocidos en la técnica.

Uno de tales métodos se detalla en los ejemplos de esta solicitud e involucra un ensayo *in vitro* para la determinación de la actividad antimicrobiana. En este método los microbios, *por ejemplo*, bacterias u hongos, se incuban, por ejemplo, durante 1-2 horas con diferentes concentraciones de un polipéptido de acuerdo con la invención, donde después la mezcla microbio polipéptido se incuba en o sobre un medio de cultivo adecuado para establecer el número de microbios que sobreviven y/o que mueren en comparación con una muestra de microbios que no se incubó con el polipéptido y que después se procesó de la misma manera.

Los ensayos de placas de virus se pueden usar para evaluar la actividad antiviral de un polipéptido de la invención. Brevemente, un inóculo viral se expone al polipéptido antes de la infección de una monocapa celular permisiva. Después de un intervalo estándar, se determina el título del virus en los extractos celulares mediante el uso de diluciones múltiples de estos extractos mediante la infección de monocapas de células frescas y la cuantificación de sus efectos sobre la monocapa de células.

Para la evaluación de la actividad antiparasitaria, un polipéptido de la invención y un parásito se incuban durante un intervalo de tiempo estándar. Después de eso, se puede analizar directamente la actividad metabólica de los parásitos, por ejemplo, por un ensayo MTT, o los parásitos se transfieren a células de mamífero y después de la incubación se evalúa la multiplicación del parásito en estas células mediante microscopía.

El término "actividad antiinflamatoria" de un polipéptido como se usa en la presente descripción se refiere a inhibir, reducir o prevenir una respuesta inflamatoria en un sujeto infectado por microbios, por ejemplo, bacterias, virus, hongos,

- y/o parásitos. La actividad antiinflamatoria de los polipéptidos de la invención se logra por la inhibición, reducción o prevención de la liberación de componentes proinflamatorios microbianos, tal como el ácido lipoteicoico (LTA), peptidoglicano (PG) y/o lipopolisacáridos (LPS). La actividad antiinflamatoria puede medirse por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de tales métodos son un ensayo de neutralización de LPS y un ensayo de neutralización de LTA, como se describe en los ejemplos de esta solicitud. En dicho método, un polipéptido de la invención se mezcla con una concentración fija de LPS o LTA, tal como 500 ng/ml de LPS o 2 mg/ml de LTA, y se incuba durante 30 min. Después de eso, se añaden estas mezclas a una dilución de sangre total humana fresca y 20 horas después se miden mediante ELISA los niveles de citocinas (por ejemplo, IL-8 para LTA e IL-12p40 para LPS) en la muestra de sangre.
- Los polipéptidos de la invención son resistentes al plasma, que se refiere también como plasma sanguíneo, preferentemente plasma humano. "Plasma" o "plasma sanguíneo" como se usa en la presente descripción tiene el significado común que se usa en la técnica. Se refiere a la porción fluida de sangre de la cual se extrajeron los eritrocitos, leucocitos y plaquetas, dicha porción incluye proteínas, hormonas y otros compuestos orgánicos e inorgánicos, tal como electrolitos. "Resistencia al plasma" como se usa en la presente descripción se define como que tiene una actividad *in vitro* antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, antifúngica y/o antiparasitaria contra al menos una especie microbiana en presencia de 50 % de plasma, preferentemente plasma humano, que es al menos 1.3 veces mayor que la actividad de OP-145 cuando se determina en las mismas condiciones. Preferentemente dicha actividad contra al menos una especie microbiana es al menos 1.5 veces mayor que la actividad de OP-145, con mayor preferencia al menos 2 veces, con mayor preferencia al menos 4 veces, con mayor preferencia al menos 5 veces la actividad de OP-145. Los polipéptidos que se prefieren particularmente tienen una actividad antimicrobiana contra al menos una especie microbiana que es al menos 16 veces mayor en presencia de 50 % de plasma que la actividad antimicrobiana de OP-145.
- Por "en presencia de 50 % de plasma" se entiende que la actividad antimicrobiana se mide cuando el polipéptido u OP-145 se incuban con microbios en líquido tal como PBS con adición de plasma, preferentemente plasma humano, a una concentración final de 50 %. Por "las mismas condiciones de la reacción" se entiende que las condiciones en las que se determina la actividad antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, antifúngica y/o antiparasitaria de un polipéptido de la invención son las mismas condiciones en que se determina la actividad antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, antifúngica y/o antiparasitaria de OP-145. Dichas condiciones incluyen, pero no se limitan, al tampón en que se incuban el polipéptido y los microbios, la identidad de las especies microbianas, la concentración de los microbios, el tiempo de incubación, la temperatura y la fuente de plasma que se usa.
- OP-145 tiene la secuencia JIGKEFKRIVERIKRFLRELVRPLRB, de manera que J es acetilo y B es amida. Un experto es perfectamente capaz de sintetizar OP-145 para poder comparar la actividad antimicrobiana de OP-145 con la de otros péptidos mediante el uso de métodos de síntesis en fase sólida que se emplean comúnmente, o técnicas recombinantes, como se describe en la presente descripción más adelante con más detalle. Además, la acetilación y la amidación son técnicas comunes que se usan en la técnica; por tanto, el experto es capaz de llevar a cabo la acetilación del extremo N-terminal y la amidación del extremo C-terminal de la cadena peptídica de OP-145.
- Como se detalla en la presente descripción, la actividad *in vitro* antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, antifúngica y/o antiparasitaria se expresa preferentemente como la IC99.9 o IC 50. "IC99.9" e "IC50" como se usan en la presente descripción se refieren a la concentración más baja del péptido que mata al menos 99.9 % o 50 %, respectivamente, de microbios dentro de determinado periodo, por ejemplo 2 horas. Preferentemente los polipéptidos de la invención tienen una IC99.9 *in vitro* contra al menos una especie microbiana en presencia de 50 % de plasma, que llega hasta 75 % mayor que la IC99.9 de OP-145 cuando se determina en las mismas condiciones. La IC99.9 *in vitro* contra al menos una especie microbiana en presencia de 50 % de plasma de un polipéptido de acuerdo con la invención es preferentemente hasta 70 % de la IC99.9 de OP-145 cuando se determina en las mismas condiciones, con mayor preferencia hasta 60 %, con mayor preferencia hasta 50 %, con mayor preferencia hasta 40 %, con mayor preferencia hasta 30 %, con mayor preferencia hasta 20 %, con la máxima preferencia hasta 10 %. Los polipéptidos que se prefieren particularmente tienen una IC99.9 *in vitro* contra al menos una especie microbiana en presencia de 50 % de plasma que es hasta 10 % de la IC99.9 de OP-145 cuando se determina en las mismas condiciones.
- Los polipéptidos de la invención preferentemente tienen una IC99.9 *in vitro* de hasta 150 μ M después de 2 horas a 37 °C contra al menos una especie microbiana en presencia de 50 % de plasma. Dicha IC99.9 se determina preferentemente de acuerdo con un método para determinar la actividad antimicrobiana, como se describe en la presente descripción en los ejemplos. Dicho método, que se describe en los ejemplos para determinar la actividad antimicrobiana de microbios no asociados a biopelículas, implica mezclar en un pocillo 50 μ L de una solución de un polipéptido en PBS, con la adición de plasma humano a una concentración final de 50 % y 20 μ L de una suspensión bacteriana con 5×10^6 CFU por ml de PBS. Después de la incubación de esta mezcla durante 2 horas a 37 °C en condiciones de agitación, se usa una muestra para la evaluación de los conteos bacterianos. La concentración más baja del péptido a la que mata 99.9 % de las bacterias, se denomina concentración inhibitoria (IC)99.9. Los conteos bacterianos pueden determinarse por conteo manual de CFU. Para determinar la actividad antibacteriana, por ejemplo, se usan 1×10^6 CFU/ml de bacterias, para determinar la actividad antifúngica, por ejemplo, se usan 1×10^5 células/ml.
- Para la determinación de la actividad antibiopelícula, el método que se describe en los ejemplos implica la determinación de la IC50 después de la incubación del polipéptido durante 24 horas a 37 °C con 1×10^8 CFU/ml de S.

aureus JAR060131 en BM2 ajustado a biopelículas en placas de polipropileno de 96 pocillos recubiertas con plasma por incubación durante toda la noche con 20 % de plasma a 4 °C, la eliminación de bacterias planctónicas por cuatro lavados con PBS y la tinción de las biopelículas con cristal violeta. Después de la solubilización con etanol, se determina la densidad óptica a 590 nm, como una medida de la masa de la biopelícula.

5 Los polipéptidos de la invención preferentemente tienen una IC99.9 *in vitro* de hasta 100 µM en presencia de 50 % de plasma, con mayor preferencia hasta 80 µM, con mayor preferencia hasta 51.2 µM, con mayor preferencia hasta 30 µM. Los polipéptidos que se prefieren de la invención tienen una IC99.9 de hasta 25.6 µM, como se definió en la presente descripción. Se prefieren particularmente los polipéptidos que tienen una IC99.9 *in vitro* de hasta 12.8 µM en presencia de 50 % de plasma contra al menos una especie microbiana.

15 Dicha al menos una especie microbiana es, por ejemplo, una especie bacteriana tal como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, una especie fúngica tal como *C. albicans* y *A. niger*, una especie parasitaria tal como *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii*, o una especie de virus tal como el virus de la hepatitis A, de la hepatitis C, de la Influenza A, etcétera. Preferentemente, un polipéptido de la invención tiene una IC99.9 *in vitro* de hasta 105 µM contra al menos una especie bacteriana o fúngica en presencia de 50 % de plasma, preferentemente contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* y/ *A. niger*, con la máxima preferencia un polipéptido de la invención tiene una IC99.9 *in vitro* de hasta 105 µM contra al menos *S. aureus*, con la máxima preferencia *S. aureus* JAR que se describe en Campoccia y otros. (Int J Artif Organs. 2008 Sep; 31(9): 841-7) en presencia de 50 % de plasma. Los polipéptidos que se prefieren de la invención tienen una IC99.9, como se definió en la presente descripción, contra *S. aureus* de hasta 25.6 µM, con mayor preferencia de hasta 12.8 µM.

25 Una variante de secuencia que se prefiere tiene como máximo una sustitución de un aminoácido por A. Este puede ser cualquier aminoácido, por ejemplo, un aminoácido en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 1 a 24. Como se demuestra en las Tablas 6-8, los polipéptidos en donde se sustituye un aminoácido por alanina mantienen al menos parte de su actividad antimicrobiana, mientras para algunos polipéptidos con sustituciones por alanina la actividad incluso aumenta.

30 También en la presente descripción se describe un polipéptido recombinante o aislado que comprende una secuencia de aminoácidos LKKLYKRLVKILKRWRYLKRVPVR, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos, dicho polipéptido tiene actividad antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, antifúngica y/o antiparasitaria y tiene una actividad *in vitro* antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, antifúngica y/o antiparasitaria en presencia de 50 % de plasma que es al menos 1.3 veces mayor que la actividad de OP-145 cuando se determina en las mismas condiciones, dicha variante tiene al menos 14 aminoácidos y tiene opcionalmente:

- 35 – una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos:
- sustitución de K por un aminoácido cargado positivamente, preferentemente por R, homolisina, homoarginina, ornitina, ácido diaminobutírico y ácido diaminopropiónico;
 - sustitución de R por un aminoácido cargado positivamente, preferentemente por K, homolisina, homoarginina, ornitina, ácido diaminobutírico y ácido diaminopropiónico;
 - 40 • sustitución de L por V, I o W;
 - sustitución de Y por W o Q;
 - sustitución de V por F o A;
 - sustitución de I por L;
 - sustitución de W por F, Y, L o I
- 45 – una o más sustituciones de un aminoácido por el D-aminoácido correspondiente;
- una o más sustituciones de un aminoácido por el aminoácido no natural correspondiente; y/o
- una secuencia retroinversa de al menos 14 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia de aminoácidos.

50 En la presente descripción también se describe un polipéptido recombinante o aislado que comprende una secuencia de aminoácidos LKKLYKRLVKILKRWRYLKRVPVR, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos, dicho polipéptido tiene actividad antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, antifúngica y/o antiparasitaria y tiene una actividad *in vitro* antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, antifúngica y/o antiparasitaria en presencia de 50 % de plasma que es al menos 1.3 veces mayor que la actividad de OP-145 cuando se determina en las mismas condiciones, dicha variante tiene al menos 14 aminoácidos y tiene opcionalmente:

- 55 – una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos:
- sustitución de K por A o un aminoácido cargado positivamente, preferentemente por A, R, homolisina, homoarginina, ornitina, ácido diaminobutírico y ácido diaminopropiónico;
 - sustitución de R por A o un aminoácido cargado positivamente, preferentemente por A, K, homolisina, homoarginina, ornitina, ácido diaminobutírico y ácido diaminopropiónico;
 - 60 • sustitución de L por A, V, I o W;
 - sustitución de Y por A, W o Q;
 - sustitución de V por F o A;
 - sustitución de I por A o L;

- sustitución de W por A, F, Y, L o I
- una o más sustituciones de un aminoácido por el D-aminoácido correspondiente;
- una o más sustituciones de un aminoácido por el aminoácido no natural correspondiente; y/o
- una secuencia retroinversa de al menos 14 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia de aminoácidos.

5

Dicha variante de secuencia, además, tiene preferentemente hasta una sustitución de un aminoácido por A. Este puede ser cualquier aminoácido, por lo tanto, un aminoácido en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 1 a 24 puede sustituirse por A.

10

Una variante de la secuencia de aminoácidos LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRVPVR como se usa en la presente descripción, tiene una longitud de al menos 14 aminoácidos y preferentemente una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos:

15

- sustitución de K por un aminoácido cargado positivamente, preferentemente por R, homolisina, homoarginina, ornitina, ácido diaminobutírico y ácido diaminopropiónico, con mayor preferencia por R;
- sustitución de R por un aminoácido cargado positivamente, preferentemente por K, homolisina, homoarginina, ornitina, ácido diaminobutírico y ácido diaminopropiónico, con mayor preferencia por K;

20

- sustitución de L por V, I o W;
- sustitución de Y por W o Q;
- sustitución de V por F o A;
- sustitución de I por L;
- sustitución de W por F, Y, L o I
- sustitución de uno o más aminoácidos por el D-aminoácido correspondiente
- sustitución de uno o más aminoácidos por el aminoácido no natural correspondiente. Preferentemente, dicha variante de secuencia tiene hasta 14 de dichas sustituciones, con mayor preferencia hasta 10 de dichas sustituciones, tal como hasta 9, hasta 8, hasta 7, hasta 6, hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 de dichas sustituciones.

25

Preferentemente dicha variante de secuencia opcionalmente tiene una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos:

30

- sustitución de K en la posición aminoacídica 2 por R
- sustitución de K en la posición aminoacídica 3 por R
- sustitución de L en la posición aminoacídica 4 por V
- sustitución de Y en la posición aminoacídica 5 por W
- sustitución de L en la posición aminoacídica 8 por V
- sustitución de V en la posición aminoacídica 9 por F o A
- sustitución de K en la posición aminoacídica 10 por R
- sustitución de I en la posición aminoacídica 11 por L
- sustitución de L en la posición aminoacídica 12 por I o W
- sustitución de W en la posición aminoacídica 15 por F, Y, L o I
- sustitución de W en la posición aminoacídica 16 por F, Y, L o I
- sustitución de Y en la posición aminoacídica 18 por Q
- sustitución de K en la posición aminoacídica 20 por R
- sustitución de R en la posición aminoacídica 21 por K

40

sustitución de uno o más aminoácidos por el D-aminoácido correspondiente. En la presente descripción, la numeración de las posiciones de los aminoácidos es de la siguiente manera:

45

L₁K₂K₃L₄Y₅K₆R₇L₈V₉K₁₀I₁₁L₁₂K₁₃R₁₄W₁₅W₁₆R₁₇Y₁₈L₁₉K₂₀R₂₁P₂₂V₂₃R₂₄. Dicha variante, además, tiene preferentemente opcionalmente una o más, con mayor preferencia hasta una sustitución de un aminoácido por A. Este puede ser cualquier aminoácido, por lo tanto, un aminoácido en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 1 a 24 puede sustituirse por A.

