

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 484**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2014 PCT/NL2014/050295**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2014 WO14182172**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2014 E 14726437 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 2994154**

54 Título: **Péptido antimicrobiano**

30 Prioridad:

10.05.2013 EP 13167240

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

28.09.2020

73 Titular/es:

**ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN H.O.D.N.
LUMC (100.0%)
Albinusdreef 2
2333 ZA Leiden, NL**

72 Inventor/es:

**NIBBERING, PETRUS HENDRICUS;
HIEMSTRA, PIETER y
DRIJFHOUT, JAN WOUTER**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 784 484 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

5 La invención se refiere al campo de la bioquímica. Más específicamente, la invención se refiere al campo de los péptidos antimicrobianos y a contrarrestar infecciones.

10 Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son un componente esencial del sistema de defensa de los organismos en toda la naturaleza y ofrecen protección contra los patógenos invasores. Los AMPs no se dirigen a estructuras moleculares definidas (epítomos), sino que actúan sobre la membrana celular, destruyendo rápidamente bacterias y hongos. Por lo tanto, opuesto a los antibióticos convencionales, son efectivos independientemente de la actividad metabólica de las bacterias. Además de sus actividades microbicidas directas, los péptidos antimicrobianos son particularmente atractivos, ya que ciertos péptidos muestran múltiples actividades, tales como la regulación del sistema inmune innato y adaptativo, de la inflamación y la cicatrización, y actividades antifúngicas, antivirales, antiparasitarias y anticancerosas adicionales.

15 Los AMPs son bastante diversos en secuencia y estructura secundaria, pero comparten algunas propiedades comunes. Por lo general, son cortos (aproximadamente 15-40 aminoácidos), catiónicos, anfipáticos y ejercen su efecto microbicida principalmente al comprometer la integridad de la membrana bacteriana. La interacción de los AMPs con la superficie de la membrana aniónica de los microbios diana conduce a la permeabilización de la membrana, la lisis celular y la muerte.

20 Es aceptado generalmente que la membrana citoplasmática es el objetivo principal de la mayoría de los péptidos antimicrobianos, de manera que la acumulación del péptido en la membrana provoca un aumento de la permeabilidad y la pérdida de la función de barrera, lo que resulta en la fuga de componentes citoplásmicos y la muerte celular. Se han propuesto varios mecanismos moleculares de la permeabilización de la membrana, algunos fenomenológicos y otros más cuantitativos, para explicar la acción de los AMPs.

25 Las observaciones experimentales en sistemas modelo fueron racionalizadas principalmente por el modelo de alfombra o poro (Figura 1). En el modelo de alfombra, los AMPs se acumulan sobre la superficie de la membrana orientada de manera paralela a la membrana, lo que da como resultado un adelgazamiento local de la membrana y la desestabilización de la membrana celular que conduce a la liberación de contenido intracelular. Sin embargo, existe evidencia convincente de que muchos AMPs también funcionan de manera similar a un detergente, mediante la interrupción del empaque y la organización de los lípidos de una manera no específica (por ejemplo, agrupamiento de lípidos o segregación de grupos polares y no polares de los lípidos) o mediante la introducción de agregados lipídicos de doble capa. Además, algunos AMPs pasan por la membrana celular e interactúan con un objetivo intracelular (Figura 1), lo que conduce a la pérdida de la viabilidad bacteriana/fúngica.

35 Claramente, el (los) modo(s) de acción de los AMPs difieren de los antibióticos convencionales, que a menudo tienen dianas simples, como un epítomo único en la pared celular o en los procesos de síntesis de proteínas y ARN, lo que permite que las bacterias patógenas desarrollen resistencia más rápidamente. Una ventaja importante de los péptidos antimicrobianos sobre los antibióticos convencionales es que la resistencia microbiana contra estos AMPs no se desarrolla fácilmente, muy probablemente porque estos péptidos, por el contrario a los antibióticos convencionales, no se dirigen a estructuras moleculares definidas (epítomos), sino que actúan sobre la membrana celular, destruyendo bacterias y hongos en minutos. Por lo tanto, debido a la rápida velocidad de eliminación, que es más rápida que la velocidad de crecimiento de las bacterias y la naturaleza de la diana (una modificación sustancial de la composición lipídica podría afectar la viabilidad de las células bacterianas), el desarrollo de resistencia es menos probable. La aparición de mutantes que son resistentes a los AMPs se ha sido determinada mediante el monitoreo de la susceptibilidad bacteriana después de un subcultivo repetido en presencia de concentraciones subinhibitorias de los péptidos que muestran que la tasa de mutación fue menor que otros antibióticos clínicos probados (por ejemplo, ciprofloxacina y eritromicina). Mientras que la concentración inhibitoria mínima (MIC) de esos antibióticos aumentó en todos los subcultivos (hasta 64 veces), la presión de los péptidos no aumentó la MIC de la cepa. De este modo, contrario a los antibióticos convencionales, el desarrollo de la resistencia en presencia de AMPs es menos probable que ocurra. Además, los AMPs son de acción rápida y biodegradables, lo que alivia la preocupación actual sobre los antibióticos residuales en el medio ambiente.

55 Una amplia variedad de infecciones microbianas están asociadas con la formación de biopelículas, donde los microorganismos se agregan en una comunidad estructurada en una matriz polimérica autoproducida y se adhieren a una superficie. Una desventaja adicional de los antibióticos convencionales es que no aseguran la erradicación de las infecciones por biopelículas por las siguientes razones:

1) Insuficiente penetración de antibióticos convencionales en biopelículas:

60 La matriz en la que están incrustadas las bacterias las protege de las influencias externas, tales como las sustancias antimicrobianas. La mayoría de los antibióticos son capaces de penetrar en la biopelícula, pero su difusión en la biopelícula es lenta, por lo que se inactivan antes de que puedan obtener el efecto deseado.

2) Baja actividad metabólica de las bacterias: Las infecciones asociadas a la biopelícula (BAI) generalmente se tratan con vancomicina, a menudo en combinación con rifampicina. Aunque se sabe que la vancomicina penetra bastante bien en las biopelículas - aunque a una velocidad de transporte significativamente reducida - esta reduce pobremente la cantidad de bacterias que residen dentro de la biopelícula. El tratamiento con este antibiótico todavía tiene una tasa relativamente

alta de fracaso, lo que puede explicarse por la baja actividad metabólica de las bacterias en la biopelícula, haciendo que el antibiótico sea ineficaz.

