

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 785**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/465** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

**C07K 7/08** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2010** **E 16197733 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018** **EP 3150627**

54 Título: **Péptidos antimicrobianos basados en CMAP27**

30 Prioridad:

**13.02.2009 EP 09152810**

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

**26.04.2019**

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT UTRECHT HOLDING B.V. (100.0%)  
Yalelaan 40  
3584 CM Utrecht, NL**

72 Inventor/es:

**BIKKER, FLORIS JACOB;  
VAN DIJK, ALBERT;  
MARS-GROENENDIJK, ROSALIA;  
VELDHUIZEN, EDWIN JOHANNES ADRIANUS;  
VAN DER KLEIJ, DESIREE;  
HAAGSMAN, HENDRIK y  
MOLHOEK, ELISABETH MARGARETHA**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 710 785 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Péptidos antimicrobianos basados en CMAP27

La invención

5 La invención se relaciona con el campo de antibióticos, más específicamente con péptidos antibióticos, especialmente derivados de CMAP27.

Introducción

10 El siempre creciente número de patógenos resistentes a múltiples fármacos ha impulsado la necesidad de nuevos antibióticos. Los científicos en la última década han colocado mucho esfuerzo en el desarrollo agentes de antibacterianos novedosos, así como la mejora de los agentes quimioterapéuticos actuales. En forma interesante, muchos mamíferos e insectos tienen destacada resistencia a la infección bacteriana, debido a su capacidad de producir péptidos catiónicos de tamaño pequeño. Esta forma de protección, una parte importante del sistema inmunitario innato, proporciona una primera línea de defensa contra los patógenos invasores. Muchos científicos han enfocado su atención en estos péptidos antimicrobianos (AMP) ya que actualmente se consideran un grupo importante de antibióticos potencialmente novedosos.

15 Hasta ahora, se han aislado muchos tipos de péptidos antimicrobianos y secuencias de diversas fuentes durante décadas pasadas (para reseñas seleccionadas, véase: Otvos Jr., L. *Cell. Mol. Life Sci.* 2002, 59:1138; Otvos, Jr., L. *J. Peptide Sci.* 2000, 6:497; Tan, Y.-T. et al., *Mol. Med. Today* 2000, 6:309; Scott, M.G. and Hancock, R.E.W., *Crit. Rev. Immunol.* 2000, 20:407; Hancock, R.E.W. and Chapple, D.S. *Antimicrob. Agents Chemotizer.* 1999, 43:1317; Hetru, C. et al., In: *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*; Brey, P. and Hultmark, D. Ed., Chapman and Hall, London, 1998, pp. 40-66; Hancock, R.E.W. et al., *Adv. Microb. Physiol.* 1995 37:135; Vaara, M. *Microbiol. Rev.* 1992, 395). Dentro de la mayoría de péptidos antimicrobianos de mamíferos y aves descubiertos hasta la fecha pertenecen a la superfamilia catelicidina y defensina. Se ha encontrado ampliamente que las catelicidinas se distribuyen entre especies divergentes, es decir, en mamíferos, aves, peces y reptiles, lo que indica su importancia evolutiva, pero su repertorio difiere considerablemente entre especies. Los péptidos antimicrobianos de la familia catelicidina se codifican en el genoma como prepropéptidos y se dividen proteolíticamente para formar péptidos biológicamente activos que varían de 12 a 97 aminoácidos (Ramanathan, B. et al., 2002, *Microbes Infect.* 4:361-372). Basados en su estructura típica primaria y secundaria, los péptidos de terminal C liberados se pueden dividir en cuatro clases principales, a saber 1) péptidos  $\alpha$ -helicoidales, péptidos lineales, que adoptan una estructura anfipáticos cuando están en contacto con entornos que imitan las membranas biológicas (LL-37, Agerberth, B., et al., *PNAS* 1995, 92:195; SMAP-29, Anderson, R. C., et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48:673); 2) péptidos  $\beta$ -horquilla, péptidos cíclicos cortos formados por uno o dos puentes de disulfuro intramoleculares (protegrins, Kokryakov, V. N., et al., *FEBS Lett.* 1993, 327:231; dodecapeptide, Romeo, D., et al., *J. Biol. Chem.* 1988, 263:9573); 3) péptidos ricos en triptófano (indolicidina) (Indolicidin, Selsted, M. E., et al., *J. Biol. Chem.* 1992, 267:4292) y 4) péptidos ricos en prolina/arginina (bactenecins, Gennaro, R., et al., *Infect. Immun.* 1989, 57:3142; PR39, Agerberth, B., et al., *Eur. J. Biochem.* 1991, 202:849).

40 La mayoría de catelicidinas muestran una amplia actividad contra diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos, protozoarios y virus con envoltura (Zaiou, M. and Gallo, R.L., 2002, *J. Mol. Med.* 80:549-561). Van Dijk et al., (2005, *Vet. Immunol. Immunopath.* 106:321-327) que encuentran una nueva proteína de la familia catelicidina en pollos. Este pertenece al grupo de péptidos 1 ( $\alpha$ -helicoidal) y se han denominado CMAP27, pero también se conocen como CATH-2. Al igual que otros miembros de la familia catelicidina el CMAP27 se codifica como un prepropéptido (154 aminoácidos) y después de procesamiento proteolítico, se libera un péptido de terminal C largo de 27 aminoácidos que ha demostrado potente actividad antimicrobiana de amplio espectro. La secuencia de aminoácidos de este péptido de terminal C, denominado CMAP27, es RFGRFLRKIRRFPRKVTITIQGSARFG.

Resumen de la invención

45 Se ha encontrado sorprendentemente que el terminal C truncado y amidado se deriva del CMAP27 y las variantes del mismo producen péptidos antimicrobianos con igual actividad o actividad antimicrobiana y/o inmunomoduladora más potente y que, en forma importante, no afectan las células sanguíneas humanas.