50

Preferentemente, una variante de secuencia como se definió en la presente descripción tiene hasta 15 de dichas sustituciones de aminoácidos, con mayor preferencia hasta 10 de dichas sustituciones de aminoácidos, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de dichas sustituciones. Además, una variante de secuencia como se definió en la presente descripción, preferentemente comprende al menos una secuencia de aminoácidos KRLVKILKRWWRYL, es decir los aminoácidos 6 a 19, que tiene opcionalmente una o más de dichas sustituciones de aminoácidos. Por lo tanto, se proporciona un polipéptido recombinante o aislado que comprende una secuencia de aminoácidos

55

LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRVPVR, o que comprende una variante de dicha secuencia de aminoácidos, dicho polipéptido tiene actividad antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, antifúngica y/o antiparasitaria y tiene una actividad *in vitro* antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, antifúngica y/o antiparasitaria contra al menos una especie microbiana en presencia de 50 % de plasma, que es al menos 1.3 veces mayor que la actividad de OP-145 cuando se

60

determina en las mismas condiciones,

dicha variante de secuencia tiene al menos una secuencia de aminoácidos KRLVKILKRWRYL que opcionalmente tiene:

- 1 a 8 de las siguientes sustituciones de aminoácidos:
 - sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de L, V, F, A, I, W, Y o Q por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo;
 - sustitución de R y/o K por A o un aminoácido cargado positivamente;
- una o más sustituciones de un aminoácido por el D-aminoácido correspondiente;
- una o más sustituciones de un aminoácido por el aminoácido no natural correspondiente; y/o
- una secuencia retroinversa de al menos 14 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia de aminoácidos.

Se prefiere, además, una variante de secuencia que tiene al menos una de dichas sustituciones de aminoácidos.

Un polipéptido que se prefiere de acuerdo con la invención comprende una secuencia de aminoácidos de los péptidos P139, P140, P141, P142, P143, P144, P145, P146, P147, P148, P149, P150, P151, P152, P153, P154, P155, P156, P157, P158, P159, P160, P161, P162 o P163 como se representan en la Tabla 1, porque estos péptidos tienen alta actividad antimicrobiana en PBS y tienen una actividad antimicrobiana mayor en presencia de plasma en comparación con el péptido OP-145. Preferentemente, dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de los péptidos P139, P140, P141, P142, P145, P146, P147, P148, P150, P151, P152, P153, P154, P156, P157, P158, P159, P160, P161, P162 o P163 como se representan en la Tabla 1, porque estos péptidos tienen al menos 4 veces mayor actividad en presencia de plasma en comparación con OP-145. Con mayor preferencia, dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de los péptidos P140, P141, P145, P148, P150, P151, P152, P153, P158, P159, P160, P161, P162 o P163 como se representan en la Tabla 1, porque estos péptidos tienen al menos 8 veces mayor actividad en presencia de plasma en comparación con OP-145.

Un polipéptido de la invención que se prefiere particularmente comprende la secuencia de aminoácidos LKRLYKRLAKLIKRLYRYLKKPVR, que es la secuencia de aminoácidos del péptido P145, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos, dicha variante de secuencia tiene al menos 14 aminoácidos y opcionalmente tiene una o más sustituciones de un aminoácido por el D-aminoácido correspondiente y/o por el aminoácido no natural correspondiente y/u opcionalmente tiene una secuencia retroinversa de al menos 14 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia de aminoácidos, con mayor preferencia dichos polipéptidos comprenden al menos los aminoácidos 14-19 de la secuencia de aminoácidos LKRLYKRLAKLIKRLYRYLKKPVR, con la máxima preferencia dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos LKRLYKRLAKLIKRLYRYLKKPVR. Dicho polipéptido se prefiere particularmente porque el péptido P145 tiene una actividad antimicrobiana potente, de amplio espectro, tanto en presencia como en ausencia de suero, y propiedades antiinflamatorias.

Otro polipéptido de la invención que se prefiere particularmente comprende una secuencia de aminoácidos LKRWWKRVFKLLKRYWRQLKKPVR, que es la secuencia de aminoácidos del péptido P148, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos, dicha variante de secuencia tiene al menos 14 aminoácidos y opcionalmente tiene una o más sustituciones de un aminoácido por el D-aminoácido correspondiente y/o por el aminoácido no natural correspondiente y/u opcionalmente tiene una secuencia retroinversa de al menos 14 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia de aminoácidos, con mayor preferencia dichos polipéptidos comprenden al menos los aminoácidos 14-19 de la secuencia de aminoácidos LKRWWKRVFKLLKRYWRQLKKPVR, con la máxima preferencia dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos LKRWWKRVFKLLKRYWRQLKKPVR, RWWKRVFKLLKRYWRQLKKPVR, LKRWWKRVFKLLKRYWRQLKKP, RWWKRVFKLLKRYWRQLKK, WKRVFKLLKRYWRQLKKPVR, LKRWWKRVFKLLKRYWRQLK, VWKRVFKLLKRYWRQLKK, WKRVFKLLKRYWRQLK, KRVFKLLKRYWRQL. Estas son las secuencias de aminoácidos del péptido P148, P325, P326, P327, P328, P329, P330, P331 y P332. Dicho polipéptido se prefiere particularmente porque el péptido P148 tiene una actividad antimicrobiana potente, de amplio espectro, tanto en presencia como en ausencia de suero, y propiedades antiinflamatorias, y los péptidos P325, P326, P327, P328, P329, P330, P331 y P332 conservan la actividad del péptido P148.

Otro polipéptido de la invención que se prefiere particularmente comprende la secuencia de aminoácidos LKRLYKRVFRLKRYRQLRRPVR, que es la secuencia de aminoácidos del péptido P159, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos, dicha variante de secuencia tiene al menos 14 aminoácidos y opcionalmente tiene una o más sustituciones de un aminoácido por el D-aminoácido correspondiente y/o por el aminoácido no natural correspondiente y/u opcionalmente tiene una secuencia retroinversa de al menos 14 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia de aminoácidos, con mayor preferencia dichos polipéptidos comprenden al menos los aminoácidos 14-19 de la secuencia de aminoácidos LKRLYKRVFRLKRYRQLRRPVR, con la máxima preferencia dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos LKRLYKRVFRLKRYRQLRRPVR. Dicho polipéptido se prefiere particularmente porque el péptido P159 tiene una actividad antimicrobiana potente, de amplio espectro, tanto en presencia como en ausencia de suero, y propiedades antiinflamatorias.

Otro polipéptido que se prefiere de acuerdo con la invención comprende una secuencia de aminoácidos de los péptidos P246, P247, P248, P249, P250, P251, P252, P253, P254, P255, P256, P257, P258, P259, P260, P261, P262, P263, P264, P265, P266, P267, P268, P269, P270, P271, P272, P273, P274, P275, P276, P277, P278, P279, P280, P281, P282, P283, P284, P285, P286, P287, P288, P289, P290, P291, P292, P293, P294, P295, P296, P297, P298, P299,

P300, P301, P302, P303, P304, P305, P306, P307, P308, P309, P310, P311, P312, P313, P314, P315, P316 o P317 como se representan en las Tablas 6, 7 y 8, porque estos péptidos tienen alta actividad antimicrobiana en PBS y tienen mayor actividad antimicrobiana en presencia de plasma en comparación con el péptido OP-145. Los polipéptidos que tienen tales secuencias de aminoácidos son variantes de los polipéptidos P145, P148 o P159 en donde un aminoácido se sustituye por A. Un polipéptido de la invención que se prefiere particularmente tiene la secuencia de aminoácidos del péptido P276, una variante del P148 en donde R en la posición 7 se sustituye por A.

Un polipéptido que se prefiere de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos de un polipéptido que se selecciona de la tabla 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, y/o 10. Un polipéptido de acuerdo con la invención con mayor preferencia comprende la secuencia de aminoácidos LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRVPV o una variante de esta que tiene una concentración letal (LC) 99.9 en 50 % de plasma de hasta 102.4 μM seleccionada de las Tablas 2 o 5-10. En una modalidad, se proporciona un polipéptido que tiene una LC 99.9 en 50 % de plasma de hasta 51.2 μM seleccionada de las Tablas 2 o 5-10, con mayor preferencia de hasta 51.2 μM .

Alternativamente, o además de las sustituciones de un aminoácido por otro aminoácido como se describió anteriormente, una variante de la secuencia de aminoácidos LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRVPV como se definió en la presente descripción puede contener una o más sustituciones de un L-aminoácido por su D-aminoácido correspondiente o por el D-aminoácido correspondiente a un L-aminoácido que está presente en dicha secuencia de aminoácidos después de una o más de las sustituciones de aminoácidos que se indicaron anteriormente. Los aminoácidos que se indican en la presente descripción por un símbolo de una única letra mayúscula, tal como A para alanina, son aquellos L-aminoácidos que se encuentran comúnmente en proteínas de origen natural. El "D-aminoácido correspondiente" como se usa en la presente descripción se define como el D-aminoácido contraparte de un L-aminoácido. Por ejemplo, el D-aminoácido correspondiente de alanina (A) es D-alanina (a), el D-aminoácido correspondiente de arginina (R) es D-arginina (r), el D-aminoácido correspondiente de asparagina (N) es D-asparagina (n), etcétera. Todos los L-aminoácidos de una variante de secuencia, como se definió en la presente descripción, pueden sustituirse por sus D-aminoácidos correspondientes. Por tanto, en la presente descripción se describe un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRVPV, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos, dicho polipéptido tiene actividad antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiparasitaria y/o antiinflamatoria, dicha variante de secuencia tiene al menos 14 aminoácidos y opcionalmente tiene:

- una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos:
 - sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de L, V, F, A, I, W, Y o Q por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo o por el D-aminoácido correspondiente de los aminoácidos L, V, F, A, I, W, Y o Q;
 - sustitución de R por un aminoácido cargado positivamente, preferentemente por K, homolisina, homoarginina, ornitina, ácido diaminobutírico y ácido diaminopropiónico, o por el D-aminoácido correspondiente de K o R;
 - sustitución de K por un aminoácido cargado positivamente, preferentemente por R, homolisina, homoarginina, ornitina, ácido diaminobutírico y ácido diaminopropiónico, o por el D-aminoácido correspondiente de R o K;
- una o más sustituciones de un aminoácido por el D-aminoácido correspondiente. Tales variantes de secuencia pueden, además, tener sustitución de uno o más aminoácidos, preferentemente hasta un aminoácido, que se selecciona de K y R sustituido por A, o por el D-aminoácido correspondiente. Preferentemente, dicha variante de secuencia opcionalmente tiene una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos:
 - sustitución de K por R o por el D-aminoácido correspondiente de R;
 - sustitución de R por K o por el D-aminoácido correspondiente de K;
 - sustitución de L por V, I o W o por el D-aminoácido correspondiente de los aminoácidos V, I o W;
 - sustitución de Y por W o Q o por el D-aminoácido correspondiente de los aminoácidos W o Q;
 - sustitución de V por F o A o por el D-aminoácido correspondiente de los aminoácidos F o A;
 - sustitución de I por L o por el D-aminoácido correspondiente de L;
 - sustitución de W por F, Y, L o I o por el D-aminoácido correspondiente de los aminoácidos L F, Y, L o I;
- una o más sustituciones de un aminoácido por el D-aminoácido correspondiente.

Con mayor preferencia, dicha variante de secuencia tiene opcionalmente una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos

- sustitución de K en la posición aminoacídica 2 por R o por el D-aminoácido correspondiente de R;
- sustitución de K en la posición aminoacídica 3 por R o por el D-aminoácido correspondiente de R;
- sustitución de L en la posición aminoacídica 4 por V o por el D-aminoácido correspondiente de V;
- sustitución de Y en la posición aminoacídica 5 por W o por el D-aminoácido correspondiente de W;
- sustitución de L en la posición aminoacídica 8 por V o por el D-aminoácido correspondiente de V;
- sustitución de V en la posición aminoacídica 9 por F o A o por el D-aminoácido correspondiente de los aminoácidos F o A;
- sustitución de K en la posición aminoacídica 10 por R o por el D-aminoácido correspondiente de R;
- sustitución de I en la posición aminoacídica 11 por L o por el D-aminoácido correspondiente de L;

- sustitución de L en la posición aminoacídica 12 por I o W o por el D-aminoácido correspondiente de los aminoácidos I o W;
- sustitución de W en la posición aminoacídica 15 por F, Y, L o I o por el D-aminoácido correspondiente de los aminoácidos F, Y, L o I;
- 5 – sustitución de W en la posición aminoacídica 16 por F, Y, L o I o por el D-aminoácido correspondiente de los aminoácidos F, Y, L o I;
- sustitución de Y en la posición aminoacídica 18 por Q o por el D-aminoácido correspondiente de Q;
- sustitución de K en la posición aminoacídica 20 por R o por el D-aminoácido correspondiente de R;
- sustitución de R en la posición aminoacídica 21 por K o por el D-aminoácido correspondiente de K;
- 10 – sustitución de un aminoácido por un D-aminoácido correspondiente.

Una variante de la secuencia de aminoácidos LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRVPVR como se definió en la presente descripción puede contener hasta 24 sustituciones de un L-aminoácido por su D-aminoácido correspondiente. Por tanto, la variante de secuencia puede consistir totalmente en D-aminoácidos. Por ejemplo, la variante de secuencia puede contener 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones de un L-aminoácido por su D-aminoácido correspondiente. Preferentemente, dicha variante de secuencia, que tiene una o más sustituciones de un L-aminoácido por su D-aminoácido correspondiente, comprende al menos 14 aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de los péptidos P139, P140, P141, P142, P143, P144, P145, P146, P147, P148, P149, P150, P151, P152, P153, P154, P155, P156, P157, P158, P159, P160, P161, P162 o P163 como se representan en la Tabla 1. Con mayor preferencia un polipéptido de la invención que comprende opcionalmente una o más sustituciones de un L-aminoácido por su D-aminoácido correspondiente comprende una secuencia de aminoácidos de los péptidos P145, P148 o P159. En un aspecto, una variante de secuencia, como se definió en la presente descripción, contiene una sustitución de un aminoácido por su D-aminoácido correspondiente. La posición del D-aminoácido en la secuencia de aminoácidos es irrelevante. En otro aspecto, la variante de secuencia contiene la sustitución de todos los L-aminoácidos por sus D-aminoácidos correspondientes. Una variante de secuencia como se definió en la presente descripción puede ser, además, el péptido retroinverso de al menos 14 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRVPVR o de una secuencia de aminoácidos de uno de los péptidos P139-163, preferentemente de P145, P148 o P159. Preferentemente dicha variante de secuencia es un péptido retroinverso de la longitud completa de dicha secuencia de aminoácidos, preferentemente de la secuencia de aminoácidos de uno de los péptidos P139-163, con mayor preferencia de P145, P148 o P159. Un péptido retroinverso es un péptido que consiste en los D-aminoácidos en la secuencia inversa de una secuencia de aminoácidos de referencia. Por ejemplo, una variante de secuencia preferida de la invención es el péptido retroinverso de la secuencia de aminoácidos de P145, P148 o P159, es decir que tiene la secuencia rvpkklyrlyrkilkrlyrkl, rvpkklyrlyrklkrlyrkrkl o rvprllqyryrklkrlyrkrkl, respectivamente, o al menos 14 aminoácidos de una de dichas secuencias.

Una variante de la secuencia de aminoácidos LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRVPVR, como se definió en la presente descripción, puede comprender hasta 5 sustituciones de un aminoácido por un aminoácido no natural, o de un aminoácido que está presente en dicha secuencia de aminoácidos después de una o más sustituciones de aminoácidos indicadas anteriormente por un aminoácido no natural. "Aminoácido no natural" como se usa en la presente descripción, se refiere a los aminoácidos no codificados genéticamente, independientemente de si aparecen en la naturaleza o no. Los aminoácidos no naturales que pueden estar presentes en una variante de una secuencia de aminoácidos, como se definió en la presente descripción, incluyen: β -aminoácidos; p-acil-L-fenilalanina; N-acetil lisina; O-4-alil-L-tirosina; ácido 2-aminoadípico; ácido 3-aminoadípico; beta-alanina; 4-terc-butil hidrógeno 2-azidosuccinato; ácido beta-aminopropiónico; ácido 2-aminobutírico; ácido 4-aminobutírico; ácido 2, 4,-diamino butírico; ácido 6-aminocaproico; ácido 2-aminoheptanoico; ácido 2-aminoisobutírico; ácido 3-aminoisobutírico; ácido 2-aminopimélico; p-aminofenilalanina; ácido 2, 3-diaminobutírico; ácido 2, 3-diamino propiónico; ácido 2, 2'-diaminopimélico; p-amino-L-fenilalanina; p-azido-L-fenilalanina; D-alilglicina; p-benzoil-L-fenilalanina; 3-benzotienil alanina p-bromofenilalanina; t-butilalanina; t-butilglicina; 4-clorofenilalanina; ciclohexilalanina; ácido cisteico; D-citrulina; tio-L-citrulina; desmosina; ácido épsilon-amino hexanoico; N-etilglicina; N-etilasparagina; 2-fluorofenilalanina; 3-fluorofenilalanina; 4-fluorofenilalanina; homoarginina; homocisteína; homoserina; hidroxilisina; alo- hidroxilisina; 3-(3-metil-4-nitrobenzil)-L-histidina metil éster; isodesmosina; alo-isoleucina; isopropil-L-fenilalanina; 3-metil-fenilalanina; N-metilglicina; N-metilisoleucina; 6-N-metillisina; O-metil-L-tirosina; N-metilvalina; sulfóxido de metionina; 2-naftilalanina; L-3-(2-naftil)alanina; isoserina; 3-fenilserina; norvalina; norleucina; 5,5,5-trifluoro-DL-leucina; ornitina; 3-cloro-tirosina; N5-carbamoylornitina; penicilamina; fenilglicina; ácido piperidínico; piridilalanina; ácido 1, 2, 3, 4-tetrahidro-isoquinolina-3-carboxílico; beta-2-tienilalanina; ácido γ -carboxi-DL-glutámico; ácido 4-fluoro-DL-glutámico; D-tiroxina; alo-treonina; 5-hidroxi-triptofano; 5-metoxi-triptofano; 5-fluoro-triptofano; 3-fluoro-valina.