3) Inactivación o degradación de los antibióticos: En las BAI, los antibióticos se administran principalmente por vía sistémica. Por lo tanto, son propensos a ser eliminados del torrente sanguíneo mediante el aclaramiento renal y degradados enzimáticamente en la sangre y los tejidos circundantes. Las enzimas (producidas por bacterias) pueden destruir o modificar directamente el compuesto. Estos mecanismos reducen activamente la concentración de fármacos en el entorno local. En las biopelículas, la baja penetración plantea un problema adicional. No es factible aumentar la concentración administrada sistémicamente debido a la toxicidad de las altas concentraciones de antibióticos en la sangre.

4) Las bacterias han desarrollado resistencia: Por encima del aumento general de la resistencia bacteriana a los antibióticos, debido a la disminución de las concentraciones de antibióticos en las capas más profundas, el riesgo de que las bacterias escapen de la presión antibiótica es mayor, lo que puede conducir a la supervivencia de mutantes que tienen una mayor resistencia a estos antibióticos. Incluso se ha informado que las concentraciones subóptimas de los antibióticos, incluida la vancomicina, mejoran la formación de las biopelículas. Además, la administración repetitiva de antibióticos convencionales que tienen un efecto insuficiente promueve el desarrollo de la resistencia a los antibióticos.

5) Los antibióticos convencionales causan la liberación de compuestos microbianos proinflamatorios: Se ha demostrado que en las BAI el tejido periimplantario está colonizado por bacterias. En gran medida, esto se debe a la desregulación de la respuesta inmune local. Esta es la razón por la cual en muchos casos la infección persiste, incluso después del reemplazo del implante. La implantación de un biomaterial provoca una respuesta inflamatoria conocida como "respuesta a un cuerpo extraño", caracterizada por la entrada secuencial de neutrófilos, macrófagos/monocitos y linfocitos, seguida de la fusión de macrófagos a las células gigantes multinucleadas de cuerpo extraño que recubren el biomaterial, la formación de nuevos fibroblastos y el depósito de fibrina, que conduce a la fibrosis/encapsulación del cuerpo extraño. Esta secuencia de eventos está altamente regulada por señales moleculares tales como las citocinas producidas mediante los tipos de células involucradas. En caso de infección, el sistema inmunitario del huésped se activa adicionalmente por moléculas de las bacterias designadas como "Patrones moleculares asociados a patógenos" (PAMP) reconocidos por receptores específicos en las células del huésped, como los receptores tipo Toll (TLR). Por ejemplo, el peptidoglucano bacteriano o el lipopolisacárido son reconocidos por TLR2 y TLR4, y son potentes inductores de respuestas inflamatorias. La activación del sistema inmune tanto por la respuesta a cuerpos extraños como por la infección bacteriana conduce a una reacción 'máxima' del sistema inmune del huésped, lo que conduce a tejido inflamado y afectado, que de hecho proporciona el ambiente ideal para la infección. Por lo tanto, la activación simultánea por biomaterial y por los PAMP puede tener efectos nocivos sobre la función inmune y aumentar fuertemente la susceptibilidad a la infección.

En la actualidad, se conocen más de 2000 secuencias diferentes de péptidos antimicrobianos (véase, por ejemplo, www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/search.htm), incluidas cecropinas, defensinas, magaininas y catelicidinas. Los péptidos y proteínas antimicrobianos se describen, por ejemplo, en:

El documento EP 2 221 061, que describe a P60.4Ac, un péptido antibacteriano relacionado con catelicidina 24 meros. El péptido exhibe afinidad por los lipopolisacáridos o el ácido lipoteicoico y exhibe actividad antimicrobiana.

El documento US 6,503,881, que describe que los péptidos catiónicos son un análogo de la indolicidina para usarse como péptido antimicrobiano. Los péptidos catiónicos se derivan de diferentes especies, que incluyen animales y plantas.

El documento US 5,912,230, que describe los péptidos antifúngicos y antibacterianos a base de histatina y los métodos para el tratamiento de infecciones fúngicas y bacterianas. Los péptidos se basan en porciones definidas de las secuencias de aminoácidos de las histatinas humanas que se dan naturalmente.

El documento US 5,717,064, que describe péptidos líticos metilados ricos en lisina. Los péptidos líticos son resistentes a la digestión trípica y no son naturales. Los péptidos líticos son adecuados para administración *en vivo*.

El documento US 5,646,014, que describe un péptido antimicrobiano aislado de una fracción antimicrobiana de la hemolinfa del gusano de seda. El péptido exhibe actividad antimicrobiana contra varias cepas bacterianas, tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

El documento WO 2004/016653, que describe un péptido basado en la secuencia 20-44 de azurocidina. Este péptido contiene una estructura de bucle unida por puentes disulfuro.

El documento US 6,495,516, que describe péptidos basados en la proteína bactericida de 55 kDa proteína de permeabilidad creciente/bactericida (BPI). Los péptidos ejercen efectos antimicrobianos así como también tienen capacidad neutralizadora a LPS.

El documento WO 01/81578, que describe numerosas secuencias que codifican polipéptidos relacionados con el receptor de proteínas acopladas a G, que pueden usarse para numerosas enfermedades.

Los documentos WO 2004/067563 y WO 2005/040192, que describen péptidos antimicrobianos basados en el péptido LL-37, el aminoácido 37 C-terminal de la catelicidina humana.

5 Varios AMPs, daptomicina y DPK-060, están actualmente en uso y/o desarrollo clínico, por ejemplo, polimixina B, nisina, pexiganan, omiganan, iseganan. Además, hasta la fase 2 se han desarrollado ensayos clínicos para OP-145, un péptido de 24 aminoácidos derivado del péptido antimicrobiano de catelicidina humano endógeno LL-37. OP-145 se ha desarrollado como un péptido antimicrobiano neutralizante de endotoxinas para el tratamiento tóxico de la otitis media crónica. Los AMPs conocidos actualmente todavía tienen algunos inconvenientes. Aunque la degradación proteolítica es beneficiosa para el medio ambiente (sin AMPs residuales), evita la circulación dinámica. Esto también es causado por el aclarado eficiente de los péptidos. Además, los mecanismos de trabajo exactos de los AMPs siguen siendo en gran medida desconocidos, por lo que es difícil prever sus verdaderas aplicaciones y todo su potencial. Por ejemplo, a menudo no se sabe cómo interactúan los AMPs con las células huésped para inducir sus efectos. Por lo tanto, el uso de los AMPs en indicaciones clínicas se ha limitado a aplicaciones tópicas.