De esta manera la invención se dirige a derivados CMAP27 novedosos que tienen la secuencia de aminoácidos general  $RX_1GRX_2LRKIRRX_3X_4$

En la que  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  pueden ser independiente F, L, W, o Y, y  $X_4$  puede tener de 0-9 aminoácidos, preferiblemente la secuencia de aminoácidos R,  $RX_5K$ ,  $RX_5KVT$  o  $RX_5KVTITIQ$ , en el que  $X_5$  es P, G o L, preferiblemente P.

- 5 También parte de la invención son los métodos para producir los compuestos antibióticos novedosos mencionados anteriormente.

Parte adicional de la invención son las composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los péptidos de la invención, sea o no en la presencia de otros compuestos farmacéuticamente activos.

- 10 También parte de la invención es el uso de un péptido de acuerdo con la invención como un fármaco y/o para la preparación de un medicamento que se puede utilizar como un antibiótico.

En otra realización la invención comprende el uso de CMAP27 y los derivados de CMAP27 como se describió anteriormente para reforzar la respuesta inmunitaria. Preferiblemente dicho uso se logra al utilizarlos como adyuvantes en preparaciones de vacunas.

#### Descripción detallada de la invención

- 15 El "CMAP27" como se utiliza aquí se define como la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos RFGFRFLRKIRRFKVTITIQGSARFG, pero también la versión amidada de terminal C RFGFRFLRKIRRFKVTITIQGSARF-NH<sub>2</sub>, también denominada como CMAP1-26-NH<sub>2</sub>, que está comprendida en esta definición. Se sugiere que el CMAP1-26-NH<sub>2</sub> es la forma activa del péptido, en razón a que este se conoce en las catelicidinas cuya amidación del residuo de glicina del terminal C agrega funcionalidad (Shinnar, A.E. et al., 2003, Bioorg. Chem. 31:425-436; Tomasinsig, I. And Zanetti, M, 2005, Curr. Prot. Pept. Sci. 6:23-34).

- 25 Los inventores han encontrado que las versiones truncadas C amidadas y mutadas del péptido CMAP27 tienen una excelente actividad antimicrobiana, así como propiedades inmunomoduladoras, que normalmente refuerzan la respuesta inmunitaria y se prefieren como compuestos terapéuticos, debido a que tienen un efecto menos pronunciado en las células sanguíneas. Como se muestra en la parte experimental, la actividad hemolítica de los nuevos péptidos antimicrobianos de la invención es menor que la actividad hemolítica del CMAP27. Adicionalmente, los péptidos de la invención tienen, por lo menos en diversas clases, muestran una mejor actividad inmunomoduladora que el CMAP27. Este último efecto es importante, ya que potencia el efecto antimicrobiano del péptido.

- 30 Los péptidos de la presente invención son formas truncadas del péptido CMAP27 y variantes de los mismos, indicados generalmente aquí como derivados CMAP27. Los péptidos se truncan en el terminal C del péptido CMAP27 y pueden tener una longitud de 12-21 aminoácidos. Aparentemente de esta manera, la parte rica en arginina del péptido CMAP27 es responsable del efecto antimicrobiano e inmunomodulador.

- 35 Adicionalmente, se ha observado que los derivados CMAP27 (con algunos de los aminoácidos sustituidos por otros aminoácidos que aparecen en forma natural), tienen actividad antimicrobiana, e inmunomoduladora alterada y, lo que es importante, en el cual se mantiene baja la actividad hemolítica. Adicionalmente, mientras que el CMAP27 se mantiene activo en bacterias del tipo Gram(-), nuestros experimentos han mostrado que diversos derivados del CMAP27 también son efectivos contra bacterias del tipo Gram(+) tal como *Streptococcus aureus* y *Bacillus anthracis*. No necesita explicación adicional darse cuenta de que dicha ampliación del espectro antibiótico es un hallazgo clínicamente muy importante y relevante.

- 40 Las sustituciones que han sido probadas todas están involucradas con cambios en la parte hidrófila del CMAP27 de terminal C truncado (1-15) anfipático. Se ha mostrado que la sustitución de uno o más de los residuos Phe en esta molécula con leucina o triptófano resulta en una molécula con actividad alterada para CMAP27 o su forma truncada. Basado en estas sustituciones es razonable que las sustituciones de triptófano de los otros aminoácidos en el plano hidrofóbico del péptido, es decir leucina 6 e isoleucina 9, puedan mejorar en forma similar la actividad antibacteriana e inmunomoduladora del CMAP27 o cualquiera de los derivados CMAP27 presentados.

Las sustituciones de aminoácidos pueden alterar significativamente el intrincado balance entre la anfipaticidad del péptido, carga neta, propensión para formación de hélice, parámetros que se vinculan con la estabilidad de los péptidos (formación de autoagregados en soluciones acuosas) y su unión a y perturbación de membranas biológicas. Más aún, las sustituciones de aminoácidos sencillas o múltiples pueden hacer variantes de péptidos menos citotóxicas, aunque mantienen actividades microbicidas y/o inmunomoduladoras. Adicionalmente, las sustituciones de aminoácidos pueden proporcionar protección parcial contra enzimas proteolíticas.

De los resultados también parece que el residuo arginina en la posición 1 del CMAP27 es importante para la actividad antimicrobiana, en razón a que todos los péptidos probados en donde se elimina este primer residuo no mostraron o solo mostraron difícilmente alguna actividad antimicrobiana. La situación en el extremo del terminal C del péptido truncado parece menos restringida, de esta manera permitiría la modificación adicional del extremo de terminal C del derivado CMAP27. La modificación de uno o ambos terminales pueden incluir la acetilación del terminal N y/o la amidación del terminal, modificaciones que han demostrado protección contra exoproteasas y en esa forma prolongan significativamente el tiempo de vida útil in vivo de péptidos pequeños (Brinckerhoff, L.H. et al., In. J. Cancer 1999, 83:326). La modificación de uno o ambos terminales permite el acoplamiento del péptido u otros grupos funcionales, tal como otras secuencias de aminoácidos (creando por lo tanto posiblemente proteínas multiméricas), u otras biomoléculas, que pueden funcionar como portadores o etiquetas. En una realización específica la molécula portadora también funciona como una molécula objetivo, que es capaz de localizar la infección bacteriana y puede unirse a la bacteria, con el fin de llevar el antibiótico en la vecindad de la célula (bacteria) para atacarla.