Preferentemente, se sustituye un aminoácido natural de dicha secuencia por el aminoácido no natural correspondiente. Como se usa en la presente descripción, el "aminoácido no natural correspondiente" se refiere a un aminoácido no natural que es un derivado del aminoácido natural de referencia. Por ejemplo, un aminoácido natural se sustituye por el β -aminoácido correspondiente. Los β -aminoácidos tienen sus grupos amino unidos al carbono β en lugar del carbono α como en los aminoácidos naturales. Por ejemplo, α -alanina se sustituye por β -alanina, etcétera. Otros ejemplos de sustitución de un aminoácido natural por un aminoácido no natural que es un derivado de dicho aminoácido natural son los siguientes. La alanina, por ejemplo, se sustituye por beta-alanina, t-butilalanina, 2-naftilalanina; L-3-(2-naftil)alanina, ácido 2-aminoisobutírico. La arginina, por ejemplo, se sustituye por homoarginina, ornitina, N5-carbamoylornitina, ácido

3-amino-propiónico. La asparagina, por ejemplo, se sustituye por N-etilasparagina. El ácido aspártico, por ejemplo, se sustituye por 4-terc-butil hidrógeno 2-azidosuccinato. La cisteína, por ejemplo, se sustituye por ácido cisteico, homocisteína. El ácido glutámico, por ejemplo, se sustituye por ácido γ -carboxi-DL-glutámico; ácido 4-fluoro-DL-glutámico. La glutamina, por ejemplo, se sustituye por D-citrulina, tio-L-citrulina. La glicina, por ejemplo, se sustituye por N-metilglicina, t-butilglicina, N-metilglicina, D-alilglicina. La histidina, por ejemplo, se sustituye por 3-(3-metil-4-nitrobenzil)-L-histidina metil éster. La isoleucina, por ejemplo, se sustituye por isodesmosina, N-metilisoleucina, alo-isoleucina. La leucina, por ejemplo, se sustituye por norleucina, desmosina, 5,5,5-trifluoro-leucina. La lisina, por ejemplo, se sustituye por 6-N-metilisina, ácido 2-aminoheptanoico, N-acetil lisina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina. La metionina, por ejemplo, se sustituye por sulfóxido de metionina. La fenilalanina, por ejemplo, se sustituye por p-amino-L-fenilalanina, 3-benzotienil alanina p-bromofenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, 2-fluorofenilalanina, 3-fluorofenilalanina, 4-fluorofenilalanina. La prolina, por ejemplo, se sustituye por 3-hidroxi prolina, 4-hidroxi prolina, 1-acetil-4-hidroxi-L-prolina. La serina, por ejemplo, se sustituye por homoserina, isoserina, 3-fenilserina. La treonina, por ejemplo, se sustituye por D-tiroxina, alo-treonina. El triptofano, por ejemplo, se sustituye por 5-hidroxi-triptofano, 5-metoxi-triptofano, 5-fluoro-triptofano. La tirosina, por ejemplo, se sustituye por O-metil-L-tirosina, O-4-alil-L-tirosina, 3-cloro-tirosina. La valina, por ejemplo, se sustituye por norvalina, N-metilvalina, 3-fluoro-valina.

Por tanto, en la presente descripción se describe un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRVPV, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos, dicho polipéptido tiene actividad antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiparasitaria y/o antiinflamatoria, dicha variante de secuencia tiene al menos 14 aminoácidos y opcionalmente tiene:

- una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos:
 - sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de L, V, F, A, I, W, Y o Q por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo o por un aminoácido no natural correspondiente de los aminoácidos L, V, F, A, I, W, Y o Q;
 - sustitución de R por K o por un aminoácido no natural correspondiente de K;
 - sustitución de K por R o por un aminoácido no natural correspondiente de K;
- una o más sustituciones de un aminoácido por el D-aminoácido correspondiente. Tales variantes de secuencia, además, pueden tener la sustitución de uno o más aminoácidos, preferentemente hasta un aminoácido, seleccionado de K y R sustituido por un aminoácido no natural correspondiente A. Preferentemente, dicha variante de secuencia tiene opcionalmente una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos:
 - sustitución de K por R o por un aminoácido no natural correspondiente de R;
 - sustitución de R por K o por un aminoácido no natural correspondiente de K;
 - sustitución de L por V, I o W o por un aminoácido no natural correspondiente de los aminoácidos V, I o W;
 - sustitución de Y por W o Q o por un aminoácido no natural correspondiente de los aminoácidos W o Q;
 - sustitución de V por F o A o por un aminoácido no natural correspondiente de los aminoácidos F o A;
 - sustitución de I por L o por un aminoácido no natural correspondiente de L;
 - sustitución de W por F, Y, L o I o por un aminoácido no natural correspondiente de los aminoácidos L, F, Y, L o I;
- una o más sustituciones de un aminoácido por un aminoácido no natural correspondiente.

Con mayor preferencia, dicha variante de secuencia tiene opcionalmente una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos

- sustitución de K en la posición aminoacídica 2 por R o por un aminoácido no natural correspondiente de R;
- sustitución de K en la posición aminoacídica 3 por R o por un aminoácido no natural correspondiente de R;
- sustitución de L en la posición aminoacídica 4 por V o por un aminoácido no natural correspondiente de V;
- sustitución de Y en la posición aminoacídica 5 por W o por un aminoácido no natural correspondiente de W;
- sustitución de L en la posición aminoacídica 8 por V o por un aminoácido no natural correspondiente de V;
- sustitución de V en la posición aminoacídica 9 por F o A o por un aminoácido no natural correspondiente de los aminoácidos F o A;
- sustitución de K en la posición aminoacídica 10 por R o por un aminoácido no natural correspondiente de R;
- sustitución de I en la posición aminoacídica 11 por L o por un aminoácido no natural correspondiente de L;
- sustitución de L en la posición aminoacídica 12 por I o W o por un aminoácido no natural correspondiente de los aminoácidos I o W;
- sustitución de W en la posición aminoacídica 15 por F, Y, L o I o por un aminoácido no natural correspondiente de los aminoácidos F, Y, L o I;
- sustitución de W en la posición aminoacídica 16 por F, Y, L o I o por un aminoácido no natural correspondiente de los aminoácidos F, Y, L o I;
- sustitución de Y en la posición aminoacídica 18 por Q o por un aminoácido no natural correspondiente de Q;
- sustitución de K en la posición aminoacídica 20 por R o por un aminoácido no natural correspondiente de R;
- sustitución de R en la posición aminoacídica 21 por K o por un aminoácido no natural correspondiente de K;
- sustitución de un aminoácido por un D-aminoácido correspondiente.

Un polipéptido puede consistir en una secuencia de aminoácidos LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRVPVR o una variante de esta secuencia, como se definió en la presente descripción. Como se usa en la presente descripción, un "polipéptido" se refiere a péptidos, polipéptidos y peptidomiméticos que comprenden múltiples aminoácidos. Los términos "polipéptido" y "péptido" se usan indistintamente en la presente descripción. El polipéptido más pequeño de acuerdo con la invención que demostró tener actividad antimicrobiana tiene una longitud de 14 aminoácidos. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos, o variante de esta, pueden ser parte de un polipéptido más grande, es decir de un polipéptido que se ha extendido en el extremo N terminal y/o en el extremo C terminal por uno o más aminoácidos adicionales. La secuencia de aminoácidos, o variante de esta, de un polipéptido de la invención puede modificarse en el extremo N terminal y/o en el extremo C terminal, preferentemente por comprender un grupo alargador N- y/o C-terminal. Alternativamente, dicha secuencia de aminoácidos o una variante de esta se extiende en el extremo N y/o C terminal. Un polipéptido de acuerdo con la invención comprende, por lo tanto, al menos 14 aminoácidos, y puede comprender hasta 1000 aminoácidos. Sin embargo, se prefieren polipéptidos más pequeños para mantener los costos de producción tan bajos como sea posible. Preferentemente, un polipéptido de acuerdo con la invención tiene 14-200 aminoácidos de longitud, con mayor preferencia 14-100 aminoácidos, con mayor preferencia 14-50 aminoácidos. Por ejemplo, un polipéptido de acuerdo con la invención comprende 14 a 24 aminoácidos, es decir 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 aminoácidos. Preferentemente, dicho polipéptido comprende al menos 16 aminoácidos, tal como 16-200, 16-100 o 16-50 aminoácidos. Dicho polipéptido preferentemente tiene 14-24 aminoácidos. Dicho polipéptido que tiene 14-24 aminoácidos puede tener, además, una modificación N-terminal y/o C-terminal, tal como una modificación N-terminal seleccionada del grupo que consiste en un residuo acetilo, hexanoilo, decanoilo, miristoilo, $\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{11}-\text{CO}-\text{y}$ propionilo y/o tal como una modificación C-terminal seleccionada del grupo que consiste en un grupo amida-, $\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{11}-\text{CO}-\text{amida-}$ y uno o dos grupos amino-hexanoilo. En una modalidad, un polipéptido de la invención consiste en la secuencia de aminoácidos LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRVPVR o una variante de esta, como se definió en la presente descripción, que consiste preferentemente en la secuencia de aminoácidos de P145, P148 o P159, como se representan en la Tabla 1, o al menos 14 aminoácidos de estas, que tiene opcionalmente una modificación N-terminal y/o C-terminal, que comprende, preferentemente, un grupo alargador N- y/o C-terminal.

Como se usa en la presente descripción, "peptidomimético" se refiere a un compuesto que contiene elementos estructurales no peptídicos, dicho compuesto mimetiza las propiedades antimicrobianas, antibacterianas, antivirales, antifúngicas, antiparasitarias y/o antiinflamatorias de un polipéptido de la invención. Por tanto, un polipéptido de la invención puede comprender elementos estructurales no peptídicos. Tales elementos estructurales no peptídicos pueden estar presentes en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la invención como resultado de una sustitución o modificación de uno o más aminoácidos de dicha secuencia. Alternativamente, un polipéptido de la invención puede comprender elementos estructurales no peptídicos fuera de la secuencia de aminoácidos LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRVPVR, o en una variante de esta, como se definió en la presente descripción, es decir en los grupos alargadores opcionales N- y/o C-terminal. Un elemento estructural no peptídico en un peptidomimético es típicamente una modificación de uno o más de los aminoácidos existentes. Los peptidomiméticos que se prefieren se obtienen por modificación estructural de los polipéptidos de la invención, por ejemplo, mediante el uso de aminoácidos no naturales tal como se definió en la presente descripción anteriormente, restricciones conformacionales, ciclización del polipéptido, reemplazo isostérico u otras modificaciones. La secuencia de aminoácidos de un polipéptido de acuerdo con la invención comprende, por lo tanto, opcionalmente, una o más modificaciones. Tal polipéptido puede modificarse por procesos naturales, tal como procesamiento postraduccional, o por técnicas de modificación química. Las modificaciones pueden insertarse en cualquier ubicación en dicho polipéptido, que incluye la cadena polipeptídica principal, las cadenas laterales de aminoácidos y en los extremos N- o C-terminal. Un único polipéptido puede contener múltiples tipos de modificaciones o numerosas modificaciones de un tipo único. Las modificaciones incluyen acetilación, amidación, acilación, fosforilación, metilación, desmetilación, ADP-ribosilación, formación de enlaces disulfuro, ubiquitinación, gamma-carboxilación, glicosilación, hidroxilación, yodinación, oxidación, pegilación y sulfatación. Además, un polipéptido de acuerdo con la invención puede proporcionarse con una etiqueta, tal como biotina, fluoresceína o flavina, un lípido o derivado de lípido, un grupo de azúcar. Un polipéptido de acuerdo con la invención puede, además, proporcionarse con un resto de direccionamiento.

En una modalidad preferida, un polipéptido de acuerdo con la invención está modificado en el extremo N terminal y/o en el extremo C terminal. Un polipéptido de la invención, por lo tanto, comprende preferentemente un grupo alargador N- y/o C-terminal. Los grupos alargadores N- y C-terminal que pueden usarse en un polipéptido de la invención se conocen bien en la técnica. Ejemplos que se prefieren de una modificación N-terminal son residuos de un acetilo, un hexanoilo, un decanoilo, un miristoilo, un $\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{11}-\text{CO}-$ y un propionilo. Ejemplos que se prefieren de una modificación C-terminal son un amida-, un $\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{11}-\text{CO}-\text{amida-}$, y uno o dos grupos amino-hexanoilo. Sin embargo, otros grupos alargadores N- o C-terminal también producirán compuestos activos que conocen los expertos en la técnica. En una modalidad dicho polipéptido comprende un residuo N-terminal acetilo, hexanoilo, decanoilo, miristoilo, $\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{11}-\text{CO}-$ o propionilo y un grupo C-terminal amida, $\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{11}-\text{CO}-\text{amida-}$, y uno o dos grupos amino-hexanoilo. En una modalidad, se proporciona un polipéptido de acuerdo con la invención, en donde el extremo N-terminal está acetilado y el extremo C-terminal está amidado. Por lo tanto en la presente descripción se describe un polipéptido recombinante o aislado que comprende una secuencia de aminoácidos LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRVPVR, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos, dicho polipéptido tiene actividad antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiparasitaria y/o antiinflamatoria, dicha variante de secuencia tiene al menos 14 aminoácidos y opcionalmente tiene una o más, preferentemente hasta 10, de las siguientes sustituciones de aminoácidos:

- sustitución de K en la posición aminoacídica 2 por R;
- sustitución de K en la posición aminoacídica 3 por R;
- sustitución de L en la posición aminoacídica 4 por V;
- sustitución de Y en la posición aminoacídica 5 por W;
- 5 – sustitución de L en la posición aminoacídica 8 por V;
- sustitución de V en la posición aminoacídica 9 por F o A;
- sustitución de K en la posición aminoacídica 10 por R;
- sustitución de I en la posición aminoacídica 11 por L;
- sustitución de L en la posición aminoacídica 12 por I o W;
- 10 – sustitución de W en la posición aminoacídica 15 por F, Y, L o I;
- sustitución de W en la posición aminoacídica 16 por F, Y, L o I;
- sustitución de Y en la posición aminoacídica 18 por Q;
- sustitución de K en la posición aminoacídica 20 por R;
- sustitución de R en la posición aminoacídica 21 por K; y/o
- 15 – sustitución de uno o más aminoácidos por el D-aminoácido correspondiente, en donde dicha secuencia de aminoácidos o dicha variante de esta comprende un grupo alargador N- y/o C-terminal, que comprende preferentemente un residuo N-terminal acetilo, hexanoilo, decanoilo, miristoilo, NH-(CH₂-CH₂-O)₁₁-CO- o propionilo y un grupo C-terminal amida-, NH-(CH₂-CH₂-O)₁₁-CO-amida-, y uno o dos grupos amino-hexanoilo. Para un experto en la técnica será evidente que otros grupos alargadores N- o C-terminal también producirán compuestos activos. En la presente descripción, la numeración de los aminoácidos es de la siguiente manera:
 20 L₁K₂K₃L₄Y₅K₆R₇L₈V₉K₁₀I₁₁L₁₂K₁₃R₁₄W₁₅W₁₆R₁₇Y₁₈L₁₉K₂₀R₂₁P₂₂V₂₃R₂₄. Dicho polipéptido comprende preferentemente una secuencia de aminoácidos de P145, P148 o P159, como se representa en la Tabla 1, o al menos 14 aminoácidos de esta. Además, dicho polipéptido preferentemente tiene 14-24 aminoácidos.

25 En una modalidad preferida, un polipéptido de acuerdo con la invención comprende un resto hidrófobo. La adición de grupos hidrófobos a (poli)péptidos catiónicos mejora sus capacidades para neutralizar las endotoxinas microbianas y para interactuar con las membranas microbianas y por lo tanto mejora sus capacidades para eliminar microbios, por ejemplo, patógenos.