15 Diversas bacterias, tales como *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes* y *S. aureus* todas secretan proteasas que degradan varios péptidos antimicrobianos, tal como la catelicidina LL-37. Por lo tanto, los péptidos antimicrobianos resistentes a la proteasa son ventajosos desde el punto de vista terapéutico. Adicionalmente, muchos de los péptidos antimicrobianos no son muy eficientes para desafiar a microorganismos como las bacterias, por ejemplo, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, con frecuencia juegan papeles claves en las patogénesis problemáticas, y necesitan ser optimizados para mostrar un mayor efecto. Además, debido a las potenciales propiedades líticas, así como también a otras propiedades de los AMPs contra las membranas bacterianas así como también de los mamíferos, uno de los desafíos en el diseño de nuevos péptidos se basa en el desarrollo de los AMPs con alta especificidad contra microorganismos tales como las células bacterianas o fúngicas en comparación con las membranas celulares del paciente infectado, es decir, un alto índice terapéutico (concentración hemolítica mínima/actividad antimicrobiana mínima; MHC/MEC).

Por lo tanto, a pesar de que hay un número relativamente grande de péptidos antimicrobianos disponibles en la actualidad, aún existe una creciente necesidad de nuevos péptidos antimicrobianos mejorados, que puedan usarse para contrarrestar los microbios, en particular aquellos que son resistentes o tolerantes contra los agentes antibióticos y/u otros agentes antimicrobianos. Más importante aún, existe la necesidad de nuevos péptidos antimicrobianos, que no sean alergénicos cuando se introducen en mamíferos tal como los seres humanos y que tengan una alta especificidad contra los microorganismos patógenos.

35 Es un objeto de la presente invención proporcionar un nuevo péptido antimicrobiano potente que supere las deficiencias de los antibióticos convencionales y que tenga propiedades mejoradas sobre los péptidos antimicrobianos conocidos. Un objeto adicional es proporcionar un péptido novedoso que ejerza una alta actividad contra microorganismos patógenos en infecciones de biopelículas.

40 Los presentes inventores encontraron que el polipéptido P10, que tiene la secuencia LAREYKKIVEKLRWLRQVLRTLR, es altamente efectivo in vitro contra bacterias Gram-positivo (fármaco resistentes) (por ejemplo *Staphylococcus aureus*) y Gram negativo (por ejemplo *Pseudomonas aeruginosa*) así como también contra hongos, por ejemplo *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. Como se muestra en las Figuras 2A y 2B, el P10 es considerablemente más efectivo que cualquier otro péptido probado. Además, el P10 es capaz de prevenir la formación de biopelículas de *S. aureus* resistente a la meticilina en superficies plásticas así como también bióticas (modelo de piel humana herida en 3-D). Además, el P10 neutraliza el ácido endotoxínico lipoteicoico (LTA), al peptidoglucano (PG) y los lipopolisacáridos (LPS), reduciendo así la respuesta proinflamatoria. El P10 adopta una hélice α que da como resultado una estructura anfipática en la que los aminoácidos polares se encuentran en un lado de la hélice y los aminoácidos lipofílicos en el lado opuesto. Los péptidos en los que se introdujeron sustituciones de prolina para romper la hélice estaban inactivos, lo que indica que la naturaleza anfipática del polipéptido es importante para sus actividades biológicas. Se descubrió que el P10 es aún considerablemente más potente que el OP-145 (P60.4Ac) para el que se han desarrollado ensayos clínicos, como se desprende de las figuras 2-5. Como se muestra en la Figura 2B y se detalla en los Ejemplos, el P10 tiene un CI 99,9 (0,59 μ M) que es incluso más bajo que el CI 90 de P60.4Ac (0,75 μ M). Por lo tanto, a una concentración de 0,59 μ M, el P10 mata a 999 de 1000 bacterias, mientras que el P60.4Ac mata solo 900 de 1000 bacterias a una concentración similar, incluso ligeramente más alta. Por lo tanto, sobreviven 100 veces más bacterias después del tratamiento con P60.4Ac en comparación con el tratamiento con P10 a una concentración similar. Además, el P10 tiene un amplio espectro de actividad.

60 El efecto único de los péptidos antimicrobianos de la invención sobre las infecciones de biopelículas es triple: 1) se evitará la formación de biopelículas y se dispersará las biopelículas existentes, 2) se matarán las bacterias, los hongos u otros microbios en y alrededor del sitio de liberación, y 3) se orquestará las respuestas inmunes mediante la neutralización de las endotoxinas microbianas proinflamatorias como el ácido lipoteicoico (LTA), el peptidoglucano (PG) y los lipopolisacáridos (LPS) y la activación de los macrófagos para mejorar su actividad fagocítica y microbicida. Este control inmune es necesario para evitar que el tejido que rodea los implantes se convierta en un nicho nuevo para los patógenos. Los polipéptidos de la invención son activos contra una amplia gama de microorganismos, incluidos los que son resistentes a los antibióticos convencionales.

Se descubrió además que i) variantes de P10 en las que uno o todos los aminoácidos han sido reemplazados por su D-aminoácido (tabla 2), ii) variantes de P-10 en las que el péptido se ha alargado N-terminalmente de C-terminalmente con diferentes grupos que incluyen acetilo, amida, NH- (CH₂-CH₂-O)₁₁-CO, hexanoilo, decanoilo, miristoilo, propionilo, uno o dos grupos aminohexanoilo, iii) variantes de P-10 en las que un aminoácido ha sido reemplazado por un otro L-aminoácido, y iv) variantes de P-10 más cortas que tienen actividad antimicrobiana que es comparable a la de P10, como se demuestra en los Ejemplos (ver tablas 2, 3, 5 y 6).

Por lo tanto, un polipéptido de acuerdo con la presente invención tiene una alta actividad antimicrobiana contra microorganismos, ya sea que residan en biopelículas o no, con una actividad antiinflamatoria óptima (neutralización de compuestos microbianos) como lo demuestra la actividad neutralizante de endotoxina, alta selectividad, es decir, una alta actividad antimicrobiana, una baja citotoxicidad aceptable y actividad inmunoestimulante.