El término "péptido" como se utiliza aquí significa una secuencia de aminoácidos acoplados mediante un enlace de péptidos, en los que los aminoácidos son uno de los veinte aminoácidos que constituyen el péptido naturalmente y en el que los aminoácidos pueden estar en la configuración L o en la configuración D, o, para isoleucina y treonina en la configuración D-allo (solo inversión en uno de los centros quirales). Un péptido de acuerdo con la invención puede ser lineal, es decir, en el que el primero y último de los aminoácidos de la secuencia tiene un grupo NH<sub>2</sub>- o COOH respectivamente o tienen terminal N- (acetilación) y/o terminal C (amidación) modificadas.

Los péptidos de la invención se pueden producir sintéticamente o, cuando aplica, recombinantemente mediante métodos convencionales. Las realizaciones específicas de los péptidos antibióticos derivados de CMAP27 se describen en detalle en la parte experimental adelante. Preferiblemente, los péptidos o derivados de péptidos de la invención se preparan convencionalmente mediante técnicas de síntesis química conocida, tal como, por ejemplo, las que se describen por Merrifield (J. Am. Chem. Soc. (1963) 85:2149-2154).

Alternativamente, los péptidos de la invención se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante al clonar y expresar dentro un microorganismo anfitrión o célula un fragmento de ADN que lleva una secuencia de ácido nucleico que codifica uno de los péptidos descritos anteriormente. Las secuencias de codificación de ácido nucleico se pueden preparar sintéticamente, o se pueden derivar de secuencias de ácido nucleico existentes (por ejemplo, la codificación de secuencia para CMAP27 tipo silvestre) mediante mutagénesis dirigida al sitio. Estas secuencias de ácido nucleico se pueden clonar luego en un vector de expresión adecuado y transformar o transfectar en una célula huésped adecuada, tal como *E. coli*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptomyces*, células de mamíferos (tal como células CHO, HEK o COS-1), levaduras (por ejemplo *Saccharomyces*, *Schizosphyllum*), células de insectos o sistemas de expresión víricos, tal como sistemas baculovirus, o células vegetales. Un experto en la técnica tendrá el conocimiento de las técnicas de construcción de secuencias de ácidos nucleicos y proporcionará medios para permitir su expresión.

Específicamente se pueden utilizar células de vegetales ventajosamente para expresión de los péptidos de la invención, en razón a que el péptido en dicho caso se puede administrar directamente a un humano o animal, es decir, sin ninguna purificación adicional.

Posteriormente, el péptido se puede aislar del cultivo de las células anfitrionas. Esto se puede lograr mediante técnicas de aislamiento y purificación de proteína comunes, que están disponibles en la técnica. Dichas técnicas pueden por ejemplo implicar inmunoadsorción o cromatografía. También es posible proporcionar los péptidos con una etiqueta (tal como etiqueta histidina) durante la síntesis, lo que permite una rápida unión y purificación, después de lo cual la etiqueta se retira enzimáticamente para obtener el péptido activo.

Alternativamente, los péptidos se pueden producir en sistemas libres de células, tal como el sistema libre de células Expressway™ de Invitrogen.

Algunos resúmenes abreviados de métodos que se pueden aplicar en la preparación de péptidos se describen en: W. F. Anderson, Nature 392 Supp., 30 April 1998, p. 25-30; Pharmaceutical Biotechnology, Ed. D. J. A. Crommelin and R. D. Sindelar, Harwood Academic Publishers, 1997, p. 53-70, 167-180, 123-152, 8-20; Protein Synthesis: Methods and Protocols, Ed. R. Martin, Humana Press, 1998, p. 1-442; Solid-Phase Peptide Synthesis, Ed. G. B. Fields, Academic Press, 1997, p. 1-780; Amino Acid and Peptide Synthesis, Oxford University Press, 1997, p. 1-89.

Péptidos novedosos de acuerdo con la fórmula de la reivindicación 1 se pueden preparar fácilmente por el experto en la técnica.

Los derivados CMAP27 de la invención se pueden utilizar solos o en combinación en la forma de multímeros. Combinaciones de péptidos adecuadas de la invención comprenden concatémicos de péptidos de la invención acoplados en serie a cada uno a través de separadores, por ejemplo en la forma de un dímero péptido, un trímero péptido, etc., en el que los péptidos individuales se alinean posteriormente. Los péptidos sencillos o cadenas peptidomiméticas se pueden acoplar a una proteína biocompatible, tal como albúmina de suero humana, anticuerpo humanizado, liposoma, micelas, polímeros sintéticos, nanopartículas, y fagos. Alternativamente, multímeros de péptidos individualmente combinados de la invención se pueden preparar en la forma de dendrímeros, o grupos, en el que se ligan tres o más péptidos a un centro común.

Aún otras combinaciones en la forma de multímeros se pueden formar mediante perlas sobre el sustrato del cual se exponen los péptidos de la invención. Las perlas pueden funcionar luego como un portador para los péptidos y pueden funcionar de manera similar como una etiqueta detectable. Los multímeros pueden, por ejemplo, ser preparados al biotinilar el terminal N de las cadenas de péptidos y posterior formación de complejos con estreptavidina. En razón a que la estreptavidina es capaz de unirse a las moléculas 4 biotina o conjugados con alta afinidad, se pueden formar complejos de péptidos tetraméricos muy estables mediante este método. Los multímeros se pueden componer de péptidos idénticos o diferentes o peptidomiméticos de acuerdo con la invención. Preferiblemente, sin embargo, los multímeros de la invención están compuestos de dos o más péptidos o peptidomiméticos, en los que cada componente constituye un activo de la actividad biocida total (focalización, actividad antimicrobiana, barrido).

Una composición farmacéutica de la invención comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más derivados de CMAP27 de la presente invención. Una vez formuladas, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar directamente al sujeto en un método para tratar infección bacteriana que comprende administrar a un sujeto en necesidad de este una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición de la invención.