30 Como se describió anteriormente en la presente descripción, un polipéptido de acuerdo con la invención puede modificarse por técnicas de modificación química conocidas en la técnica. Las modificaciones de los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden introducirse durante o al final de la síntesis del polipéptido. Por ejemplo, cuando el polipéptido se sintetiza mediante el uso de la técnica de síntesis en fase sólida, la acetilación N-terminal puede realizarse al final mediante la reacción de la secuencia de aminoácidos, que está todavía unida a la resina, con ácido acético. Como otro ejemplo, la amidación C-terminal se lleva a cabo, por ejemplo, mediante el uso de un tipo especial
 35 de resina en la síntesis del péptido en fase sólida, tal como el Tentagel SAM (ex Rapp, Tübingen, Alemania) disponible comercialmente. Estas resinas comprenden una sujeción química a partir de la cual se liberan los (poli)péptidos amidados durante la escisión. Cualquier experto en la técnica conoce estos y otros métodos de modificación de polipéptidos.

40 En una modalidad preferida, un polipéptido de acuerdo con la invención comprende un péptido de penetración a la célula. Dicho péptido de penetración a la célula es una secuencia peptídica que, cuando se une a un péptido antimicrobiano de la invención, facilita la translocación eficiente del polipéptido a través de las membranas celulares. Cualquier péptido de penetración a la célula conocido en la técnica puede usarse en un polipéptido de la invención.

45 Ejemplos de péptidos de penetración a la célula incluyen, pero no se limitan a, poliarginina, TAT, HIV-Tat, R9-TAT, Pep-1, Pep-7, penetratina, transportan, Antp, Rev, proteína de cubierta de FHV, buforina II, MAP, K-FGF, Ku70, SynBI, HN-1, TP10, pVEC, BGSC, y BGTC.

50 Un polipéptido de la invención es preferentemente un polipéptido que no se produce como tal en la naturaleza. Es decir, un polipéptido de la invención es preferentemente un polipéptido de origen no natural. "De origen no natural" como se usa en la presente descripción, significa que el polipéptido no se encuentra en la naturaleza en esa forma, preferentemente que la secuencia de aminoácidos del polipéptido no se encuentra en la naturaleza.

55 También se proporciona un multímero de un polipéptido de la invención que comprende hasta seis polipéptidos de la invención, que comprenden preferentemente la secuencia de aminoácidos de P145, P148 o P159 o al menos 14 aminoácidos de esta. Dicho multímero puede comprender hasta seis monómeros de polipéptidos que tienen la misma secuencia de aminoácidos o hasta seis monómeros de polipéptidos, de manera que dos o más monómeros de polipéptidos tienen diferentes secuencias de aminoácidos. En una modalidad preferida, un multímero de acuerdo con la invención comprende hasta seis polipéptidos de acuerdo con la invención que tienen la misma secuencia de
 60 aminoácidos.

También se proporcionan las sales de los polipéptidos de acuerdo con la invención. Tales sales incluyen, pero no se limitan a, sales por adición de ácido y sales por adición de base. Como se usa en la presente descripción, "sal

farmacéuticamente aceptable" de un polipéptido se refiere a una sal que retiene la actividad antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitaria y/o antiinflamatoria deseada del polipéptido, y es adecuada para una administración a los seres humanos o animales. En la técnica se conocen métodos para la preparación de sales de polipéptidos y generalmente implican la mezcla del polipéptido con un ácido o base farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, mediante la reacción de las formas libres de ácido o base del producto con uno o más equivalentes del ácido o la base apropiados en un solvente o medio en el cual la sal es insoluble, o en un solvente tal como agua que luego se elimina *al vacío* o mediante liofilización o mediante intercambio de los cationes de una sal existente por otro catión en una resina adecuada de intercambio iónico. Los ejemplos de ácidos y bases farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos orgánicos e inorgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido maleico, ácido malónico, ácido trifluoroacético, ácido cinámico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fosfórico, y ácido tiocianico, que forman sales de amonio con los grupos amino libres de los polipéptidos, y bases que forman sales de carboxilato con los grupos carboxílicos libres de los polipéptidos, tal como etilamina, metilamina, dimetilamina, trietilamina, isopropilamina, diisopropilamina, y otros mono-, di- y trialkilaminas, y arilaminas.

Los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden prepararse mediante diversos métodos. Por ejemplo, un polipéptido puede sintetizarse por métodos de síntesis en fase sólida que se usan comúnmente, por ejemplo métodos que involucran protección de los grupos alfa-amino con t-BOC o Fmoc, que se conocen bien en la técnica. Aquí, los aminoácidos se añaden secuencialmente a una cadena de aminoácidos en crecimiento. Tales métodos se describen, por ejemplo, en Merrifield (1963), J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2156; y Atherton y otros, "Solid Phase Peptide Synthesis," IRL Press, London, (1989). Los métodos de síntesis en fase sólida son particularmente adecuados para la síntesis de polipéptidos de longitud relativamente corta, tal como polipéptidos con una longitud de hasta aproximadamente 70 aminoácidos en producción a gran escala.

Alternativamente, un polipéptido de la invención puede prepararse mediante el uso de técnicas recombinantes bien conocidas en la técnica en las cuales una secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido se expresa en células huésped. La invención, por lo tanto, proporciona un método para la preparación de un polipéptido de acuerdo con la invención, que comprende:

- proporcionar una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención;
- transformar una célula huésped con dicha molécula de ácido nucleico;
- cultivar dicha célula huésped en condiciones que permiten la expresión de dicho polipéptido;
- cosechar dicho polipéptido a partir de dichas células;
- opcionalmente, modificar dicho polipéptido en el extremo N terminal o en el extremo C terminal, por ejemplo, mediante la adición de un grupo alargador N- y/o C-terminal.

La invención proporciona, además, una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención, que también se refiere en la presente descripción como una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Como se usa en la presente descripción, una molécula de ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico de la invención comprende una cadena de nucleótidos, preferentemente ADN y/o ARN.

Además, se proporciona un vector que comprende una molécula con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención. El término "vector" como se usa en la presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido, bacteriófago o virus animal, capaz de introducir una secuencia de ácido nucleico heteróloga en una célula huésped. Un vector de acuerdo con la invención permite la expresión o producción de un polipéptido de la invención, que está codificado por la secuencia de ácido nucleico heteróloga en una célula huésped. Un vector que se usa de acuerdo con la invención, por ejemplo, se deriva de un virus animal, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, virus vaccinia (que incluye los derivados atenuados tales como el virus Vaccinia Ankara modificado, MVA), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), adenovirus o retrovirus. Un vector de acuerdo con la invención comprende preferentemente un casete de expresión que comprende un promotor adecuado para iniciar la transcripción de un polipéptido de acuerdo con la invención en las células huésped seleccionadas. Los ejemplos de promotores adecuados para la expresión de los polipéptidos de acuerdo con la invención en células eucariotas huésped incluyen, pero no se limitan a, promotor de beta-actina, promotor de inmunoglobina, promotor de ARN 5S, o promotores derivados de virus tales como promotores de citomegalovirus (CMV), virus del sarcoma de Rous (RSV) y virus de simios 40 (SV40) para huéspedes mamíferos.

Además, la invención proporciona una célula huésped recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico y/o un vector de acuerdo con la invención. Una "célula huésped" es una célula que se ha transformado, o que es capaz de una transformación, por una molécula de ácido nucleico, tal como un vector de acuerdo con la invención. El término "transformación" se refiere a la introducción de un ácido nucleico extraño en una célula receptora. La transformación de una célula huésped puede resultar en una expresión transitoria de una proteína recombinante por dicha célula, lo que significa que la proteína recombinante se expresa solamente por un período de tiempo definido. Alternativamente, la transformación de una célula receptora puede resultar en la expresión estable, lo que significa que el ácido nucleico se introduce en el genoma de la célula y así pasa a las siguientes generaciones de células. Además, se puede lograr la

expresión inducible de una proteína recombinante. Un sistema de expresión inducible requiere la presencia o ausencia de una molécula que permite la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención. Los ejemplos de sistemas de expresión inducibles incluyen, pero no se limitan a, los sistemas de expresión Tet-On y Tet-Off, sistemas de expresión génica inducibles por hormonas tales como, por ejemplo, un sistema de expresión génica inducible por ecdisona, un sistema de expresión génica inducible por arabinosa, y un sistema de expresión inducible por *Drosophila* mediante el uso de un vector pMT/BiP (Invitrogen) que comprende un promotor inducible de metalotioneína. Una célula huésped que se usa en un método para la preparación de un polipéptido de acuerdo con la invención es, por ejemplo, una procariota grampositiva, una procariota gramnegativa o una eucariota. Preferentemente dicha célula huésped es una célula eucariota, tal como una célula vegetal, una célula de levadura, una célula de mamífero o una célula de insecto, con la máxima preferencia una célula de insecto o una célula de mamífero. Los ejemplos de células huésped adecuadas incluyen células vegetales tales como, células de maíz, células de arroz, células de lenteja de agua, células de tabaco (tales como las células BY-2 o NT-1), y células de papa. Ejemplos de células de levadura son *Saccharomyces* y *Pichia*. Ejemplos de células de insectos son, células de *Spodoptera frugiperda*, tales como las células Tn5, SF-9 y SF-21, y células de *Drosophila*, tales como células *Drosophila* Schneider 2 (S2). Los ejemplos de células de mamífero que son adecuadas para expresar un polipéptido de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, células de riñón de mono verde africano (Vero), células de riñón de hámster bebé (tal como BHK-21), células de la retina humana (por ejemplo, células PerC6), células de riñón embrionario humano (tal como las células HEK293), células Madin Darby de riñón canino (MDCK), fibroblastos de embrión de pollo (CEF), células de riñón de embrión de pollo (células CEK), células madre embrionarias derivadas de blastodermo (por ejemplo, EB14), fibroblastos de embrión de ratón (tal como las células 3T3), células de ovario de hámster chino (CHO), y derivados de estos tipos celulares.

Un método de acuerdo con la invención comprende preferentemente, además, una etapa de cosechar, purificar y/o aislar los polipéptidos de acuerdo con la invención. Los polipéptidos que se obtienen de acuerdo con la invención se usan preferentemente en terapia humana, opcionalmente después de etapas adicionales de purificación, aislamiento o procesamiento, por ejemplo, purificación mediante el uso de electroforesis en gel o métodos de cromatografía

Un polipéptido de acuerdo con la invención muestra un número de actividades que pueden usarse ventajosamente tanto en aplicaciones terapéuticas como no terapéuticas. En particular, los polipéptidos de acuerdo con la invención son útiles para contrarrestar diversas infecciones microbianas, tales como infecciones bacterianas, infecciones fúngicas, infecciones virales, y para contrarrestar infecciones parasitarias. La presente invención proporciona, por tanto, composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de acuerdo con la invención o una sal farmacéuticamente aceptable de este y al menos un vehículo, diluyente, y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de ácido nucleico o un vector de acuerdo con la invención y al menos un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona, además, un polipéptido de acuerdo con la invención para usar como un medicamento. Además, se proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención, para usar como medicamento. Dicho medicamento puede ser un agente terapéutico o profiláctico.

En un aspecto, la descripción describe un método para el tratamiento de un sujeto que padece de o está en riesgo de padecer de una infección bacteriana, fúngica, viral y/o parasitaria, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad con eficacia terapéutica de un polipéptido de acuerdo con la invención, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención. También se describe un método para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto con una infección microbiana o para la profilaxis de una infección microbiana. En un aspecto preferido, dicho microbio es una bacteria, un hongo, un virus o un parásito. Además, se proporciona un polipéptido y/o molécula de ácido nucleico para usar de acuerdo con la invención en la prevención o el tratamiento de una infección microbiana, bacteriana, fúngica, viral y/o parasitaria o de una afección resultante de una infección microbiana, bacteriana, fúngica, viral y/o parasitaria.

Como se usa en la presente descripción, un "sujeto" es un ser humano o un animal. Los sujetos incluyen, pero no se limitan a, mamíferos tales como seres humanos, cerdos, hurones, focas, conejos, gatos, perros, vacas y caballos, y aves tales como pollos, patos, gansos y pavos. En una modalidad preferida de la invención, el sujeto es un mamífero. En una modalidad particularmente preferida, el sujeto es un ser humano.

La invención también proporciona un método para inhibir el crecimiento de un microbio, por ejemplo, una bacteria, un virus, un hongo, o un parásito que comprende poner en contacto dicho microbio o parásito con un polipéptido o composición farmacéutica de acuerdo con la invención. Dicho contacto puede realizarse *in vivo* e *in vitro*.

Los polipéptidos y composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención son eficaces para tratar una variedad de infecciones microbianas, tales como diversas infecciones virales, bacterianas y fúngicas. Por ejemplo, los polipéptidos y composiciones farmacéuticas son eficaces para tratar bacterias gramnegativas y grampositivas. Los ejemplos de bacterias patógenas que pueden provocar infecciones en seres humanos o animales, que son tratables con polipéptidos y composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, las bacterias *Listeria*, *Escherichia*, *clamydia*,

ricketsias, micobacterias, estafilococos, estreptococos, neumonococos, meningococos, Klebsiella, pseudomonas, Legionella, difteria, salmonella, bacilos, Vibrio cholerae, tetanus, Clostridium, Bacillus, Yersinia, y Leptospira.

Ejemplos de virus patogénicos que pueden provocar infecciones en seres humanos o animales, que son tratables con polipéptidos y composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, hepatitis A, B o C, herpes virus (por ejemplo VZV, HSV-I, HAV-6, HSV-II, CMV, virus de Epstein Barr), adenovirus, virus de influenza, flavivirus, ecovirus, rinovirus, virus coxsackie, coronavirus, virus sincitial respiratorio (RSV), rotavirus, Morbilivirus, virus de rubeola, parvovirus, virus vaccinia, virus de HTLV, virus del dengue, papillomavirus, poliovirus, virus de rabia y virus de inmunodeficiencia humana (virus HIV; por ejemplo, tipo I y II).

Los ejemplos de hongos patogénicos que pueden provocar infecciones en seres humanos o animales, que son tratables con polipéptidos y composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, Candida (por ejemplo, albicans, krusei, glabrata, tropicalis), Aspergillus (por ejemplo, fumigatus, niger), *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, Genus Mucorales, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, y *Coccidioides immitis*.

Los ejemplos de parásitos patogénicos que pueden provocar infecciones en seres humanos o animales, que son tratables con polipéptidos y composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, *Entamoeba histolytica*, Plasmodium (por ejemplo, falciparum, vivax), Entamoeba, Giardia, *Balantidium coli*, Acanthamoeba, Criptosporidium sp., *Pneumocystis carinii*, *Babesia microti*, Tripanosoma (por ejemplo brucei, cruzi), Leishmania (por ejemplo donovani), y *Toxoplasma gondii*.

En una modalidad preferida, los polipéptidos y las composiciones farmacéuticas de la invención son eficaces para tratar infecciones provocadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) y *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, (no resistentes), la bacteria gramnegativa *Pseudomonas aeruginosa* y las especies fúngicas *Candida albicans* y *Aspergillus niger*.

Las composiciones que contienen los polipéptidos pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, los polipéptidos o las composiciones se administran a un sujeto, preferentemente un ser humano que ya padece de una enfermedad, en una cantidad suficiente para contrarrestar los síntomas de la infección o la afección resultante de la infección y sus complicaciones. En aplicaciones profilácticas, los polipéptidos o las composiciones se administran a un sujeto, por ejemplo, un ser humano o animal, que está en riesgo de padecer una infección microbiana o parasitaria, en una cantidad suficiente para prevenir la infección o al menos inhibir el desarrollo de una infección. El polipéptido está presente típicamente en una composición farmacéutica de acuerdo con la invención en una cantidad terapéutica, que es una cantidad suficiente para curar una afección o enfermedad, particularmente los síntomas asociados con una infección microbiana o parasitaria. Las dosis típicas de administración de un polipéptido de acuerdo con la invención, o combinaciones de al menos dos de estos, están entre 0.01 y 10 mg de polipéptido por kg de peso corporal, en dependencia del tamaño del polipéptido.