En consecuencia, la presente invención proporciona un polipéptido aislado o recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLKRWLRQVLRTLR, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos, dicho polipéptido tiene actividad antibacteriana,

dicha variante tiene al menos 16 aminoácidos y:

- tiene hasta 5 de las siguientes sustituciones de aminoácidos:
 - sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de L, I, V o A por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo;
 - sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de R, K o H por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo;
 - sustitución de E por Q
 - sustitución de Y o W por F
 - sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de Q, N, A, S o T por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo
- que tiene una o más sustituciones de un aminoácido por su correspondiente D-aminoácido,
- que tiene hasta 5 sustituciones de un aminoácido por el correspondiente aminoácido no natural, y/o
- que tiene una secuencia retro-inversa de al menos 16 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia de aminoácidos.

En las secuencias de aminoácidos o variantes de las mismas como se define en la presente descripción, los aminoácidos se denotan con símbolos de una letra. Estos símbolos de una letra y símbolos de tres letras son bien conocidos por el experto en la técnica y tienen el siguiente significado: 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 triptófano, Y (Tyr) es tirosina.

Un polipéptido de la invención tiene actividad antibacteriana. El término "actividad antimicrobiana" de un polipéptido como se usa en la presente 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 la inhibición, reducción o prevención del crecimiento o la proliferación, así como también la eliminación del microbio. Un microbio es un organismo que es microscópico, es decir, generalmente demasiado pequeño para ser visto a simple vista. Los microbios son muy diversos, incluyen bacterias, virus, hongos, arqueas, protozoos y algas microscópicas. De manera similar, el término "actividad antibacteriana", "actividad antiviral", "actividad antifúngica" y "actividad antiparasitaria" como se usa en la presente se refiere a contrarrestar el crecimiento o la proliferación de, respectivamente, una bacteria, un virus, un hongo y un parásito, en general e incluye inhibición, reducción o prevención del crecimiento o proliferación, así como también la eliminación de los mismos. La actividad antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, antifúngica y antiparasitaria se puede medir mediante métodos conocidos en la técnica.

Uno de estos métodos se detalla en los Ejemplos de esta solicitud e implica un ensayo de eliminación *in vitro*. 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 de la mezcla de microbio-polipéptido se incubaba en o sobre un medio de cultivo adecuado para establecer el número de sobrevivientes y/o microbios destruidos en comparación con una muestra de microbios que no se han incubado con un polipéptido que ha sido además procesado de la misma manera.

Los ensayos de placa viral pueden usarse para evaluar la actividad antiviral de un polipéptido de la invención. En resumen, un inóculo del virus se expone al polipéptido antes de la infección de una monocapa celular permisiva. Después de un intervalo patrón, el título viral en los extractos celulares se determina mediante el uso de diluciones múltiples de estos

extractos por la infección de las monocapas de células frescas y la cuantificación de sus efectos sobre la monocapa celular.

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

10 El término "actividad antiinflamatoria" de un polipéptido como se usa en la presente se refiere a inhibir, reducir o prevenir una respuesta inflamatoria en un sujeto que ha sido infectado por microbios, por ejemplo, bacterias, virus, hongos y/o parásitos. La actividad antiinflamatoria de los polipéptidos se logra al inhibir, reducir o prevenir la liberación de compuestos microbianos proinflamatorios, tal como el ácido lipoteicoico (LTA), el peptidoglicano (PG) y/o los lipopolisacáridos (LPS). La actividad antiinflamatoria se puede medir por métodos conocidos en la técnica. Un ejemplo de dicho método es un
15 ensayo de neutralización de lipopolisacáridos. En este método, un polipéptido de la invención se mezcla con 1 mg de lipopolisacáridos y se incuba durante 60 minutos. Posteriormente, estas mezclas se agregaron a sangre humana fresca diluida 4 veces y 18 horas después se midió el nivel de citocinas (1L-8, 1L-12p40) en la muestra de sangre mediante ELISA.

20 Una variante de la secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLKRWLRQVLRTLR como se usa en la presente tiene una longitud de al menos 16 aminoácidos y preferentemente tiene hasta 5 de las siguientes sustituciones de aminoácidos:

- sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de L, I, V o A por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo;
- 25 – sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de R, K o H por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo;
- sustitución de E por Q
- 30 – sustitución de Y o W por F
- sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de Q, N, A, S o T por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo
- 35 – sustitución de uno o más aminoácidos por el correspondiente D-aminoácido
- sustitución de uno o más aminoácidos por el correspondiente aminoácido no natural. Dicha variante puede tener 1, 2, 3, 4 o 5 de dichas sustituciones de un L-aminoácido por otro L-aminoácido y/o de un L-aminoácido por su correspondiente D-aminoácido. Alternativamente, todos de al menos 16 L-aminoácidos de dicha variante están sustituidos
40 por su correspondiente D-aminoácido.

Preferentemente, dicha variante tiene hasta 5 de las siguientes sustituciones de aminoácidos:

- 45 – sustitución de L en la posición 1 del aminoácido por I, V o A
- sustitución de A en la posición 2 del aminoácido por L, V, Q o I
- sustitución de R en la posición 3 del aminoácido por K o H
- 50 – sustitución de E en la posición 4 del aminoácido por Q
- sustitución de Y en la posición 5 del aminoácido por F o W
- sustitución de K en la posición 6 del aminoácido por R o H
- 55 – sustitución de K en la posición 7 del aminoácido por R o H
- sustitución de I en la posición 8 del aminoácido por L, V o A
- 60 – sustitución de V en la posición 9 del aminoácido por L, I o A
- sustitución de E en la posición 10 del aminoácido por Q

- sustitución de K en la posición 11 del aminoácido por R o H
- sustitución de L en la posición 12 del aminoácido por I, V o A
- 5 – sustitución de K en la posición 13 del aminoácido por R o H
- sustitución de R en la posición 14 del aminoácido por K o H
- sustitución de W en la posición 15 del aminoácido por F o Y
- 10 – sustitución de R en la posición 17 del aminoácido por H o K
- sustitución de Q en la posición 18 del aminoácido por N, A, S o T
- 15 – sustitución de V en la posición 19 del aminoácido por L, I o A
- sustitución de L en la posición 20 del aminoácido por I, V o A
- sustitución de R en la posición 21 del aminoácido por K o H
- 20 – sustitución de T en la posición 22 del aminoácido por Q, N o A
- sustitución de R en la posición 24 del aminoácido por H o K
- 25 – sustitución de 1 a 5 aminoácidos por el correspondiente D-aminoácido. En la presente descripción, la numeración de aminoácidos es la siguiente:

L₁A₂R₃E₄Y₅K₆K₇I₈V₉E₁₀K₁₁L₁₂K₁₃R₁₄W₁₅L₁₆R₁₇Q₁₈V₁₉L₂₀R₂₁T₂₂L₂₃R₂₄.