Suministro directo de las composiciones en general se logrará mediante la aplicación tópica u otras formas de administración, ya sea oralmente, parenteralmente, subcutáneamente, sublingualmente, intralesionalmente, intraperitonealmente, intravenosamente o intramuscularmente, pulmonarmente, o suministrada al espacio intersticial de un tejido.

La composición farmacéutica también puede comprender un portador farmacéuticamente adecuado aceptable o diluyente y puede estar en la forma de una cápsula, comprimido, pastilla, gragea, píldora, gotica, supositorio, polvo, aerosol, vacuna, ungüento, pasta, crema, inhalante, parche, aerosol, y similares. Como portador farmacéuticamente aceptable, se pueden utilizar cualquier disolvente, diluyente u otro vehículo líquido, auxiliar de dispersión o suspensión, agente activo de superficie, agente isotónico, agente espesante o emulsificante, conservante, agente de encapsulación, aglutinante sólido o lubricante lo que sea más adecuado para una forma de dosificación particular y que es compatible con el péptido o conjugado del péptido.

Una composición farmacéutica puede contener de esta manera un portador farmacéuticamente aceptable. El término "portador farmacéuticamente aceptable" también incluye un portador para administración de un agente terapéutico, tal como anticuerpos o un polipéptido, genes, y otros agentes terapéuticos. El término se refiere a cualquier portador farmacéutico que no induce por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición, y que se puede administrar sin exceso de toxicidad. Los portadores adecuados pueden ser moléculas grandes, lentamente metabolizadas tal como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas inactivas de virus. Dichos portadores son bien conocidos por los expertos en la técnica.

- Las sales de los péptidos o equivalentes funcionales se preparan mediante métodos conocidos, que normalmente implican la mezcla del péptido con un ácido farmacéuticamente aceptable para formar una sal de adición ácida o con una base farmacéuticamente aceptable para formar una sal de adición básica. El experto en la técnica puede decidir fácilmente si un ácido o una base es farmacéuticamente aceptable después de tomar en consideración el uso pretendido específico del compuesto. Por ejemplo, no todos los ácidos y bases que son aceptables para aplicaciones ex vivo se pueden utilizar para composiciones terapéuticas. Dependiendo del uso pretendido, los ácidos farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos orgánicos e inorgánicos tal como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido maleico, ácido malónico, ácido cinámico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fosfórico, y ácido tiociánico, que forman sales de amonio con grupos amino libres de péptidos y equivalentes funcionales. Bases farmacéuticamente aceptables, que forman sales de carboxilato con grupos de péptidos carboxílicos libres y equivalentes funcionales, incluyen etilamina, metilamina, dimetilamina, trietilamina, isopropilamina, Diisopropilamina, y otras mono-, di y trialkilaminas, así como arilaminas. Más aún, también se abarcan solvatos farmacéuticamente aceptables.
- Se pueden utilizar aquí sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales ácidas minerales tal como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tal como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Se encuentra disponible una discusión a fondo de los excipientes farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991).
- Portadores farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener líquidos tal como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares, tal como agentes humectantes o emulsificantes, sustancias reguladoras del pH y similares, pueden estar presentes en dichos vehículos. Normalmente, también se pueden preparar composiciones terapéuticas como soluciones o suspensiones inyectables como líquidos; formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de inyección.
- Para tratamiento terapéutico, se puede producir el péptido o péptido-conjugado como se describió anteriormente y aplicar al sujeto en necesidad del mismo. El péptido o péptido conjugado se puede administrar a un sujeto mediante cualquier ruta adecuada, preferiblemente en la forma de una composición farmacéutica adaptada a dicha ruta y en una dosificación que es efectiva para el tratamiento pretendido.
- Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden contener otros agentes activos, tal como antibióticos convencionales (como por ejemplo, vancomicina, estreptomocina, tetraciclina, penicilina) u otros compuestos antimicrobianos, tal como antifúngicos, por ejemplo itraconazol o miconazol. También se pueden agregar compuestos que alivian otros síntomas de infección, tal como fiebre (por ejemplo, ácido salicílico) o erupción cutánea.
- Las dosificaciones terapéuticamente efectivas del péptido o conjugado de péptido requerido para tratamiento de una infección bacteriana en el cuerpo de un sujeto humano o animal, pueden ser determinadas fácilmente por el experto en la técnica, por ejemplo al utilizar modelos animales.
- El término "cantidad terapéuticamente efectiva" como se utiliza aquí se refiere a una cantidad de un terapéutico, viz. un péptido o conjugado de péptido de acuerdo con la presente invención, para reducir o evitar el crecimiento y colonización de bacterias, o exhibir un efecto terapéutico o profiláctico detectable. El efecto se puede detectar, por ejemplo, al cultivar biopsias y ensayar la actividad bacteriana o mediante cualquier otro método adecuado para evaluar el progreso o severidad de la infección bacteriana. La cantidad efectiva precisa para un sujeto dependerá de la salud y el tamaño del sujeto, la naturaleza y alcance de la afección, y los terapéuticos o combinación de terapéuticos seleccionados para administración. De esta manera, no es útil especificar por adelantado una cantidad efectiva exacta. Sin embargo, la cantidad efectiva para una situación dada se puede determinar mediante experimentación de rutina y está dentro del juicio del médico o experimentador. Específicamente, las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para reducir o evitar la infección bacteriana y/o acompañar manifestaciones físicas o biológicas, tal como la reducción de la fiebre. Los métodos que permiten al médico establecer las dosificaciones iniciales son conocidos en la técnica. Las dosificaciones determinadas que se van a administrar deben ser seguras y eficaces.
- Para los propósitos de la presente invención, una dosis efectiva será de aproximadamente 0.01 µg/kg a 50 mg/kg, preferiblemente 0.5 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg del péptido o conjugado de péptido en el individuo al que se

administra. El experto puede determinar fácilmente las dosificaciones para alcanzar los efectos terapéuticos de la composición farmacéutica descrita aquí.

Aún en otra realización alterna, el péptido o conjugado de péptido o composiciones de la invención se pueden administrar a partir de una matriz de liberación controlada o sostenida insertada en el cuerpo del sujeto.