Los polipéptidos y la composición farmacéutica de la invención son adecuados para una amplia variedad de aplicaciones. Por ejemplo, pueden usarse para aplicación tópica, por ejemplo, en el tratamiento o prevención de infecciones de la piel, infecciones de heridas e infecciones del sistema urinario. Como se detalló en la presente descripción anteriormente, los polipéptidos de la invención son capaces de prevenir la formación de biopelículas y de dispersar las biopelículas existentes, matar las bacterias, hongos u otros microbios en el sitio de formación de la biopelícula, y alrededor de este, y modular las respuestas inmunitarias mediante la neutralización de las endotoxinas microbianas proinflamatorias. Las biopelículas bacterianas pueden retrasar la cicatrización de heridas cutáneas y reducir la eficacia antibacteriana por vía tópica de los antibióticos convencionales en la cicatrización o el tratamiento de heridas infectadas de la piel, infecciones de la piel o infecciones del sistema urinario. La invención, por lo tanto, proporciona un polipéptido, composición farmacéutica y/o molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención para usar en el tratamiento o prevención de infecciones de la piel, infecciones de heridas y/o infecciones del sistema urinario. Además, se proporciona un polipéptido, una composición farmacéutica y/o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención para usar en la cicatrización de heridas. Además, se proporciona el uso de un polipéptido, una composición farmacéutica y/o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención en la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de infecciones de la piel, infección de heridas, infección del sistema urinario y/o para la cicatrización de heridas. La invención proporciona, además, un método para el tratamiento de un sujeto que padece de infección de la piel, infección de heridas y/o infección del sistema urinario, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad con eficacia terapéutica de un polipéptido de acuerdo con la invención, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

Los polipéptidos de la invención pueden, además, usarse ventajosamente como preservantes para materiales susceptibles de una infección microbiana, por ejemplo, bacteriana, viral, fúngica, parasitaria. Dicho material puede impregnarse, revestirse, o cubrirse con un polipéptido de la invención. Como se detalló en la presente descripción anteriormente, los polipéptidos de la invención retienen la actividad antimicrobiana en sangre, en plasma y en suero, y en presencia de componentes, tales como componentes plasmáticos. Los polipéptidos y la composición farmacéutica de la invención son, por lo tanto, particularmente adecuados para la aplicación sistémica y para el tratamiento y/o la prevención de infecciones asociadas con implantes y dispositivos médicos. El término "dispositivos médicos" como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier tipo de dispositivo que puede usarse en el cuerpo humano o animal

e incluye, pero no se limita a, instrumentos médicos, implementos médicos, prótesis, tales como articulaciones artificiales, que incluyen caderas y rodillas, y prótesis dentales, implantes de mama, dispositivos implantables tales como marcapasos, válvulas del corazón, cánulas intraluminarias de arterias coronarias (stents), catéteres, tubos auditivos, férulas, tornillos para dispositivos médicos, y vendajes para heridas o tejidos. Los implantes y dispositivos médicos frecuentemente se asocian a infecciones microbianas, en particular infecciones con biopelículas, las cuales se contrarrestan exitosamente con los polipéptidos de la presente invención, como se demuestra en los ejemplos. Además, los implantes y dispositivos médicos generalmente se cubren rápidamente de componentes plasmáticos derivados de los fluidos del huésped después de la implantación. Dado que los polipéptidos de la invención ejercen una actividad antimicrobiana en presencia de componentes plasmáticos, como se demuestra en los ejemplos, la infección microbiana de los implantes y/o dispositivos médicos se trata y/o se previene eficazmente con un polipéptido de acuerdo con la invención. Por lo tanto, se proporciona el uso de un polipéptido de la invención como preservante para un implante y/o dispositivo médico. También se proporciona un polipéptido de la invención para usar en la prevención y/o el tratamiento de infección microbiana, preferentemente infección bacteriana, de un implante y/o dispositivos médicos.

Un polipéptido de la invención se incorpora ventajosamente en un vehículo de liberación controlada y/o de administración dirigida. Como se usa en la presente descripción, el término "liberación controlada" se refiere a la liberación del polipéptido de la invención de manera dependiente del tiempo. En una modalidad, la liberación controlada se refiere a una liberación lenta. Como se usa en la presente descripción, el término "administración dirigida" se refiere a la liberación del polipéptido de la invención de manera dirigida a un sitio. El uso de un vehículo de liberación controlada tiene la ventaja de que puede evitar una administración frecuente, tal como por inyección del polipéptido de la invención. El uso de un vehículo de administración dirigida tiene la ventaja de que el polipéptido de la invención se administra eficazmente y/o se retiene en un sitio de interés en el cuerpo del sujeto, tal como un sitio de inflamación o un sitio de infección. Preferentemente, un polipéptido de la invención se dirige a un sitio infectado por microorganismos que incluyen bacterias, hongos, virus y parásitos. Los vehículos de liberación controlada y/o de administración dirigida se conocen bien en la técnica. Ejemplos no limitantes de vehículos de liberación controlada y/o de administración dirigida son nanopartículas, micropartículas, nanocápsulas, microcápsulas, liposomas, microesferas, hidrogeles, polímeros, complejos de lípidos, albúmina sérica, anticuerpos, ciclodextrinas y dextranos. La liberación controlada, por ejemplo, se proporciona mediante la incorporación de un polipéptido de la invención en la superficie de tales vehículos, o sobre esta. Los vehículos son de materiales que forman partículas que capturan un polipéptido de la invención y se degradan lentamente o se disuelven en un ambiente adecuado, tal como un ambiente acuoso, ácido o básico o fluidos corporales, y así se libera el polipéptido. La administración dirigida se logra, por ejemplo, al proporcionar un vehículo con grupos de direccionamiento sobre su superficie. Ejemplos de tales vehículos que comprenden grupos de direccionamiento son los vehículos funcionalizados con anticuerpos, vehículos que tienen un ligando sitio específico y vehículos que tienen una carga superficial positiva o negativa. Las partículas que se prefieren para la liberación controlada y/o la administración dirigida son las nanopartículas, es decir, partículas en el intervalo de aproximadamente 1 a 500 nm de diámetro, preferentemente hasta aproximadamente 200 nm de diámetro, y los liposomas, que opcionalmente se proporcionan con grupos de direccionamiento. La invención, por lo tanto, proporciona un vehículo de liberación controlada que comprende un polipéptido de la invención y composiciones farmacéuticas que comprenden tales vehículos de liberación controlada. También se proporciona un vehículo de administración dirigida que comprende un polipéptido de la invención, y una composición farmacéutica que comprende dicho vehículo de administración dirigida. Dicho vehículo se selecciona preferentemente del grupo que consiste en nanopartículas, micropartículas, nanocápsulas, microcápsulas, liposomas, microesferas, hidrogeles, polímeros, complejos de lípidos, albúmina sérica, anticuerpos, ciclodextrinas y dextrano.

Los vehículos que se prefieren para la administración dirigida y/o la liberación controlada son de material biodegradable. "Biodegradable" como se usa en la presente descripción, se refiere a moléculas que se degradan en condiciones fisiológicas. Esto incluye moléculas que son degradables hidrolíticamente y moléculas que requieren degradación enzimática. Los materiales biodegradables adecuados incluyen, pero no se limitan a, polímeros biodegradables y material natural biodegradable tal como PLA (ácido poliláctico), PGA (ácido poliglicólico), policaprolactona (PCL), óxido de polietileno (PEO), polidioxanona (PDS), policaprolactona (PCL), fumarato de polipropileno, polímeros derivados de lactonas, tales como lactida, glicólido y caprolactona, carbonatos tales como carbonato de trimetileno y carbonato de tetrametileno, dioxanonas, etilenglicol, poliéster amida (PEA) óxido de etileno, esteramidas, γ -hidroxivalerato, β -hidroxipropionato, α -hidroxiácido, hidroxibutiratos, hidroxialcanoatos, carbonatos de poliimida, poliuretanos, polianhídridos, y sus combinaciones, polisacáridos, tal como ácido hialurónico, quitosano y celulosa, y proteínas tales como gelatina y colágeno.

Además, se proporciona un recubrimiento, preferentemente para implantes y/o dispositivos médicos, que comprende un polipéptido de la invención. En una modalidad, dicho recubrimiento proporciona la liberación controlada del polipéptido de la invención. Dicho recubrimiento de liberación controlada para los dispositivos médicos comprende preferentemente un material biodegradable, de manera que la liberación del polipéptido de la invención se logra por degradación del material de recubrimiento. También se proporciona, por lo tanto, un recubrimiento de liberación controlada, que comprende un polipéptido de la invención. Además, se proporciona un dispositivo médico que comprende dicho recubrimiento, que comprende un polipéptido de la invención y un material biodegradable. Además, se proporciona un implante que comprende dicho recubrimiento, que comprende un polipéptido de la invención y un material biodegradable. Un recubrimiento biodegradable de acuerdo con la invención comprende un material biodegradable, como se definió anteriormente. En particular, dicho recubrimiento biodegradable comprende un material que se selecciona del grupo que consiste en PLA (ácido poliláctico), PGA (ácido poliglicólico), policaprolactona (PCL), óxido de

5 polietileno (PEO), polidioxanona (PDS), policaprolactona (PCL), fumarato de polipropileno, polímeros derivados de lactonas, tal como lactida, glicólido y caprolactona, carbonatos tal como carbonato de trimetileno y carbonato de tetrametileno, dioxanonas, etilenglicol, poliéster amida (PEA) óxido de etileno, esteramidas, γ -hidroxivalerato, β -hidroxipropionato, α -hidroxiácido, hidroxibutiratos, hidroxialcanoatos, carbonatos de polimida, poliuretanos, polianhídridos, y sus combinaciones, polisacáridos, tales como ácido hialurónico, quitosano y celulosa, y proteínas tales como gelatina y colágeno. Además, se proporciona un método para prevenir y/o tratar una infección microbiana, preferentemente infección bacteriana, de un implante y/o dispositivo médico, que comprende proporcionar dicho implante y/o dispositivo médico con un recubrimiento que comprende un polipéptido de la invención e implantar dicho implante o dispositivo médico en un sujeto.

10 Los polipéptidos y las composiciones farmacéuticas son útiles también como agentes antiinflamatorios porque neutralizan las endotoxinas proinflamatorias microbianas tales como ácido lipoteicoico, peptidoglicano y lipopolisacáridos para así inhibir, reducir o prevenir el flujo de neutrófilos, macrófagos/monocitos y linfocitos y la liberación de compuestos proinflamatorios microbianos por el sujeto infectado. En la presente descripción también se describe, por lo tanto, un método para inhibir la liberación de compuestos proinflamatorios, que comprende poner en contacto una célula capaz de liberar compuestos proinflamatorios con un polipéptido de acuerdo con la invención. Dicho contacto puede ocurrir *in vivo* e *in vitro*. Más adelante en la presente descripción se describe un polipéptido de acuerdo con la invención para usar como un agente antiinflamatorio.

15 Aunque los polipéptidos de acuerdo con la invención son agentes antimicrobianos potentes, pueden combinarse con agentes antimicrobianos conocidos, tales como antiinfecciosos convencionales, tales como antibióticos, antivirales y antifúngicos u otros péptidos antimicrobianos, y anticuerpos y compuestos químicos, *por ejemplo*, sensibilizadores, nanopartículas. Tal combinación puede resultar en una actividad antimicrobiana aumentada o ampliar el espectro de actividad. Los polipéptidos de la invención pueden combinarse, por ejemplo, con penicilinas, cefalosporinas, macrólidos, fluoroquinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas y/o aminoglucósidos para el tratamiento de infecciones bacterianas. Para el tratamiento de infecciones virales los polipéptidos pueden combinarse con análogos de nucleósidos antivirales tales como aciclovir, ganciclovir, zidovudina (AZT) o didanosina o inhibidores de neuramidasa, tales como oseltamivir, peramivir o zanamivir. Para el tratamiento de infecciones fúngicas los polipéptidos y las composiciones de la invención pueden combinarse con antifúngicos de polienos, imidazoles, triazoles, alilaminas, equinocandinas, ciclopirox, flucitosina y/o griseofulvina. La invención, por lo tanto, proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de acuerdo con la invención y un agente antimicrobiano adicional, tal como un antibiótico o un péptido antimicrobiano, que se selecciona preferentemente del grupo que consiste en penicilinas, cefalosporinas, carbapenem y mupirocina.

20 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención comprenden al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de vehículos adecuados comprenden, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica (por ejemplo, BSA o RSA) y ovalbúmina. En una modalidad preferida, dicho vehículo adecuado es una solución, por ejemplo, solución salina. Ejemplos de excipientes que pueden incorporarse en comprimidos, cápsulas y similares son los siguientes: un aglutinante, tal como goma tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; un excipiente, tal como celulosa microcristalina; un agente desintegrador, tal como almidón de maíz, almidón pregelatinizado, ácido algínico y similares; un lubricante, tal como estearato de magnesio; un agente edulcorante, tal como sacarosa, lactosa o sacarina; un agente saborizante, tal como menta, aceite de gaulteria o cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, ésta puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido, tal como un aceite graso. Varios materiales diferentes pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de cualquier otra manera la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos se pueden recubrir con goma laca, azúcar, o ambas. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como un edulcorante, metil y propil parabenos como conservantes, un colorante, y un saborizante, como sabor de cereza o naranja. Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención preferentemente es adecuada para uso humano.

25 30 35 40 45 50 Las composiciones farmacéuticas que se describen en la presente descripción pueden administrarse en una variedad de maneras diferentes. Los ejemplos incluyen la administración de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de acuerdo con la invención y que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable por las vías oral, intranasal, rectal, tópica, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, subdérmica, transdérmica, intratecal, y por métodos intracraneales. Para la administración oral, el ingrediente activo puede administrarse en formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, comprimidos, y polvos, o en formas de dosificación líquidas, tales como elixires, jarabes y suspensiones.

55 60 Las composiciones estériles para la inyección pueden formularse de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional mediante la disolución o suspensión del polipéptido de la invención en un vehículo para la inyección, tal como agua o un aceite vegetal de origen natural como el aceite de sésamo, aceite de coco, aceite de maní, aceite de semilla de algodón, etc., o un vehículo graso sintético como el oleato de etilo o similares. También pueden incorporarse tampones, conservantes, antioxidantes y similares.

65 Las composiciones para la administración tópica pueden formularse, además, de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional. La "administración tópica" como se usa en la presente descripción, se refiere a la aplicación a una superficie del cuerpo, tal como la piel o membranas mucosas, para tratar localmente afecciones resultantes de

5 infecciones microbianas o parasitarias. Los ejemplos de formulaciones adecuadas para la administración tópica incluyen, pero no se limitan, a una crema, gel, ungüento, loción, espuma, suspensión, atomización, aerosol, aerosol en polvo. Los medicamentos tópicos pueden ser epicutáneos, lo que significa que se aplican directamente a la piel. Los medicamentos tópicos pueden ser, además, por inhalación, por ejemplo, para la aplicación al epitelio mucoso del tracto respiratorio, o pueden aplicarse a la superficie de otros tejidos aparte de la piel, tal como gotas oculares que se aplican a la conjuntiva, o gotas para aplicar al oído. Dicha composición farmacéutica, formulada para la administración tópica, preferentemente comprende al menos un excipiente farmacéutico adecuado para la aplicación tópica, tal como un emulsionante, un diluyente, un humectante, un conservante, un controlador de pH y/o agua.

10 Un polipéptido de acuerdo con la invención, además, es particularmente adecuado para su uso diagnóstico. Los polipéptidos pueden usarse para la detección de una infección microbiana, por ejemplo para la detección de toxinas microbianas, por ejemplo toxinas bacterianas que incluyen LPS, LTA y PG, presentes en muestras fisiológicas, tales como sangre, plasma, mucus, exudado de las heridas y orina. Además, los polipéptidos pueden usarse para determinar la cantidad de toxinas microbianas en tales muestras. Por lo tanto, se proporciona una molécula de ácido nucleico del polipéptido de acuerdo con la invención para usar como agente diagnóstico. Además, se proporciona un uso de un polipéptido de acuerdo con la invención para detectar una toxina microbiana, preferentemente una toxina bacteriana o fúngica, en una muestra fisiológica, tal como muestras de sangre, plasma, mucus, exudado de heridas y orina. Como se describió anteriormente, un polipéptido de acuerdo con la invención puede acoplarse a un resto adecuado, tal como una biotina, un marcador de fluoresceína, un colorante en el infrarrojo cercano, o un isótopo radioactivo. Tales polipéptidos marcados pueden usarse en un método para detectar infecciones microbianas, tales como infecciones bacterianas, porque migran a un sitio de infección microbiana. Mediante el uso de un detector adecuado para el marcador unido al polipéptido, es posible detectar los sitios de infección. La invención también proporciona métodos para la detección de infecciones microbianas, tales como infecciones bacterianas. El método típicamente implica administrar un polipéptido marcado a un sujeto infectado, o que se sospecha que está infectado con un organismo microbiano. Dado que el polipéptido marcado es capaz de interactuar con el organismo infeccioso, se acumula en el sitio de la infección. Para detectar toxinas microbianas en una muestra fisiológica, el método implica administrar un polipéptido marcado a una muestra fisiológica de un sujeto infectado, o que se sospecha que está infectado con un organismo microbiano. Es posible detectar la acumulación del polipéptido en el sitio de la infección o en una muestra mediante el uso de diversos detectores que son sensibles al marcador que está unido al polipéptido.