- 30 Preferentemente, una variante como se define en la presente descripción tiene hasta 4 de dichas sustituciones de aminoácidos, con mayor preferencia hasta 3 de dichas sustituciones de aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 4 o 5 de dichas sustituciones. Además, una variante como se define en la presente descripción comprende preferentemente al menos una secuencia de aminoácidos YKKIVEKLRWLRQVL que tiene hasta 5, con mayor preferencia hasta 4, con la máxima preferencia hasta 3 de dichas sustituciones de aminoácidos.

35 Las sustituciones de hasta 5 aminoácidos en dicha variante de un L aminoácido por otro L aminoácido son preferentemente las siguientes:

- sustitución de L en la posición 1 del aminoácido por I, V o A
- 40 – sustitución de A en la posición 2 del aminoácido por L, V o Q
- sustitución de R en la posición 3 del aminoácido por K o H
- 45 – sustitución de E en la posición 4 del aminoácido por Q
- sustitución de Y en la posición 5 del aminoácido por F
- sustitución de K en la posición 6 del aminoácido por R o H
- 50 – sustitución de K en la posición 7 del aminoácido por R o H
- sustitución de K en la posición 11 del aminoácido por R o H
- 55 – sustitución de L en la posición 12 del aminoácido por I, V o A
- sustitución de K en la posición 13 del aminoácido por H
- sustitución de R en la posición 14 del aminoácido por K o H
- 60 – sustitución de W en la posición 15 del aminoácido por F
- sustitución de R en la posición 17 del aminoácido por H

ES 2 784 484 T3

- sustitución de Q en la posición 18 del aminoácido por N, A, S o T
- sustitución de V en la posición 19 del aminoácido por L
- 5 - sustitución de L en la posición 20 del aminoácido por I, V o A
- sustitución de R en la posición 21 del aminoácido por K o H
- 10 - sustitución de T en la posición 22 del aminoácido por Q, N o A
- sustitución de R en la posición 24 del aminoácido por H.

En otra modalidad preferida de la invención, un polipéptido de acuerdo con la invención comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

15 LAREYKKIVEKLRWLRQVLR'TLR
IAREYKKIVEKLRWLRQVLR'TLR
20 VAREYKKIVEKLRWLRQVLR'TLR
AAREYKKIVEKLRWLRQVLR'TLR
LLREYKKIVEKLRWLRQVLR'TLR
25 LVREYKKIVEKLRWLRQVLR'TLR
LQREYKKIVEKLRWLRQVLR'TLR
LAKEYKKIVEKLRWLRQVLR'TLR
30 LAHEYKKIVEKLRWLRQVLR'TLR
LARQYKKIVEKLRWLRQVLR'TLR
LAREFKKIVEKLRWLRQVLR'TLR
35 LAREYRKIVEKLRWLRQVLR'TLR
LAREYHKIVEKLRWLRQVLR'TLR
LAREYKRIVEKLRWLRQVLR'TLR
40 LAREYKKIVEKLRWLRQVLR'TLR
LAREYKKIVEKLRFLRQVLR'TLR
LAREYKKIVEKLRWLHQVLR'TLR
45 LAREYKKIVEKLRWLRNVLR'TLR
LAREYKKIVEKLRWLRVLR'TLR
LAREYKKIVEKLRWLRSVLR'TLR
50 LAREYKKIVEKLRWLR'VLR'TLR
LAREYKKIVEKLRWLRQLLR'TLR
LAREYKKIVEKLRWLRQVIR'TLR
55 LAREYKKIVEKLRWLRQVVR'TLR
LAREYKKIVEKLRWLRQVARTLR
LAREYKKIVEKLRWLRQVLR'KTLR
60 LAREYKKIVEKLRWLRQVLR'HTLR
LAREYKKIVEKLRWLRQVLR'QLR
LAREYKKIVEKLRWLRQVLR'NLR
65 LAREYKKIVEKLRWLRQVLR'RALR

opcionalmente que tiene una modificación N-terminal y/o C-terminal, que comprende preferentemente un grupo de elongación N- y/o C-terminal, dicha modificación N-terminal preferentemente seleccionada del grupo que consiste en un residuo acetilo-, hexanoilo-, decanoilo-, miristoilo-, NH- (CH₂-CH₂-O)₁₁-CO- y propionilo y dicha modificación C-terminal preferentemente seleccionada del grupo que consiste en amida-, NH- (CH₂-CH₂-O)₁₁-CO-amida- y uno o dos grupos amino-hexanoilo. En una modalidad, un polipéptido de acuerdo con la invención consiste en una de las dichas secuencias de aminoácidos.