5 También puede ser ventajoso administrar un compuesto de la invención en una forma de dosificación de transmucosa. Esta ruta de administración no es invasiva y es amigable con el paciente; al mismo tiempo puede conducir a una biodisponibilidad mejorada del compuesto en comparación con administración oral, específicamente si el compuesto no es estable en los fluidos del sistema digestivo, o si es muy grande para ser absorbida desde el intestino en forma efectiva. La administración por transmucosa es posible, por ejemplo, por vía nasal, bucal, 10 sublingual, gingival o formas de dosificación vaginal. Estas formas de dosificación se pueden preparar mediante técnicas conocidas; se pueden formular para representar gotas nasales o pulverizaciones, insertos, películas, parches, geles, ungüentos o comprimidos. Preferiblemente, los excipientes utilizados para la forma de dosificación de transmucosa incluyen una o más sustancias que proporcionan mucoadhesión, prolongando de esta manera el tiempo de contacto de la forma de dosificación con el sitio de absorción y por lo tanto aumentar potencialmente el 15 grado de absorción.

En una realización adicional, los compuestos se administran a través de la ruta pulmonar, utilizando un inhalador de dosis medida, un nebulizador, un pulverizador de aerosol o un inhalador de polvo seco. Se pueden preparar formulaciones adecuadas mediante métodos y técnicas conocidos. En algunos casos también puede ser factible la administración transdérmica, rectal, u ocular.

20 Puede ser ventajoso utilizar métodos dirigidos o de suministro de fármacos por adelantado para suministrar un compuesto de la invención en forma más efectiva. Por ejemplo, si se selecciona una ruta de administración no parenteral, una forma de dosificación adecuada puede contener un agente mejorador de la biodisponibilidad, que puede ser cualquier sustancia o mezcla de sustancias que aumenta la disponibilidad del compuesto. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la protección de la degradación del compuesto, tal como mediante un inhibidor de 25 enzimas o un antioxidante. Más preferiblemente, el agente mejorador aumenta la biodisponibilidad del compuesto aumentando la permeabilidad de la barrera de absorción, normalmente es una mucosa. Los mejoradores de permeación pueden activarse a través de diversos mecanismos; en algunos casos la fluidez de las membranas de mucosas, mientras que otros abren o amplían el espacio de las uniones entre las células de la mucosa. Todavía otros reducen la viscosidad de la mucosa que cubre la capa de célula de mucosa. Entre los mejoradores de biodisponibilidad preferidos están las sustancias anfífilas tal como derivados de ácido cólico, fosfolípidos, etanol, 30 ácidos grasos, ácido oleico, derivados de ácido graso, EDTA, carbómeros, policarbófilos y quitosano.

Indicadores para los cuales los derivados CMAP27 de la invención se pueden utilizar son infecciones bacterianas mediante bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, tal como *E. coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Salmonella typhimurum*, *Erwinia carotovora*, *E. herbicola*, *E. chrysanthemi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, 35 *Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus megaterium*, *Clostridium botulinum*, *Vibria cholerae*, *Bacillus anthracis*, *Brucella spp.*, *Coxiella burnetii*, *Yersinia pestis*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pasteurella aeruginosa*, *Pneumococcus spp.*, *Salmonella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyrogenes*, *Micrococcus luteus*, *Moraxella*, *Neisseria gonorhoea*, *Aerobacter*, *Borellia*.

40 Y luego del uso terapéutico para el tratamiento de infecciones, también en armas biológicas, también es posible utilizar los péptidos antibióticos de la invención en una composición bactericida que se puede utilizar para limpiar las superficies y/o equipo. Otro campo de aplicación es en el empaque, en donde los péptidos se pueden vincular o incorporar en el material de empaque para el empaque de alimentos u otro material que es fácilmente degradable por microorganismos. Los derivados CMAP27 de la invención se pueden utilizar específicamente para empaque, ya que no son tóxicos luego de contacto o ingestión.

45 En otra realización de la invención, los derivados CMAP27, también el CMAP27 de longitud completa o su versión amidada CMAP1-26-NH<sub>2</sub>, se pueden utilizar para reforzar el sistema inmunitario. En este aspecto pueden ser parte de las composiciones inmunológicas, especialmente composiciones de vacuna, en la que pueden actuar como coadyuvantes. Un adyuvante es una sustancia que mejora la respuesta inmunitaria estimulada mediante un antígeno cuando se administra con el antígeno. De acuerdo con lo anterior, parte de la invención son las composiciones 50 inmunológicas que comprenden un antígeno y uno o más péptidos CMAP27 seleccionados del grupo que consiste de derivados de CMAP27 como se describe aquí, el CMAP27 de longitud completa y su versión amidada CMAP1-26-NH<sub>2</sub>. De manera similar también las composiciones de vacuna que comprenden un antígeno y uno o más

péptidos CMAP27 seleccionados del grupo que consiste de derivados CMAP27 como se describe aquí, el CMAP27 de longitud completa y su versión amidada CMAP1-26-NH<sub>2</sub> hacen parte de la presente invención, debido al uso de los compuestos mencionados anteriormente como adyuvante.

Ejemplos

5 Ejemplo 1 Actividad antimicrobiana

Aislados de bacterias de por ejemplo *Vibrio cholerae* (BM301), *Staphylococcus aureus* (BM253), *Bacillus anthracis* (BM233) y *Yersinia pestis* (BM360) se sembraron en un medio de agar soya Triptico (TSA). Para cada uno de estos cultivos celulares se utilizó una colonia que se va sembrar en medio del fluido de infusión de cerebro corazón (BHI). Los cultivos bacterianos se cultivaron durante la noche a 35°C bajo condiciones aeróbicas. Se realizaron ensayos antibacterianos en placas de 100 pozos de panal (Labsystems 2 placas, con cubierta de 100 pcs, art. N° 9502550) con un volumen final de 100 µl BHI por pozo. Se diluyeron péptidos de prueba en BHI para dar una concentración inicial de 250 µg/ml y se diluyó adicionalmente en serie. El cultivo bacteriano fue diluido 1:10 en HBI y después de 2 horas de cultivo adicional se diluyo a una concentración de aproximadamente 10<sup>6</sup> CFU/mL y se inoculo en pozos de placa de micro título (10 µL). Las placas se incubaron mientras se agitó gentilmente a 37°C durante 16 h y durante este tiempo se midió el crecimiento bacteriano en 600 nm, utilizando a BioScreen C MB R. Después de 16 horas, se calculó la densidad celular exacta al cultivar en placas series de dilución (100 µL) en placas de TSA (por duplicado). El porcentaje de crecimiento se calculó mediante la relación del índice de crecimiento de las bacterias de control y el índice de crecimiento de las bacterias tratadas con péptido.