20 Otra aplicación útil de los polipéptidos de acuerdo con la invención es en la preservación de productos alimenticios. Por lo tanto, también se proporciona el uso de un polipéptido de acuerdo con la invención como un preservante de alimentos. Generalmente, los microorganismos patógenos o de putrefacción se destruyen mediante el procesamiento térmico de los alimentos al someterlos a temperaturas que varían de 60 a 100 °C. Dicho tratamiento puede tener efectos indeseables sobre el producto alimenticio, tal como efectos organolépticos indeseables. El uso de un polipéptido de acuerdo con la invención como preservante de productos alimenticios puede resultar en una extensión del tiempo de almacenamiento y/o en un incremento de la seguridad del producto alimenticio.

30 Los microorganismos patógenos en los alimentos pueden provocar infecciones o intoxicaciones a los sujetos, e incluyen bacterias tales como *Campylobacter jejuni*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* y especies de *Salmonella no-typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* y *Clostridium Botulinum*, virus tales como rotavirus y virus de tipo Norwalk, parásitos tales como *Taenia solium*, *Taenia saginata* y *Trichinella spiralis* y mohos. La putrefacción de los alimentos se refiere al cambio de apariencia, consistencia, sabor y/u olor de los productos alimenticios, y puede deberse a bacterias, tales como *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Serratia*, *Enterobacter* y *Streptococcus*, hongos tales como *Aspergillus*, *Fusarium* y *Cladosporium* y levaduras.

La invención se explicará con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

50 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Curvas de crecimiento de *A. niger* cultivado en PBS en presencia de 5 µM de Cancidas, o 0.8-6.4 µM de los péptidos indicados. Los valores se expresan como la densidad óptica a 600 nm con respecto a la densidad óptica a las 0 horas. Microfotografías al microscopio óptico del crecimiento fúngico en PBS después de 16 horas de incubación.

55 Microfotografías al microscopio óptico representativas de los triplicados.
Figura 2: Microfotografías al microscopio óptico del crecimiento de *A. niger* en 25 % de plasma después de 16 horas de incubación con PBS, Cancidas, OP-145 o los péptidos indicados. Microfotografías al microscopio óptico representativas de los triplicados.

60 Figura 3: Inhibición de la formación de biopelículas por *S. aureus* JAR060131 a diferentes concentraciones (en µM). Los resultados se expresan como la media del porcentaje de masa de la biopelícula con respecto a la muestra no tratada (0) ± desviaciones estándar de tres experimentos independientes. A, formación de biopelícula en pocillos no recubiertos. B, formación de biopelícula en pocillos recubiertos con plasma.

65

EJEMPLOS

Materiales y métodos

5 Síntesis de péptidos antimicrobianos

Los péptidos sintéticos se prepararon mediante química de Fmoc normal con el uso de resinas Tentagel precargadas, PyBop/NMM para la activación in situ y piperidina al 20 % en NMP para la eliminación de Fmoc [Hiemstra HS y otros, Proc Natl Acad Sci USA, 94, 10313-10318 (1997)]. Los acoplamientos se realizaron durante 60 min con especies acilantes 6 veces. Después de la eliminación final de Fmoc, los péptidos se escindieron con TFA/H₂O 19/1 (v/v) que contenía limpiadores adicionales cuando C (triethylsilano) o W (etanotiol) estaban presentes en la secuencia peptídica. Los péptidos se aislaron mediante precipitación y aislamiento del producto con éter/pentano 1/1 (v/v) mediante centrifugación. Después de un secado al aire a aproximadamente 40 °C, los péptidos se disolvieron en ácido acético/agua 1/10 (v/v) y se liofilizaron. Se revisó la pureza de los péptidos mediante el uso de UPLC-MS (Acquity, Waters) y se revisó la integridad mediante el uso de espectrometría de masa de Maldi-Tof (Microflex, Bruker), que mostró las masas moleculares que se esperaban.

Abreviaturas:

20 Fmoc: 9H-fluorenilmetiloxycarbonil
 NMM: N-metilmorfolina
 PyBOP: Benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio hexafluorofosfato
 TFA: ácido trifluoroacético

25 Cepas bacterianas

El aislado clínico de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), LUH14616 fue amablemente proporcionado por el Dr. S. Croes, Maastricht University Medical Center, Maastricht, Países Bajos (véase Croes S BMC Microbiol. 2009; 9:229. doi: 10.1186/1471-2180-9-229).

30 *S. aureus* JAR se describe en Campoccia y otros (Int J Artif Organs. 2008 Sep; 31(9): 841-7).
Staphylococcus epidermidis RP62a se describe en Infect. Immun.2008; 75: 1129-1136.

Pseudomonas aeruginosa PAO1 se describe en Nucl. Acids Res 2011; 39, Suppl. 1: D596-D60.

35 Las bacterias se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Los inóculos de bacterias a la mitad de la fase log se prepararon mediante la incubación de colonias bacterianas aisladas a partir de placas de agar sangre en medio Tryptic Soy Broth (TSB) (Becton Dickinson, Le Pont de Clax, Francia) durante 2.5 horas y después se diluyeron hasta la concentración necesaria. *S. aureus* JAR060131 en fase estacionaria se obtuvo a partir de cultivos de 18-20 horas.

40 Determinación de la actividad antibacteriana

Los péptidos se incubaron con 1x10⁶ CFU/ml de un cultivo en la mitad de la fase logarítmica de *S. aureus* JAR060131, *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) LUH14616, *Staphylococcus epidermidis* RP62a, y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en PBS con o sin adición de plasma humano mezclado (Sanquin, Amsterdam, Países Bajos) a una concentración final de 50 %. La actividad antimicrobiana se expresa como la concentración letal para un 99.9 % (LC99.9), es decir, la concentración más baja del péptido que mata ≥ 99.9 % de las bacterias después de 2 horas de incubación a 37 °C en condiciones de agitación.

50 Para evaluar la actividad antimicrobiana de los péptidos contra las bacterias en fase estacionaria, los péptidos se incubaron en las condiciones descritas anteriormente con 1x10⁶ CFU/ml de *S. aureus* JAR060131 en fase estacionaria, obtenido a partir de cultivos de 18-20 horas.

Determinación de la actividad antifúngica

55 Los péptidos se incubaron con 1x10⁵ células/ml de un cultivo en la mitad de la fase logarítmica de *Candida albicans* Y-O1, con o sin adición de plasma humano mezclado a una concentración final de 50 %. La actividad antimicrobiana se expresa como la concentración letal del 99 % (LC99), es decir, la concentración más baja del péptido que mata ≥ 99 % de las células después de 2 horas de incubación a 37 °C en condiciones de agitación.

60 El efecto de los péptidos sobre el crecimiento fúngico se evaluó mediante el uso de *Aspergillus niger*. Los péptidos se incubaron con 7.5x10⁴ esporas/ml de *A. niger* PagsA-lux en PBS con o sin adición de plasma humano mezclado a una concentración final de 25 %. Como control positivo, las esporas se trataron con el antifúngico caspofungina (Cancidas). Se midió la absorbancia en el tiempo y a las 16 horas, se visualizó el crecimiento fúngico mediante el uso de microscopía óptica.

65

Tabla 1. Secuencia de péptidos P139-163. J = acetilo, B = amida

5	P139	J L K K L W K R V F R I W K R I F R Y L K R P V R B
	P140	J L R R L W K R L V R I I K R I Y R Q L K R P V R B
	P141	J L R R L Y K R V F R L L K R W W R Y L K R P V R B
	P142	J L R R L W K R L V K I L K R W F R Y L R R P V R B
	P143	J L R R L Y K R V V K L W K R L F R Q L R R P V R B
10	P144	J L K K L Y K R V A K I W K R W I R Y L K K P V R B
	P145	J L K R L Y K R L A K L I K R L Y R Y L K K P V R B
	P146	J L K K L Y K R L F K I L K R I L R Y L R K P V R B
	P147	J L K K L W K R L A R L L K R F I R Q L R R P V R B
	P148	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B
15	P149	J L K K V Y K R L A R L L K R Y I R Y L R R P V R B
	P150	J L K K V W K R V A R L I K R W F R Y L R R P V R B
	P151	J L K K L Y K R L F K L W K R L Y R Y L K K P V R B
	P152	J L R R V Y K R L A R L I K R Y L R Q L K K P V R B
20	P153	J L R K L W K R V V K I W K R Y L R Q L R R P V R B
	P154	J L R K L W K R L A K I I K R L Y R Y L R R P V R B
	P155	J L K K V Y K R V A R L I K R L F R Y L K R P V R B
	P156	J L R R L W K R L V K L W K R F F R Y L K K P V R B
	P157	J L K K V W K R V F R I L K R F L R Y L K R P V R B
25	P158	J L R R V Y K R L F R L W K R I I R Q L R R P V R B
	P159	J L K R L Y K R V F R L L K R Y Y R Q L R R P V R B
	P160	J L K K L W K R L A R L W K R I I R Q L K K P V R B
	P161	J L R R V W K R V A R I I K R L Y R Y L K R P V R B
30	P162	J L K R L W K R L F K I L K R Y Y R Y L R R P V R B
	P163	J L R R L W K R V F K I I K R L F R Q L K K P V R B

Se analizaron las actividades antibacterianas de estos péptidos en ausencia y en presencia de plasma (Tabla 2).

35 Basados en los resultados obtenidos, se seleccionaron P145, P148 y P159 como péptidos significativamente mejorados en comparación con OP-145.

40 Tabla 2. Actividades antimicrobianas de los péptidos derivados de OP-145. ¹La actividad antimicrobiana se expresa como IC_{99.9} (µM), es decir, la concentración más baja del péptido que mata el 99.9 % del inóculo bacteriano (que fue aproximadamente 1x10⁶ CFU/ml de *S. aureus* JAR) en 2 horas.

	Péptido		Actividad antimicrobiana ¹ IC _{99.9} (µM)	
			PBS	50 % de plasma
45	(OP-145)	1145-01	1.6	204.8
	(P139)	1231-01	0.8	51.2
	(P140)	1231-02	1.6	25.6
50	(P141)	1231-03	0.8	25.6
	(P142)	1231-04	0.8	51.2
	(P143)	1231-05	1.6	51.2
55	(P144)	1231-06	1.6	25.6
	(P145)	1231-07	1.6	25.6
	(P146)	1231-08	1.6	51.2
60	(P147)	1231-09	1.6	51.2
	(P148)	1231-10	1.6	12.8
	(P149)	1231-11	1.6	102.4

65

	(P150)	1231-12	1.6	25.6
	(P151)	1231-13	1.6	25.6
5	(P152)	1231-14	1.6	25.6
	(P153)	1231-15	1.6	25.6
	(P154)	1231-16	1.6	51.2
10	(P155)	1231-17	1.6	102.4
	(P156)	1231-18	1.6	51.2
	(P157)	1231-19	0.8	51.2
15	(P158)	1231-20	1.6	25.6
	(P159)	1231-21	1.6	12.8
	(P160)	1231-22	1.6	25.6
20	(P161)	1231-23	1.6	25.6
	(P162)	1231-24	1.6	25.6
	(P163)	1231-25	0.8	25.6

25 Actividad antimicrobiana de P145, P148 y P159 contra diferentes bacterias

En PBS, los péptidos P145, P148 y P159 tuvieron una actividad antimicrobiana similar a OP-145 contra todas las especies bacterianas en cultivos en la mitad de la fase logarítmica (Tabla 3). En presencia de 50 % de plasma, los péptidos P145, P148 y P159 mostraron mayor actividad bactericida contra *S. aureus* JAR060131 (11-16 veces), MRSA LUH14616 (21-26 veces), *S. epidermidis* RP62a (43 veces) y *P. aeruginosa* PAO1 (>11-21 veces) en comparación con OP-145.

35 Tabla 3. Actividad antimicrobiana de los péptidos OP-145, P145, P148 y P159 en PBS y 50 % de plasma en cultivos en la mitad de la fase logarítmica. Los resultados se expresan como LC99.9, es decir la concentración más baja del péptido (en μM) que dio como resultado ≥ 99.9 % de bacterias muertas. Los resultados son los valores de las medianas de al menos dos experimentos independientes.

LC99.9 (μM)									
	<i>S. aureus</i> JAR060131		MRSA LUH14616		<i>S. epidermidis</i> RP62a		<i>P. aeruginosa</i> PAO1		
	PBS	50 % de plasma	PBS	50 % de plasma	PBS	50 % de plasma	PBS	50 % de plasma	
45	OP-145	1.6	204.8	1.6	204.8	0.8	204.8	3.2	>204.8
	P145	1.6	19.2	1.6	9.6	0.8	3.2	1.6	25.6
	P148	1.6	19.2	1.6	8.0	0.8	3.2	1.6	12.8
50	P159	2.4	12.8	2.4	9.6	1.6	3.2	1.6	12.8

Los péptidos OP-145, P145, P148 y P159 mostraron actividad antimicrobiana similar contra *S. aureus* JAR060131 en fase estacionaria (Tabla 4) en comparación con bacterias en fase logarítmica. Por lo tanto, en presencia de 50 % de plasma, los péptidos P145, P148 y P159 mostraron mayor actividad bactericida contra *S. aureus*JAR060131 que OP-145.

60 Tabla 4. Actividad antimicrobiana de los péptidos OP-145, P145, P148 y P159 en PBS y 50 % de plasma contra una suspensión en fase estacionaria de *S. aureus*JAR060131. Los resultados son los valores medios de tres experimentos independientes.

60

65

		LC99.9 (µM)	
		PBS	50 % de plasma
5	OP-145	1.6	>204,8
	P145	1.6	25.6
	P148	1.6	12.8
10	P159	2.4	25.6

Actividad antimicrobiana de variantes de longitud de P148

15 La delección de 4 aminoácidos en el C- y N-terminal de P148 no tiene efecto sobre la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* JAR060131 (Tabla 5). La delección de 5 aminoácidos en el C- y N-terminal reduce la actividad antimicrobiana en comparación con P148, pero la actividad es todavía 5 veces mayor en comparación con OP-145.

20 Tabla 5. Actividad antimicrobiana de variantes de longitud de P148 en PBS y 50 % de plasma. Los resultados se expresan como LC99.9, es decir la concentración más baja del péptido (en µM) que dio como resultado ≥99.9 % de *S. aureus* muertos. Los resultados son los valores medios de dos experimentos independientes. J = acetilo, B = amida

		LC99.9 (µM)		
Péptido	Secuencia	PBS	50 % de plasma	
25	P148	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	12.8
	P325	J R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	9.6
30	P326	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P B	1.6	12.8
	P327	J R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P B	1.6	8.0
	P328	J W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	12.8
35	P329	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K B	0.8	9.6
	P330	J V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K B	1.6	9.6
	P331	J W K R V F K L L K R Y W R Q L K B	1.6	9.6
40	P332	J K R V F K L L K R Y W R Q L B	4.8	38.4

Actividad antimicrobiana de P145, P148 y P159 con múltiples sustituciones de alanina

45 La sustitución de un aminoácido de P145, P148 y P159 y de dos aminoácidos de P148 por alanina no tiene efecto sobre la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* JAR060131 (Tablas 6-9).