Alternativamente, o además de la sustitución de hasta 5 de un aminoácido por otro aminoácido como se describió anteriormente, una variante de la secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLR como se define en la presente descripción puede contener una o más sustituciones de un L-aminoácido por su correspondiente D-aminoácido. Los aminoácidos indicados en la presente descripción por un símbolo de una letra mayúscula, como A para alanina, son aquellos L-aminoácidos que se encuentran comúnmente en las proteínas de origen natural. Como se demuestra en los Ejemplos (Tabla 2), los polipéptidos en donde un L-aminoácido está sustituido por su correspondiente D-aminoácido retienen su actividad antimicrobiana. Por lo tanto, una variante de la secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLR como se define en la presente descripción puede contener una o más sustituciones de un aminoácido por el correspondiente D-aminoácido. "correspondiente D-aminoácido" como se usa en la presente descripción se define como la contraparte del D-aminoácido de un L-aminoácido. Por ejemplo, el correspondiente D-aminoácido de la alanina (A) es la D-alanina (a), el correspondiente D-aminoácido de la arginina (R) es la D-arginina (r), el correspondiente D-aminoácido de la asparagina (N) es la D-asparagina (n), etc. Todos los L-aminoácidos de una variante como se define en la presente descripción pueden ser sustituidos por sus correspondientes D-aminoácidos. Una variante de la secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLR como se define en la presente descripción puede contener hasta 24 sustituciones de un L-aminoácido por su correspondiente D-aminoácido. Por lo tanto, la variante puede consistir completamente en D-aminoácidos porque la actividad antimicrobiana se retiene en los polipéptidos que comprenden tal variante de aminoácidos. Por ejemplo, la variante 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 correspondiente D-aminoácido. En una modalidad, una variante de la secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLR como se define en la presente descripción contiene una sustitución de un aminoácido por su correspondiente D-aminoácido. La posición del D-aminoácido en la secuencia de aminoácidos es irrelevante. Como se demuestra en la Tabla 2, en todos los polipéptidos que tienen la secuencia LAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLR en donde un aminoácido se sustituye por un D-aminoácido se retiene actividad antimicrobiana. En otra modalidad, la variante contiene la sustitución de todos los L-aminoácidos por sus correspondientes D-aminoácidos. Como también se demostró en los Ejemplos (tabla 2), un polipéptido que comprende la secuencia lareykkiveklkrwlrqvlrtrlr (péptido # 1313-07), que es una variante que contiene solo D-aminoácidos, posee actividad antimicrobiana. Una variante como se define en la presente descripción puede contener además el péptido retro-inverso de al menos 16 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLR. Preferentemente, dicha variante es un péptido retro-inverso de la longitud completa de dicha secuencia de aminoácidos. Un péptido retro-inverso es un péptido que consiste de D-aminoácidos en la secuencia inversa de una secuencia de aminoácidos de referencia. Por lo tanto, una variante preferente de la invención puede tener al menos 16 aminoácidos de la secuencia de D-aminoácidos rlrtrvlrqlwrklkevikkyyeral. Como se demuestra en la tabla 2, un polipéptido que comprende la secuencia lareykkiveklkrwlrqvlrtrlr (péptido # 1241-03), que es una variante que contiene la secuencia retro-inversa de la secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLR, posee actividad antibacteriana.

Una variante de la secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLR como se define en la presente descripción puede comprender hasta 5 sustituciones de un aminoácido por su correspondiente aminoácido no natural. "Aminoácidos no naturales", como se usa en la presente descripción, se refiere a aminoácidos no codificados genéticamente, independientemente de si aparecen o no en la naturaleza. Los aminoácidos no naturales que pueden estar presentes en una variante de una secuencia de aminoácidos como se define 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 -diaminobutírico; Ácido 6-aminocaproico; Ácido 2-aminoheptanoico; Ácido 2-aminoisobutírico; Ácido 3-aminoisobutírico; 2- ácido 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-benzotienilalanina; 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; alohidroxilisina; 3- (3-metil-4-nitrobenzil)-L-histidina metil éster; isodesmosina; alo-isoleucina; isopropil-L-fenilalanina; 3-metil-fenilalanina; N-metilglicina; N-metilisoleucina; 6-N-metil-lisina; 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-carbamoilclornitina; penicilamina; fenilglicina; ácido piperidínico; piridilalanina; Ácido 1, 2, 3, 4-tetrahidro-isoquinolina-3-carboxilix; beta-2-tienilalanina; ácido γ-carboxi-DL-glutámico; Ácido 4-fluoro-DL-glutámico; D-tiroxina; alo-treonina; 5-hidroxi-triptófano; 5-metoxi-triptófano; 5-fluoro-triptófano; 3-fluoro-valina.