La secuencia de aminoácidos de los péptidos ensayados y la calificación de su actividad antimicrobiana se presentan en la Tabla 1.

Ejemplo 2 Actividad hemolítica

Se recolectaron eritrocitos de individuos humanos saludables y pollos mediante centrifugación a 75×g durante 15 min. Las células se lavaron tres veces en PBS, se complementaron con 287 mM de glucosa como osmoprotector. La suspensión celular se normalizó a un valor de hemoglobina de 2 mmol/l en PBS o regulador de fosfato de glucosa isotónico. En una placa de microtítulo (Greiner) de fondo V de 96 pozos, se agregó 100 µl de esta suspensión por triplicado a 100 µl de series de dilución de péptidos en el mismo regulador, iniciando con una concentración de 100 µM. Después de 1 h de incubación a 37°C, las placas de microtítulo se centrifugaron a 550×g durante 5 min y se midió la absorbancia en el sobrenadante en 450 nm. Se alcanzó hemólisis completa mediante la adición de Tween-20 al 1%. Se calculó el porcentaje de hemólisis como sigue: [(A450 del péptido tratado muestra-A450 de la muestra tratada con regulador)/(A450 de Tween-20 tratado muestra-A450 de muestra tratada con regulador)] × 100%. Los resultados se dan en las Tablas 1 y 2 de acuerdo con el siguiente esquema:

Clasificación de hemólisis

	> 75% de muertes celulares	++
	> 50% de muertes celulares	+
35	> 25% de muertes celulares	+/-
	< 25% de muertes celulares	-
	< 5% de muertes celulares	--

Ejemplo 3 Actividad inmunomoduladora: Neutralización de LPS

Luego de selección de la actividad hemolítica y antimicrobiana, los derivados CMAP27 de la invención también se han ensayado para detectar sus actividades inmunomoduladoras.

5 Una de las propiedades inmunomoduladores probadas es la capacidad neutralizante dirigida contra una respuesta inmunitaria abundante y perjudicial contra endotoxinas, tal como LPS (lipopolisacáridos). Se realizó un ensayo que permitió determinar la capacidad neutralizante LPS del CMAP27 y derivados del CMAP27 en la presencia de células humanas primarias (PBMC: células mononucleares de sangre periférica), una estirpe de célula humana (THP-1: estirpe de célula de leucemia monocítica aguda humana) y una estirpe de células de pollo (HD11: estirpe de célula macrófaga de pollo).

10 Las células PBMC y THP-1 se cultivaron en placas de 96 pozos ( $1 \times 10^6$  células/pozos). Se cultivaron células HD11 en placas de 96 pozos en una concentración  $3 \times 10^5$  células/pozo. Posteriormente se estimularon con LPS en la presencia o ausencia del compuesto de prueba durante 5 o 24 horas. Después de estimulación de las células PBMC y THP-1, se ensayó el sobrenadante para determinar la cantidad de de citoquinas proinflamatorias (TNF, IL-6), IL-8 y citoquina antiinflamatoria IL-10 con ELISA. Después de estimulación de células HD11, las células se sometieron a lisis, después de lo cual se utilizó ARN transcrito para determinar los niveles de transcripción de las citoquinas IL-1 $\beta$  inflamatoria, IL-8 y quimoquinas MCP-3 (proteína-3 quimiotáctica de monocitos) y RANTES mediante PCR en tiempo real. En la Tabla 1 y 2 se resumen los datos de estos experimentos, en los cuales la inhibición del LPS evoca la respuesta que se da en comparación con la respuesta en células de control (100%) de acuerdo con el siguiente esquema:

	> 95% de inhibición	++
20	> 75% de inhibición	+
	> 25% de inhibición	+/-
	< 25% de inhibición	-

25 También se realizó un ensayo de migración, en placas de 96 pozos del ChemoTx System (Neuro Probe, Inc). El péptido se aplica al componente inferior de las placas y este se cubre con un filtro. 50.000 THP-1 etiquetadas AM de calceína se aplicaron por pozo al filtro. Después de incubación durante 2 horas se puede determinar la cantidad de células que han migrado a través del filtro por medio de medición de fluorescencia. Los resultados se dan en la Tabla 1 de acuerdo con el siguiente esquema:

	> 6000 células migradas	++
	> 2000 células migradas	+
30	> 1000 células migradas	+/-
	< 1000 células migradas	-

Ejemplo 4 Actividad de inmunomodulación: Producción de citoquinas inducidas por péptidos

Además de detectar de la capacidad neutralizante en la producción de citoquinas inducidas por LPS, también se han ensayado los derivados CMAP27 por sus efectos directos inducidos por péptidos en células inmunitarias.

35 Para este propósito, se cultivaron PBMC humano en placas de 96 pozos ( $1 \times 10^6$  células/pozo) y se cultivaron células HD11 en placas de 96 pozos a una concentración  $3 \times 10^5$  células/pozo. Posteriormente se estimularon con medio de cultivo celular en presencia o ausencia de derivados CMAP27 durante 4 (HD11), 5 (PBMC) o 24 horas. Después de estimulación de PBMC, se ensayó el sobrenadante para determinar la cantidad de quimiocinas MCP-1 (proteínaquimiotáctica monocitos-1) con ELISA. Después de estimulación de células HD11, las células se

sometieron a lisis, después de lo cual se utilizó el ARN transcrito para determinar los niveles de transcripción de IL-1 $\beta$ , IL-8, MCP-3 y RANTES mediante PCR en tiempo real.