50 Tabla 6. Actividad antimicrobiana de P145 con una sustitución de alanina en posiciones diferentes en PBS y 50% de plasma. Resultados de dos experimentos independientes. J = acetilo, B = amida

50

55

60

65

Péptido	Corrida #	Secuencias	LC99.9 (uM)			
			2013.01.15		2013.01.18	
			PBS	50% plasma	PBS	50% plasma
P145	1255-04	J L K R L Y K R L A K L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	12.8
P246	1255-05	J A K R L Y K R L A K L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	1.6	12.8
P247	1255-06	J L A R L Y K R L A K L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	0.8	12.8
P248	1255-07	J L K A L Y K R L A K L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	0.8	25.6
P249	1255-08	J L K R A Y K R L A K L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	12.8
P250	1255-09	J L K R L A K R L A K L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	1.6	25.6
P251	1255-10	J L K R L Y A R L A K L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	1.6	25.6
P252	1255-11	J L K R L Y K A L A K L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	0.8	12.8
P253	1255-12	J L K R L Y K R A A K L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	6.4
P254	1255-13	J L K R L Y K R L Y K L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	0.8	12.8
P255	1255-14	J L K R L Y K R L A A L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	0.8	25.6
P256	1255-15	J L K R L Y K R L A K A I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	1.6	12.8
P257	1255-16	J L K R L Y K R L A K L A K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	25.6	0.8	12.8
P258	1255-17	J L K R L Y K R L A K L I A R L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	0.8	12.8
P259	1255-18	J L K R L Y K R L A K L I K A L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	0.8	12.8
P260	1255-19	J L K R L Y K R L A K L I K R A Y R Y L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	12.8
P261	1255-20	J L K R L Y K R L A K L I K R L A R Y L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	12.8
P262	1255-21	J L K R L Y K R L A K L I K R L Y A Y L K K P V R B	1.6	51.2	1.6	12.8
P263	1255-22	J L K R L Y K R L A K L I K R L Y R A L K K P V R B	1.6	25.6	0.8	12.8
P264	1255-23	J L K R L Y K R L A K L I K R L Y R A K K P V R B	1.6	25.6	1.6	12.8
P265	1255-24	J L K R L Y K R L A K L I K R L Y R Y L A K P V R B	1.6	51.2	0.8	12.8
P266	1255-25	J L K R L Y K R L A K L I K R L Y R Y L K A P V R B	1.6	51.2	0.8	25.6
P267	1255-26	J L K R L Y K R L A K L I K R L Y R Y L K K A V R B	1.6	25.6	0.8	6.4
P268	1255-27	J L K R L Y K R L A K L I K R L Y R Y L K K P A R B	1.6	51.2	0.8	12.8
P269	1255-28	J L K R L Y K R L A K L I K R L Y R Y L K K P V A B	1.6	51.2	0.8	12.8

Tabla 7. Actividad antimicrobiana de P148 con una sustitución de alanina en posiciones diferentes en PBS y 50% de plasma. Resultados de dos experimentos independientes. J = acetilo, B = amida

Péptido	Corrida #	Secuencias	LC99.9 (uM)			
			2013.01.15		2013.01.18	
			PBS	50% plasma	PBS	50% plasma
P148	1255-29	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	12.8
P270	1255-30	J A K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	0.8	6.4
P271	1255-31	J L A R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	51.2	1.6	12.8
P272	1255-32	J L K A V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	51.2	1.6	12.8
P273	1255-33	J L K B A W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	6.4
P274	1255-34	J L K R V A K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	6.4
P275	1255-35	J L K R V W A R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	12.8
P276	1255-36	J L K R V W K A V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	12.8	0.8	6.4
P277	1255-37	J L K R V W K R A F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	6.4
P278	1255-38	J L K R V W K R V A K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	6.4
P279	1255-39	J L K R V W K R V F A L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	51.2	0.8	12.8
P280	1255-40	J L K R V W K R V F K A L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	6.4
P281	1255-41	J L K R V W K R V F K L A K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	6.4
P282	1255-42	J L K R V W K R V F K L L A R Y W R Q L K K P V R B	1.6	51.2	1.6	25.6
P283	1255-43	J L K R V W K R V F K L L K A Y W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	12.8
P284	1255-44	J L K R V W K R V F K L L K R A W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	12.8
P285	1255-45	J L K R V W K R V F K L L K R Y A R Q L K K P V R B	1.6	12.8	1.6	12.8
P286	1255-46	J L K R V W K R V F K L L K R Y W A Q L K K P V R B	1.6	51.2	1.6	12.8
P287	1255-47	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R A L K K P V R B	1.6	51.2	0.8	12.8
P288	1255-48	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q A K K P V R B	1.6	25.6	1.6	12.8
P289	1255-49	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L A K P V R B	1.6	51.2	1.6	25.6
P290	1255-50	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K A P V R B	1.6	25.6	0.8	12.8
P291	1255-51	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K A V R B	1.6	25.6	0.8	12.8
P292	1255-52	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P A R B	0.8	25.6	0.8	12.8
P293	1255-53	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V A B	0.8	25.6	0.8	12.8

Tabla 8. Actividad antimicrobiana de P159 con una sustitución de alanina en posiciones diferentes en PBS y 50% de plasma. Resultados de dos experimentos independientes. J = acetilo, B = amida

Péptido	Corrida #	Secuencias	LC99.9 (µM)			
			2013.01.15		2013.01.18	
			PBS	50% plasma	PBS	50% plasma
P159	1255-54	J L K R L Y K R V F R L L K R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	25.6	1.6	12.8
P294	1255-55	J A K R L Y K R V F R L L K R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	25.6	3.2	12.8
P295	1255-56	J L A R L Y K R V F R L L K R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	51.2	3.2	25.6
P296	1255-57	J L K A L Y K R V F R L L K R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	25.6	1.6	12.8
P297	1255-58	J L K R A Y K R V F R L L K R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	12.8	3.2	12.8
P298	1255-59	J L K R L A K R V F R L L K R Y Y R Q L R R P V R B	3.2	51.2	3.2	25.6
P299	1255-60	J L K R L Y A R V F R L L K R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	25.6	1.6	25.6
P300	1255-61	J L K R L Y K A V F R L L K R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	51.2	1.6	25.6
P301	1255-62	J L K R L Y K R A F R L L K R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	25.6	3.2	12.8
P302	1255-63	J L K R L Y K R V A R L L K R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	51.2	1.6	25.6
P303	1255-64	J L K R L Y K R V F A L L K R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	25.6	1.6	25.6
P304	1255-65	J L K R L Y K R V F R A L K R Y Y R Q L R R P V R B	3.2	25.6	3.2	25.6
P305	1255-66	J L K R L Y K R V F R L A K R Y Y R Q L R R P V R B	3.2	12.8	1.6	6.4
P306	1255-67	J L K R L Y K R V F R L L A R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	51.2	>3.2	25.6
P307	1255-68	J L K R L Y K R V F R L L K A Y Y R Q L R R P V R B	1.6	51.2	1.6	12.8
P308	1255-69	J L K R L Y K R V F R L L K R A Y R Q L R R P V R B	3.2	51.2	3.2	12.8
P309	1255-70	J L K R L Y K R V F R L L K R Y A R Q L R R P V R B	1.6	51.2	1.6	12.8
P310	1255-71	J L K R L Y K R V F R L L K R Y Y A Q L R R P V R B	1.6	51.2	1.6	12.8
P311	1255-72	J L K R L Y K R V F R L L K R Y Y R A L R R P V R B	1.6	51.2	3.2	25.6
P312	1255-73	J L K R L Y K R V F R L L K R Y Y R Q A R R P V R B	3.2	51.2	3.2	12.8
P313	1255-74	J L K R L Y K R V F R L L K R Y Y R Q L A R P V R B	1.6	51.2	1.6	12.8
P314	1255-75	J L K R L Y K R V F R L L K R Y Y R Q L R A P V R B	1.6	51.2	1.6	12.8
P315	1255-76	J L K R L Y K R V F R L L K R Y Y R Q L R R A V R B	3.2	>51.2	1.6	12.8
P316	1255-77	J L K R L Y K R V F R L L K R Y Y R Q L R R P A B	1.6	25.6	3.2	12.8
P317	1255-78	J L K R L Y K R V F R L L K R Y Y R Q L R R P V A B	1.6	51.2	1.6	12.8

Tabla 9. Actividad antimicrobiana de P148 con múltiples sustituciones de alanina en PBS y 50% de plasma. Los resultados son los valores medios de dos experimentos independientes. J = acetilo, B = amida

Péptido	Secuencia	LC99.9 (µM)	
		PBS	50% plasma
P148	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.2	19.2
P318	J <u>A</u> K R V W K <u>A</u> V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.2	19.2
P319	J L K R <u>A</u> W K <u>A</u> V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.2	19.2
P320	J L K R V <u>A</u> K <u>A</u> V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.2	19.2
P321	J L K R V W K <u>A</u> <u>A</u> F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.2	19.2
P322	J L K R V W K <u>A</u> V <u>A</u> K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.2	19.2
P323	J L K R V W K <u>A</u> V F K <u>A</u> L K R Y W R Q L K K P V R B	1.2	19.2
P324	J L K R V W K <u>A</u> V F K L <u>A</u> K R Y W R Q L K K P V R B	1.2	19.2

Actividad antimicrobiana de variantes de P148 con sustituciones de aminoácidos cargados positivamente

Las variantes de P148 en donde se han reemplazado lisina o arginina por un aminoácido cargado positivamente, retienen la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* tanto en PBS como en presencia de 50 % de plasma (Tabla 10).

Tabla 10. Actividad antimicrobiana de P148 con sustituciones de aminoácidos cargados positivamente en PBS y 50% de plasma. J = acetilo, O = ornitina; X = ácido diaminobutírico (DABA); U = ácido diaminopropiónico (DAPA), B = amida

ES 2 691 623 T3

	Péptido	Secuencia	LC99.9 (µM)	
			PBS	50% plasma
5	P148	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVR	0.8	12.8
	P365	QLRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVR	0.8	12.8
	P366	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVR	0.8	12.8
	P367	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVR	0.8	12.8
	P368	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVR	0.8	12.8
10	P369	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVR	0.8	12.8
	P370	QLKRVWKR VFKLLRYWRQLKKPVR	0.8	25.6
	P371	QLKRVWKR VFKLLKYWRQLKKPVR	0.8	25.6
	P372	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVR	0.8	25.6
15	P373	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKOPVR	0.8	25.6
	P374	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKOPVR	0.8	25.6
	P375	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVO	0.8	12.8
	P377	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVR	0.8	12.8
20	P378	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVR	0.8	12.8
	P379	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVR	0.8	12.8
	P380	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVR	0.8	12.8
	P381	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVR	0.8	25.6
25	P382	QLKRVWKR VFKLLRYWRQLKKPVR	0.8	25.6
	P383	QLKRVWKR VFKLLKYWRQLKKPVR	0.8	25.6
	P384	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVR	1.6	25.6
	P385	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKXKPV	0.8	12.8
30	P386	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKXKPV	0.8	25.6
	P387	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVX	1.6	25.6
	P389	QLRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVR	0.8	12.8
	P390	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVR	1.6	12.8
35	P391	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVR	0.8	25.6
	P392	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVR	0.8	12.8
	P393	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVR	0.8	25.6
	P394	QLKRVWKR VFKLLRYWRQLKKPVR	0.8	25.6
40	P395	QLKRVWKR VFKLLKYWRQLKKPVR	1.6	25.6
	P396	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVR	0.8	25.6
	P397	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKOPVR	0.8	25.6
	P398	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKOPVR	1.6	25.6
45	P399	QLKRVWKR VFKLLKRYWRQLKKPVO	3.2	51.2

Actividad antifúngica de P145, P148 y P159

OP-145 no mostró actividad antifúngica contra *C. albicans* Y-O1 en PBS a 51.2 µM (Tabla 11). P145, P148 y P159 mataron el 99 % de *C. albicans* a concentraciones en el intervalo de 12.8 µM (para P159) a 38.4 µM (para P148). En 50 % de plasma, la actividad antifúngica fue de 204.8 µM para P145, P148 y P159. A esta concentración, no se observó actividad antifúngica para OP-145.

Tabla 11. Actividad antifúngica de OP-145, P145, P148 y P159 en PBS y 50 % de plasma. Los resultados son los valores medios de dos experimentos independientes.

		LC99 (µM)	
		PBS	50 % de plasma
60	OP-145	>51.2	>204.8
	P145	25.6	204.8
	P148	38.4	204.8
65	P159	12.8	204.8

OP-145 inhibió el crecimiento de *A. niger* en >99.9 % a concentraciones de 3.2 μ M (Figura 1). P145 mostró actividad antifúngica similar a OP-145, mientras que P148 tuvo una actividad antifúngica 4 veces mayor, al inhibir el crecimiento fúngico a 0.8 μ M. P159 tuvo una actividad antifúngica 2 veces menor en comparación con OP-145. Dado que el plasma influye en los valores de la densidad óptica, la actividad antifúngica de los péptidos en presencia de plasma se evaluó basado solamente en las microfotografías al microscopio óptico. En presencia de 25 % de plasma, el crecimiento fúngico se inhibió a 204.8 μ M de OP-145 (Figura 2). P145, P148 y P159 inhibieron el crecimiento a 102.4 μ M.

Actividad antibiopelícula de P145, P148 y P159

OP-145 mostró \geq 50 % de inhibición de la formación de biopelícula a 3.2 μ M (Figura 3A). El valor de IC50 para P145 fue de 6.4 μ M y para P148 y P159 fue de 12.8 μ M. La inhibición máxima de la biopelícula fue aproximadamente 75 %. Debe señalarse que, en medio BM2 ajustado a biopelícula, estos péptidos no mostraron actividad antimicrobiana hasta 51.2 μ M. En los pocillos recubiertos de plasma, se inhibió la formación de biopelícula en un 50 % con 3.2 μ M de OP-145 y P159, mientras que se necesitó una concentración dos veces mayor de P145 y P148 para inhibir la formación de biopelícula en un 50 % (Figura 3B). La máxima inhibición de la biopelícula en presencia de plasma estuvo en el intervalo de 61 % (para P148) a 82 % (para P159).

Actividad inmunomoduladora: Neutralización de LPS y LTA por P145, P148 y P159

La IC50 e IC90 de OP-145 fueron 0.15 nM y 1.25 nM, respectivamente. P148 inhibió > 50 % de la producción de IL-12p40 inducida por LPS ya a 0.03 nM y P159 a 0.05 nM. El noventa por ciento de inhibición de IL-12p40 inducida por LPS se alcanzó con 0.25 nM de P148 y P159 y 0.75 nM de P145 (Tabla 11). La capacidad de los péptidos para neutralizar LTA se evaluó mediante la medición de la inhibición de la producción de IL-8 inducida por LTA en células sanguíneas. A una concentración final de 0.781 μ M, OP-145 inhibió >50 % de la producción de IL-8 inducida por LTA a 5 pg/ml (Tabla 11). P145, P148 y P159 tuvieron un aumento de 4 veces en la capacidad de neutralizar LTA. Los péptidos también se preincubaron con bacterias de *S. aureus* JAR060131 inactivadas por UV. La incubación con 0.195 μ M de OP-145 resultó en >50 % de reducción de la producción de IL-8 inducida por *S. aureus* JAR (Tabla 12). P159 tuvo una actividad neutralizante similar a OP-145, mientras que se necesitó una concentración 8 veces mayor de P145 y P148 para inhibir la producción de IL-8 inducida por *S. aureus* por >50 % (Tabla 12).

Tabla 12. Actividades neutralizantes de LPS, LTA y *S. aureus* de OP-145, P145, P148 y P159. Para la neutralización de LPS, el experimento se realizó mediante el uso de sangre de dos donantes. Para la neutralización de LTA y *S. aureus*, el experimento se realizó mediante el uso de sangre de un donante.

Péptido	Neutralización de LPS (IC90 en nM)	Neutralización de LTA (IC50 en μ M)	Neutralización de <i>S. aureus</i> (IC50 en μ M)
OP-145	1.25	0.781	0.195
P145	0.75	0.195	1.563
P148	0.25	0.195	1.563
P159	0.25	0.195	0.195

Reivindicaciones

1. Un polipéptido recombinante o aislado que comprende una secuencia de aminoácidos LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRVPVR, o que comprende una variante de dicha secuencia de aminoácidos, dicho polipéptido tiene actividad antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, antifúngica y/o antiparasitaria y tiene una actividad *in vitro* antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, antifúngica y/o antiparasitaria contra al menos una especie microbiana en presencia de 50 % de plasma, que es al menos 1.3 veces mayor que la actividad de OP-145 (acetil-IGKEFKRIVERIKRFLRELVRPLR-amida) cuando se determinan en las mismas condiciones, dicha variante de secuencia tiene al menos 14 aminoácidos y opcionalmente tiene:
- 1 a 8 de las siguientes sustituciones de aminoácidos:
 - sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de L, V, F, A, I, W, Y o Q por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo;
 - sustitución de R y/o K por A o un aminoácido cargado positivamente;
 - una o más sustituciones de un aminoácido por el D-aminoácido correspondiente;
 - una o más sustituciones de un aminoácido por un aminoácido no natural correspondiente, de manera que dicho aminoácido no natural correspondiente es un derivado del aminoácido natural de referencia; y/o
 - una secuencia retroinversa de al menos 14 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia de aminoácidos, en donde dicha variante de secuencia tiene al menos una secuencia de aminoácidos KRLVKILKRWWRYL, que opcionalmente tiene una o más sustituciones de aminoácidos como se definió anteriormente.
2. Un polipéptido de conformidad con la reivindicación 1, de manera que dicha una o más sustituciones de un aminoácido por el aminoácido no natural correspondiente se selecciona del grupo que consiste en:
- sustitución de un aminoácido por el aminoácido 6 correspondiente;
 - sustitución de R por homoarginina, ornitina, N5-carbamoilornitina o ácido 3-amino-propiónico;
 - sustitución de I por isodesmosina, N-metilisoleucina o alo-isoleucina;
 - sustitución de L por norleucina, desmosina o 5,5,5-trifluoro-leucina;
 - sustitución de K por 6-N-metilisina, ácido 2-aminoheptanoico, N-acetil lisina, hidroxilisina o alo-hidroxilisina;
 - sustitución de P por 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina o 1-acetil-4-hidroxi-L-prolina;
 - sustitución de W por 5-hidroxi-triptofano, 5-metoxi-triptofano o 5-fluoro-triptofano;
 - sustitución de Y por O-metil-L-tirosina, O-4-alil-L-tirosina o 3-cloro-tirosina; y
 - sustitución de V por norvalina, N-metilvalina o 3-fluoro-valina.
3. Un polipéptido de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho polipéptido opcionalmente se modifica en el extremo N terminal y/o en el extremo C terminal, que comprende preferentemente un residuo N-terminal acetilo, hexanoilo, decanoilo, miristoilo, NH-(CH₂-CH₂-O)₁₁-CO- o propionilo y/o que comprende un grupo C-terminal amida-, NH-(CH₂-CH₂-O)₁₁-CO-amida-, o uno o dos grupos amino-hexanoilo.
4. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 4.
6. Una célula huésped recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 4 y/o el vector de conformidad con la reivindicación 5.
7. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, la molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 4 y/o el vector de conformidad con la reivindicación 5 y al menos un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
8. Composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 7, que comprende, además, un agente antimicrobiano adicional, que se selecciona preferentemente del grupo que consiste en penicilinas, cefalosporinas, mupirocinas y carbapenems.
9. Composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 7 u 8 que comprende un vehículo de liberación controlada y/o de administración dirigida que comprende dicho polipéptido, de manera que dicho vehículo se selecciona preferentemente del grupo que consiste en nanopartículas, micropartículas, nanocápsulas, microcápsulas, liposomas, microesferas, hidrogeles, polímeros, complejos de lípidos, albúmina sérica, anticuerpos, ciclodextrinas y dextrano.
10. Recubrimiento para un dispositivo médico que comprende un polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
11. Polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y/o una molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 4 para usar como agente terapéutico, profiláctico o diagnóstico.