En una modalidad, un aminoácido natural de dicha secuencia está sustituido por su correspondiente aminoácido no natural. Como se usa en la presente descripción, un "correspondiente aminoácido no natural" 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 correspondiente β-aminoácido. Los β-aminoácidos tienen sus grupo amino unido al carbono β en lugar del carbono α como en los aminoácidos naturales. Por ejemplo, la α-alanina se sustituye por β-alanina, etc. 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 se sustituye, por ejemplo, por beta-alanina, t-butilalanina, 2-naftilalanina; L-3- (2-naftil) alanina, ácido 2-aminoisobutírico. La arginina se sustituye, por ejemplo, por homoarginina, ornitina, N5-carbamoylornitina, ácido 3-amino-propiónico. La asparagina se sustituye, por ejemplo, por N-etilasparagina. El ácido aspártico se sustituye, por ejemplo, por 4-terc-butil hidrógeno 2-azidosuccinato. La cisteína se sustituye, por ejemplo, por ácido cisteico, homocisteína. El ácido glutámico se sustituye, por ejemplo, por ácido γ -carboxi-DL-glutámico; Ácido 4-fluoro-DL-glutámico. La glutamina se sustituye, por ejemplo, por D-citrulina, tio-L-citrulina. La glicina se sustituye, por ejemplo, por N-metilglicina, t-butilglicina, N-metilglicina, D-alilglicina. La histidina se sustituye, por ejemplo, por éster metílico de 3- (3-metil-4-nitrobencil)-L-histidina. La isoleucina se sustituye, por ejemplo, por isodesmosina, N-metilisoleucina, alo-isoleucina. La leucina se sustituye, por ejemplo, por norleucina, desmosina, 5,5,5-trifluoro-leucina. La lisina se sustituye, por ejemplo, por 6-N-metil-lisina, ácido 2-aminoheptanoico, N-acetil lisina, hidroxilisina, alohidroxilisina. La metionina se sustituye, por ejemplo, por metionina sulfóxido. La fenilalanina se sustituye, por ejemplo, por p-amino-L-fenilalanina, 3-benzotienil alanina, p-bromofenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, 2-fluorofenilalanina, 3-fluorofenilalanina, 4-fluorofenilalanina. La prolina se sustituye, por ejemplo, por 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, 1-acetil-4-hidroxi-L-prolina. La serina se sustituye, por ejemplo, por homoserina, isoserina, 3-fenilserina. La treonina se sustituye, por ejemplo, por D-tiroxina, alo-treonina. El triptófano está, por ejemplo, sustituido por 5-hidroxi-triptófano, 5-metoxi-triptófano, 5-fluoro-triptófano. La tirosina se sustituye, por ejemplo, por O-metil-L-tirosina, O-4-alil-L-tirosina, 3-cloro-tirosina. La valina se sustituye, por ejemplo, por norvalina, N-metilvalina, 3-fluoro-valina.
- 20 Un polipéptido particularmente preferido de acuerdo con la invención comprende la secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLR o una variante del mismo que tiene una concentración letal (LC) 99,9 en PBS de a lo máximo 3,2 μ M seleccionados de las tablas 2, 3, 5 o 6. En una modalidad, se proporciona un polipéptido que tiene un LC 99,9 en PBS de a lo máximo 2,4 μ M seleccionado de las tablas 2, 3, 5 o 6.
- 25 Un polipéptido de acuerdo con la invención puede consistir en la secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLR o una variante de esta secuencia como se define en la presente descripción. Como se usa en la presente, 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 antibacteriana tiene una longitud de 16 aminoácidos.
- 30 Sin embargo, la secuencia de aminoácidos o una variante de la misma puede ser parte de un polipéptido más grande, es decir, de un polipéptido que ha sido N terminal y/o C terminal extendido por uno o más aminoácidos adicionales. La variante o secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la invención puede modificarse N-terminalmente y/o C-terminalmente, preferentemente al componer un grupo elongación N- y/o C-terminal. Alternativamente, dicha secuencia de aminoácidos o una variante de la misma se extiende N y/o C-terminalmente. Por lo tanto, un polipéptido de acuerdo con la invención comprende al menos 16 aminoácidos y puede comprender hasta 200 aminoácidos. Sin embargo, son preferentes los polipéptidos más pequeños para mantener los costos de producción lo más bajos posible. Preferentemente, un polipéptido de acuerdo con la invención es de una longitud de 16-200 aminoácidos, con mayor preferencia de 16-100 aminoácidos, con mayor preferencia de 16-50 aminoácidos. En una modalidad, un polipéptido de acuerdo con la invención comprende de 16 a 24 aminoácidos, es decir, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 aminoácidos.
- 40 Dicho polipéptido tiene preferentemente 16-24 aminoácidos. Tal polipéptido que tiene 16-24 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, $\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{11}-\text{CO}-$ y propionilo y/o tal como una modificación C-terminal seleccionada del grupo que consiste en amida-, $\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{11}-\text{CO}-$ amida- y uno o dos grupos amino-hexanoilo. Ejemplos de polipéptidos con diferentes longitudes y su actividad antimicrobiana se proporcionan en los Ejemplos. En una modalidad, un polipéptido de la invención consiste en la secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLR o una variante de la misma como se define en la presente descripción, opcionalmente que tiene una modificación N-terminal y/o C-terminal, que comprende preferentemente un grupo de elongación N- y/o C-terminal.
- 50 Como se usa en la presente, "peptidomimético" se refiere a un compuesto que contiene elementos estructurales no peptídicos cuyo compuesto imita las propiedades antimicrobianas, antibacterianas, antivirales, antifúngicas, antiparasitarias y/o antiinflamatorias de un polipéptido. Por lo tanto, un polipéptido de la invención puede comprender elementos estructurales no peptídicos. Dichos elementos estructurales no peptídicos pueden estar presentes en la secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLR, o en una variante de la misma como se define en la presente descripción, como resultado de la sustitución de la modificación de uno o más aminoácidos de dicha secuencia o variante. Alternativamente, un polipéptido de la invención puede comprender elementos estructurales no peptídicos fuera de la secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLR, o en una variante de la misma como se define en la presente descripción, es decir, en los grupos de elongación opcionales N- y/o C-terminales. Un elemento estructural no peptídico en un peptidomimético es típicamente una modificación de uno o más aminoácidos existentes. Los peptidomiméticos preferentes se obtienen mediante modificación estructural de los polipéptidos de la invención, por ejemplo, mediante el uso de aminoácidos no naturales como los definidos anteriormente en la presente descripción, restricciones conformacionales, ciclación del polipéptido, reemplazo isostérico u otras modificaciones. La secuencia de aminoácidos de un polipéptido de acuerdo con la invención, por lo tanto, opcionalmente comprende una o más modificaciones. Tales anticuerpos pueden modificarse mediante procesos naturales, tales como el procesamiento postraduccional, o mediante técnicas química de modificación. Las modificaciones pueden insertarse en cualquier ubicación en dicho polipéptido, incluyendo la cadena principal del polipéptido, las cadenas laterales de aminoácidos y en

5 el extremo N- o C-terminal. Un polipéptido único puede contener múltiples tipos de modificaciones o varias modificaciones de un solo tipo. Las modificaciones incluyen acetilación, amidación, acilación, fosforilación, metilación, desmetilación, ribosilación de ADP, formación de enlaces disulfuro, ubiquitinación, gamma-carboxilación, glicosilación, hidroxilación, yodación, oxidación, pegilación y sulfatación. Además, un polipéptido de acuerdo con la invención se puede proporcionar con un marcador, tal como biotina, fluoresceína o flavina, un lípido o derivado lipídico, un grupo azúcar. Un polipéptido de acuerdo con la invención se puede proporcionar adicionalmente con un resto de direccionamiento.

10 En una modalidad preferida, un polipéptido de acuerdo con la invención en donde dicha secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLR o dicha variante del mismo como se define en la presente descripción está modificada N-terminalmente y/o C-terminalmente. Por lo tanto, un polipéptido de la invención comprende preferentemente un grupo de elongación N- y/o C-terminal. Los grupos de elongación N- y C-terminales que pueden usarse en un polipéptido de la invención se conocen bien en la técnica. Los ejemplos preferentes de una modificación N-terminal son residuos de un acetilo, un hexanoilo, un decanoilo, un miristoilo, un NH- (CH₂-CH₂-O)₁₁-CO- y de un propionilo. Los ejemplos preferentes de una modificación C-terminal son una amida, un NH- (CH₂-CH₂-O)₁₁-CO-amida-, y uno o dos grupos amino-hexanoilo. Sin embargo, otros grupos de elongación N- o C-terminales también producirán compuestos activos que es conocido por un experto en la técnica. En una modalidad, dicha secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLR o dicha variante de la misma tal como se define en la presente descripción comprende un residuo N-terminal acetilo-, hexanoylo-, decanoylo-, myristoylo-, NH- (CH₂-CH₂-O)₁₁-CO- o propionilo y una amida C-terminal-, NH- (CH₂-CH₂-O)₁₁-CO-amida-, y uno o dos grupos amino-hexanoilo. Como se demuestra en los Ejemplos (Tabla 3), los polipéptidos que tienen tales modificaciones N-terminales o C-terminales retienen la alta actividad antimicrobiana. 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.