En Tabla 1 y 2 se resumen los datos de estos experimentos, en los que la respuesta inducida por péptidos se da en comparación con la respuesta en células de control (100%) de acuerdo con el siguiente esquema:

5 Producción de MCP-1 inducida por péptidos como se determina por ELISA:

>480% De producción de MCP-1 (>95% de máx.) ++

>400% De producción de MCP-1 (>75% de máx.) +

>200% De producción de MCP-1 (>25% de máx.) +/-

<200% De producción de MCP-1 (<25% de máx.) -

10 Producción de citoquinas inducida por péptidos como se determina por PCR en tiempo real:

> aumento de 8 veces en niveles de expresión génica ++

> aumento de 4 veces en niveles de expresión génica +

> aumento de 2 veces en niveles de expresión génica +/-

< aumento de 2 veces en niveles de expresión génica -

Tabla 1

nombre	Secuencia	Toxicidad (hRBC)	Actividad Antibacterial				Modulación inmunitaria					Peptido inducido	Migración			
			Gram (+)	Gram (-)	Group (+)	Neutralización LPS	hPBMCs	THP-1	hPBMCs	THP-1						
CMAP27	RFGRFLRKIRRFPAVTTIQSARFQ	-	-	++	-	-	++	+	+	+	+	+	++	+	+	+/-
CMAP28-IRB	RFGRFLRKIRRFPAVTTIQSARF-IRB	-	-	-	-	-	++	+	+	+	+	+	++	+	+	+/
CMAP26	RFGRFLRKIRRFPAVTTIQSARF	++	++	-	-	-	++	+/	++	+	+	+	++	+	+	-
CMAP26 (P14→G)	RFGRFLRKIRRFPGKVTTIQSARF	-	+/	-	-	-	++	+	++	+	+	+	++	+	+	-
CMAP26 (P14→L)	RFGRFLRKIRRFRLKVTTIQSARF	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CMAP1-21	RFGRFLRKIRRFPAVTTIQ	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CMAP(1-15)	RFGRFLRKIRRFPK	-	+/	-	-	-	+/	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CMAP(1-15) (F7→L)	RLGRFLRKIRRFPK	-	-	++	+/	++	++	+/	+	+	+	+	+	+	+	-
CMAP(1-15) (F7→L)	RFGRFLRKIRRFPK	-	-	-	-	-	++	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CMAP(1-15) (F12→L)	RFGRFLRKIRRF12PK	-	+/	-	-	-	++	+/	+	+	+	+	+	+	+	-
CMAP(1-15) (3aF→L)	RLGRFLRKIRRF12PK	-	+/	-	-	-	++	+/	+	+	+	+	+	+	+	-
CMAP(1-15) (F7→W)	RFGRFLRKIRRF7PK	-	+/	-	-	-	++	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CMAP(1-15) (F7→W)	RFGRFLRKIRRF7PK	-	+/	-	-	-	++	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CMAP(1-15) (F12→W)	RFGRFLRKIRRF12PK	-	+/	-	-	-	++	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CMAP(1-15) (3aF→W)	RFGRFLRKIRRF12PK	-	+/	-	-	-	++	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CMAP(1-13)	RFGRFLRKIRRF13	-	+/	-	-	-	++	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CMAP(1-12)	RFGRFLRKIRRF12	-	-	+/	-	-	++	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CMAP(1-11)	RFGRFLRKIRRF11	+/	-	+	-	-	++	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CMAP(1-10)	RFGRFLRKIRRF10	-	-	+	-	-	++	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CMAP(2-15)	FGFRFLRKIRRF15	-	-	-	-	-	++	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CMAP(3-15)	GRFLRKIRRF15	-	-	-	-	-	++	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CMAP(4-15)	BFLRKIRRF15	+/	-	-	-	-	++	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CMAP(6-15)	FLRKIRRF15	-	-	-	-	-	++	-	+	+	+	+	+	+	+	-

Tabla 2

nombre	Secuencia	Toxicidad	Modulación inmunitaria					Péptido inducido							
			Neutralización LPS					HDI1							
			IL-1β	IL-8	MCP-3	RANTES	IL-1β	IL-8	MCP-3	RANTES	IL-1β	IL-8	MCP-3	RANTES	
CMAP26-NB2	RFGRFLRKIRRFEPKVTITIQSSARF <sup>NB2</sup>	Hemólisis (RBCs)	estimulación 4h												
CMAPI-21	RFGRFLRKIRRFEPKVTITIQ		+	.	.	.	+/.	+/.	+/.	+/.	+/.	+/.	+/.	+/.	+/.
CMAPI-15	RFGRFLRKIRRFEPK		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CMAP26-NB2	RFGRFLRKIRRFEPKVTITIQSSARF <sup>NB2</sup>		estimulación 24h												
CMAPI-21	RFGRFLRKIRRFEPKVTITIQ		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
CMAPI-15	RFGRFLRKIRRFEPK		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

Listado de secuencias

<110> Universiteit Utrecht Holding B.V.

Bikker, Floris J

van Dijk, Albert

5 Mars-Groenendijk, Rosalia

Veldhuizen, Edwin J A

van der Kleij, Desiree

Haagsman, Hendrik

<120> Nuevos péptidos antimicrobianos basados en CMAP27

10 <130> P86425EP20

<150> PCT/NL2010/050068

<151> 2010-02-13

<150> EP 09152810.9

<151> 2009-02-13

15 <160> 28

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 27

<212> PRT

20 <213> Gallus gallus

<400> 1

ES 2 710 785 T3

Arg Phe Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe Arg Pro Lys Val  
1 5 10 15

Thr Ile Thr Ile Gln Gly Ser Ala Arg Phe Gly  
20 25

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> consenso 1 derivado de CMAP27

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> (2)..(2)

<223> L , Y o W

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

15 <223> L, Y o W

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> L, Y o W

20 <400> 2

Arg Phe Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe  
1 5 10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> consenso 2 derivado de CMAP27

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

10 <223> L, Y o W

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> L, Y o W

15 <220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> L, Y o W

<400> 3

20 Arg Phe Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe Arg  
1 5 10

<210> 4

<211> 15

ES 2 710 785 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> consenso 3 derivado de CMAP27