12. Polipéptido y/o molécula de ácido nucleico para usar de conformidad con la reivindicación 11 en el tratamiento de una infección microbiana, bacteriana, fúngica, viral y/o parasitaria y/o en el tratamiento de una afección resultante de una infección bacteriana, fúngica, viral y/o parasitaria.
- 5 13. Polipéptido y/o molécula de ácido nucleico para usar de conformidad con la reivindicación 11 o 12 en el tratamiento y/o la prevención de una infección asociada a biopelículas.
14. Un método para la preparación de un polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende:
- 10 -proporcionar una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3;
- transformar una célula huésped con dicha molécula de ácido nucleico;
- cultivar dicha célula huésped en condiciones que permitan la expresión de dicho polipéptido;
- cosechar dicho polipéptido a partir de dichas células;
- 15 - opcionalmente modificar dicho polipéptido en el extremo N terminal o en el extremo C terminal.

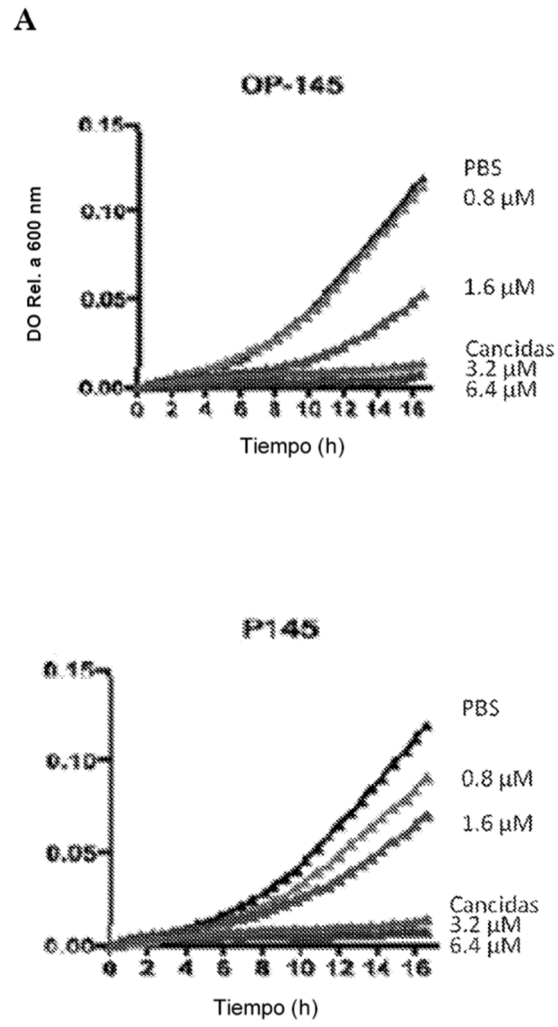


Figura 1

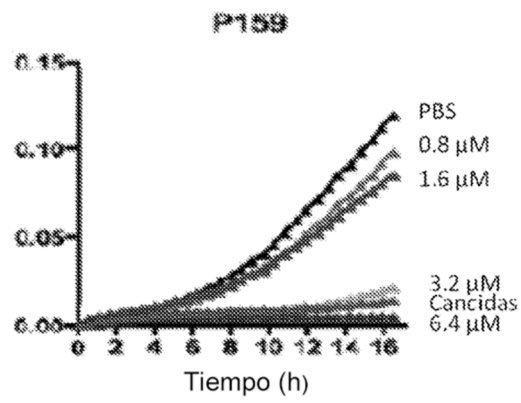
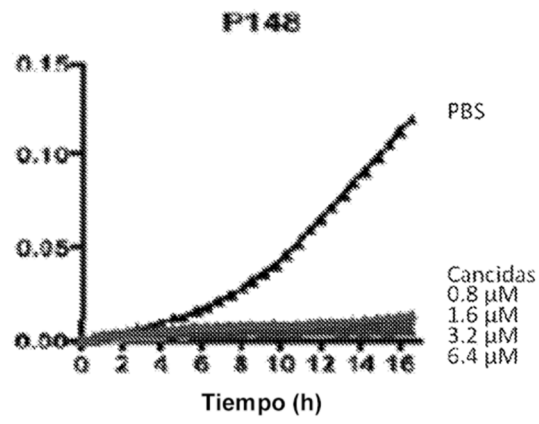


Figura 1, continuación

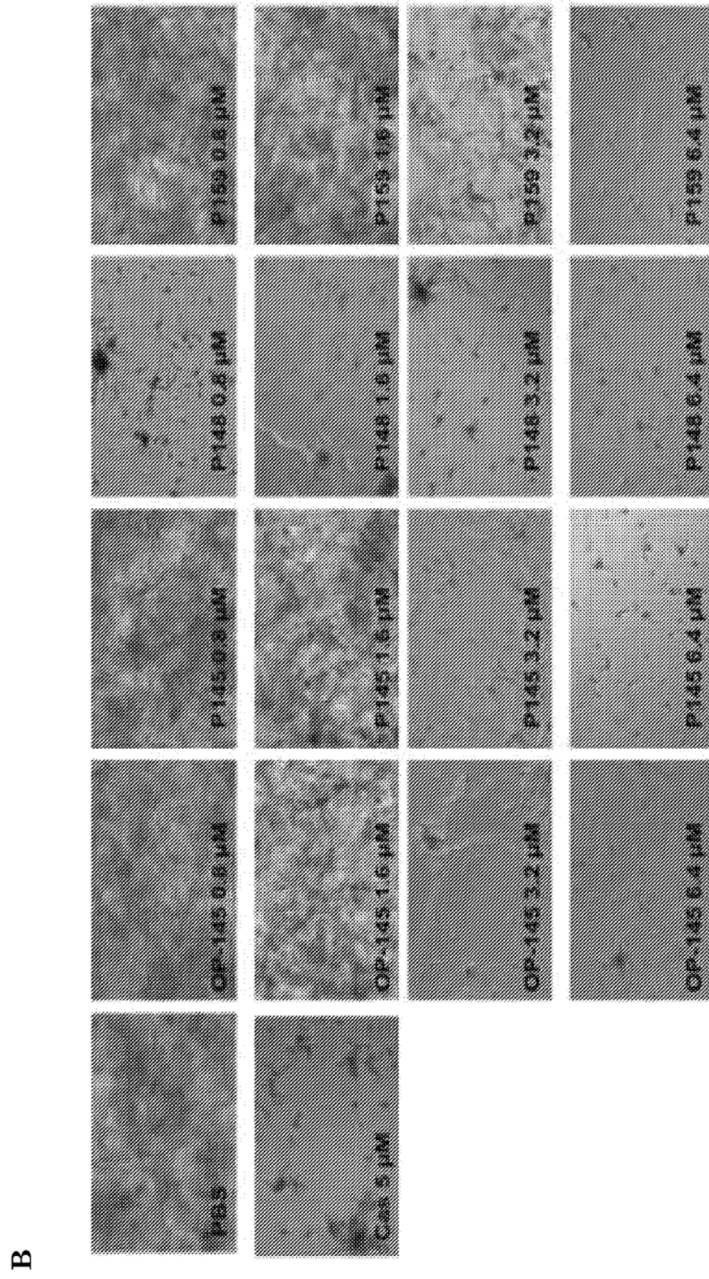


Figura 1, continuación

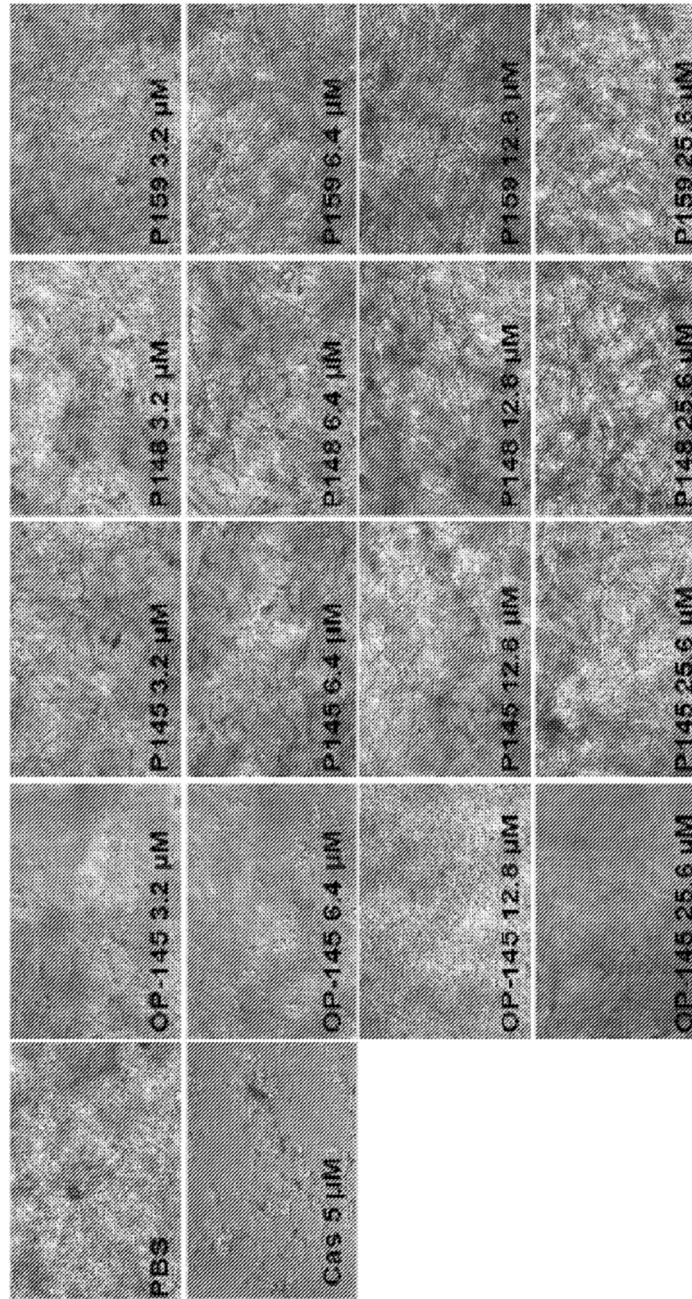


Figura 2

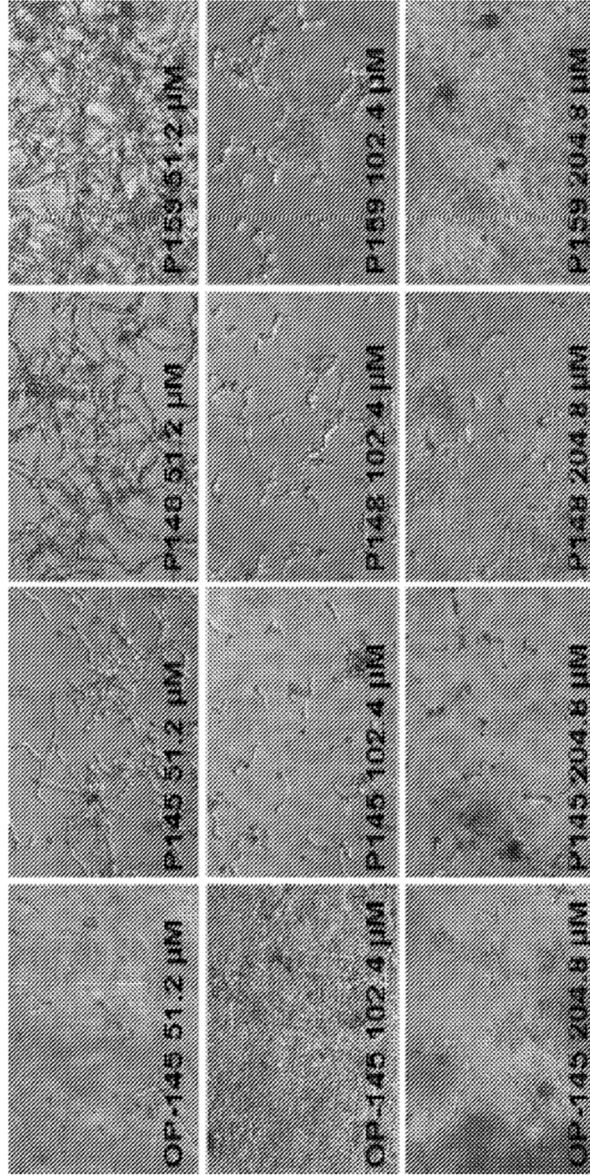


Figura 2, continuación

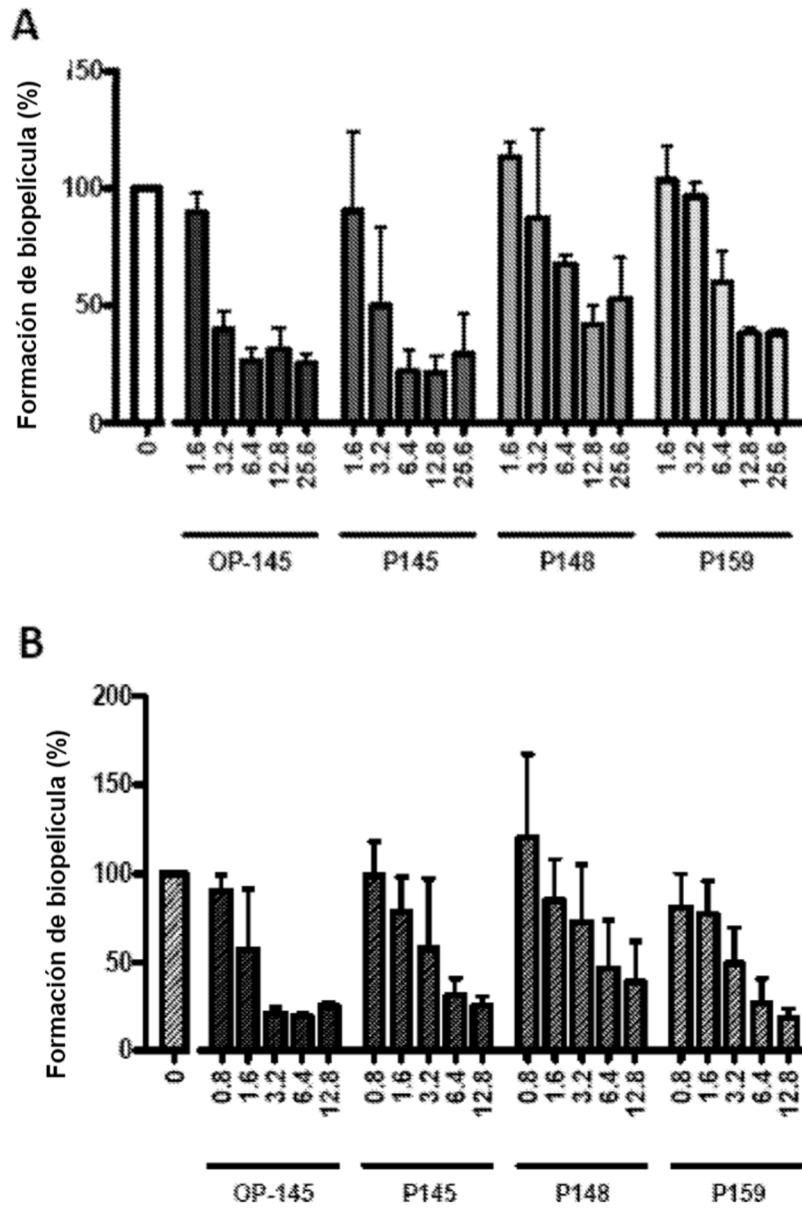


Figura 3