5 <220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> L, Y o W

<220>

10 <221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> L, Y o W

<220>

<221> VARIANTE

15 <222> (12)..(12)

<223> L, Y o W

<220>

<221> VARIANTE

<222> (14)..(14)

20 <223> G o L

<400> 4

Arg Phe Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe Arg Pro Lys  
1 5 10 15

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> consenso 4 derivado de CMAP27

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

10 <223> L, Y o W

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> L, Y o W

15 <220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> L, Y o W

<220>

20 <221> VARIANTE

<222> (14)..(14)

<223> G o L

<400> 5



ES 2 710 785 T3

<223> G o L

<400> 6

Arg Phe Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe Arg Pro Lys Val  
1 5 10 15

Thr Ile Thr Ile Gln  
20

<210> 7

5 <211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CMAP amidado

10 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (26).. (26)

<223> AMIDACIÓN

<400> 7

Arg Phe Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe Arg Pro Lys Val  
1 5 10 15

15 Thr Ile Thr Ile Gln Gly Ser Ala Arg Phe  
20 25

<210> 8

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

ES 2 710 785 T3

<223> CMAP26

<400> 8

Arg Phe Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe Arg Pro Lys Val  
1 5 10 15

Thr Ile Thr Ile Gln Gly Ser Ala Arg Phe  
20 25

<210> 9

5 <211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CMAP26 P14G

10 <400> 9

Arg Phe Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe Arg Gly Lys Val  
1 5 10 15

Thr Ile Thr Ile Gln Gly Ser Ala Arg Phe  
20 25

<210> 10

<211> 26

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> CMAP26 P14L

<400> 10

ES 2 710 785 T3

Arg Phe Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe Arg Leu Lys Val  
1 5 10 15

Thr Ile Thr Ile Gln Gly Ser Ala Arg Phe  
20 25

<210> 11

<211> 21

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> CMAP 1-21

<400> 11

Arg Phe Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe Arg Pro Lys Val  
1 5 10 15

Thr Ile Thr Ile Gln  
20

10 <210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> CMAP15

<400> 12

Arg Phe Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe Arg Pro Lys  
1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

ES 2 710 785 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CMAP15 F2L

5 <400> 13

Arg Leu Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe Arg Pro Lys  
1                   5                   10                   15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> CMAP15 F5L

<400> 14

Arg Phe Gly Arg Leu Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe Arg Pro Lys  
1                   5                   10                   15

15 <210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> CMAP15 F12L

<400> 15

Arg Phe Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Leu Arg Pro Lys  
1                   5                   10                   15

ES 2 710 785 T3

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> CMAP15 3xF-L

<400> 16

Arg Leu Gly Arg Leu Leu Arg Lys Ile Arg Arg Leu Arg Pro Lys  
1                   5                   10                   15

<210> 17

10 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CMAP15 F2W

15 <400> 17

Arg Trp Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe Arg Pro Lys  
1                   5                   10                   15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> CMAP15 F5W

ES 2 710 785 T3

<400> 18

Arg Phe Gly Arg Trp Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe Arg Pro Lys  
1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CMAP15 F12W

<400> 19

10 Arg Phe Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Trp Arg Pro Lys  
1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> CMAP15 3xF-W

<400> 20

Arg Trp Gly Arg Trp Leu Arg Lys Ile Arg Arg Trp Arg Pro Lys  
1 5 10 15

<210> 21

20 <211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CMAP13

<400> 21

Arg Phe Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe Arg  
1                   5                   10

5 <210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> CMAP12

<400> 22

Arg Phe Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe  
1                   5                   10

<210> 23

<211> 11

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CMAP11

<400> 23

20 Arg Phe Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg  
1                   5                   10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CMAP10

5 <400> 24

Arg Phe Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg  
1                    5                    10

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> CMAP2-15

<400> 25

Phe Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe Arg Pro Lys  
1                    5                    10

15 <210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> CMAP3-15

<400> 26

Gly Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe Arg Pro Lys  
1                    5                    10

<210> 27

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> CMAP4-15

<400> 27

Arg Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe Arg Pro Lys  
1                   5                   10

<210> 28

10 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CMAP5-15

15 <400> 28

Phe Leu Arg Lys Ile Arg Arg Phe Arg Pro Lys  
1                   5                   10

**REIVINDICACIONES**

1. Derivados de CMAP27 que consisten en la secuencia de aminoácidos general

RX<sub>1</sub>GRX<sub>2</sub>LRKIRRX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>

5 en la que X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> pueden ser independientemente F, L, W o Y y X<sub>4</sub> pueden tener 0-9 aminoácidos y en la que además dichos derivados están amidados en terminal C.

2. Derivado de CMAP27 de acuerdo con la reivindicación 1, en el que uno de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> es F.

3. Derivado de CMAP27 de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dos o tres de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> son F.

4. Derivado de CMAP27 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que X<sub>4</sub> son 0 aminoácidos.

10 5. Derivado de CMAP27 de acuerdo cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que X<sub>4</sub> es R.

6. Derivado de CMAP27 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que X<sub>4</sub> es RX<sub>5</sub>K, RX<sub>5</sub>KVT, o RX<sub>5</sub>KVTITIQ en el que X<sub>5</sub> es P, G o L.

7. Derivado de CMAP27 de acuerdo con la reivindicación 6, en el que X<sub>5</sub> es P.

8. Derivado de CMAP27 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para uso como un medicamento.

15 9. Derivado CMAP27 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para uso como antibiótico.

10. Composición farmacéutica que comprende por lo menos un derivado CMAP27 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

11. Uso de un derivado CMAP27 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de infecciones bacterianas.

20 12. Uso de un derivado CMAP27 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en la preparación de un antibiótico.

13. Composición inmunológica, preferiblemente una composición de vacuna, que comprende un péptido CMAP27 seleccionado del grupo de derivados CMAP27 de acuerdo con la reivindicación 1.

25 14. Uso de un péptido CMAP27 seleccionado del grupo de derivados CMAP27 de acuerdo con la reivindicación 1, como adyuvante.