25 La invención proporciona así un polipéptido aislado o recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLR, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos, dicho polipéptido tiene actividad antibacteriana, dicha variante tiene al menos 16 aminoácidos y tiene hasta 5, preferentemente hasta 3, con mayor preferencia hasta 1 de las siguientes sustituciones de aminoácidos:

- 30 – sustitución de L en la posición 1 del aminoácido por I, V o A
- sustitución de A en la posición 2 del aminoácido por L, V, Q o I
- sustitución de R en la posición 3 del aminoácido por K o H
- 35 – sustitución de E en la posición 4 del aminoácido por Q
- sustitución de Y en la posición 5 del aminoácido por F o W
- sustitución de K en la posición 6 del aminoácido por R o H
- 40 – sustitución de K en la posición 7 del aminoácido por R o H
- sustitución de I en la posición 8 del aminoácido por L, V o A
- 45 – sustitución de V en la posición 9 del aminoácido por L, I o A
- sustitución de E en la posición 10 del aminoácido por Q
- sustitución de K en la posición 11 del aminoácido por R o H
- 50 – sustitución de L en la posición 12 del aminoácido por I, V o A
- sustitución de K en la posición 13 del aminoácido por R o H
- 55 – sustitución de R en la posición 14 del aminoácido por K o H
- sustitución de W en la posición 15 del aminoácido por F o Y
- sustitución de R en la posición 17 del aminoácido por H o K
- 60 – sustitución de Q en la posición 18 del aminoácido por N, A, S o T
- sustitución de V en la posición 19 del aminoácido por L, I o A

- sustitución de L en la posición 20 del aminoácido por I, V o A
 - sustitución de R en la posición 21 del aminoácido por K o H
- 5 – sustitución de T en la posición 22 del aminoácido por Q, N o A
- sustitución de R en la posición 24 del aminoácido por H o K
 - sustitución de 1 a 4 aminoácidos por su correspondiente D-aminoácido,
- 10 en donde dicha secuencia de aminoácidos o dicha variante de la misma comprende un grupo de elongación 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 una amida C-terminal-, NH- (CH₂-CH₂-O)₁₁-CO-amida-, y uno o dos grupos amino-hexanoilo. Para una persona experta en la técnica, estará claro que otros grupos de elongación N- o C-terminales también producirán compuestos activos. En la presente descripción, la numeración de aminoácidos es la siguiente:
- 15 L₁A₂R₃E₄Y₅K₆I₈V₉E₁₀K₁₁L₁₂K₁₃R₁₄W₁₅L₁₆R₁₇Q₁₈V₁₉L₂₀R₂₁T₂₂L₂₃R₂₄. Dicho polipéptido tiene preferentemente 16-24 aminoácidos.
- 20 En una modalidad preferida, un polipéptido de acuerdo con la invención comprende un resto hidrófobo. La adición de grupos hidrófobos a los (poli) péptidos catiónicos mejora su capacidad para neutralizar la endotoxina microbiana e interactuar con las membranas microbianas y, por lo tanto, mejora su capacidad para eliminar los microbios, por ejemplo, los patógenos.
- 25 Como se describió en la presente descripción anteriormente, un polipéptido de acuerdo con la invención puede modificarse mediante 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 reaccionado la secuencia de aminoácidos, que todavía está unida a la resina, con ácido acético. Como otro ejemplo, la amidación C-terminal, por ejemplo, se realiza mediante el uso de un tipo especial de resina en síntesis de péptidos en fase sólida, como el Tentagel S AM disponible comercialmente (ex Rapp, Tübingen, Alemania). Estas resinas comprenden un mango químico del que se liberan (poli) péptidos amidados durante la escisión. Estos y otros métodos de modificación de polipéptidos son conocidos por cualquier persona experta en la técnica.
- 30 En una modalidad, la invención proporciona un polipéptido aislado o recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLKRWLRQVLRRTLRL, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos, dicho polipéptido tiene actividad antibacteriana,
- 35 dicha variante tiene al menos 16 aminoácidos y:
- 40 – tiene hasta 5 de las siguientes sustituciones de aminoácidos:
- sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de L, I, V o A por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo;
 - sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de R, K o H por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo;
 - sustitución de E por Q
 - sustitución de Y o W por F
 - sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de Q, N, A, S o T por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo, y/o
- 45 – que tiene una o más sustituciones de un aminoácido por su correspondiente D-aminoácido.
- 50 La invención proporciona además un multímero que comprende hasta seis polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLKRWLRQVLRRTLRL o una variante de la misma como se define en la presente descripción. 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 una secuencia de aminoácidos diferente. 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 aminoácidos.
- 55 También se proporcionan sales de polipéptidos de acuerdo con la invención. Tales sales incluyen, pero no se limitan a, sales de adición ácida y sales de adición básica. Como se usa en la presente, "sal farmacéuticamente aceptable" de un polipéptido se refiere a una sal que retiene la actividad antibacteriana deseada del polipéptido, y es adecuada para la administración a seres humanos o animales. Los métodos para la preparación de sales de polipéptidos son conocidos en la técnica y generalmente implican mezclar el polipéptido con un ácido o base farmacéuticamente aceptable, por ejemplo
- 60

reaccionando el ácido libre o las formas de base libre del producto con uno o más equivalentes del ácido o base apropiado en un solvente o medio en el cual la sal es insoluble, o en un solvente como el agua que luego se elimina *aisladamente* o por liofilización, o por intercambiando los cationes de una sal existente por otro catión en una resina de intercambio iónico adecuada. 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 grupos amino libres de los polipéptidos, y bases que forman sales de carboxilato con grupos carboxílicos libres de polipéptidos, tales como la etilamina, metilamina, dimetilamina, trietilamina, isopropilamina, diisopropilamina y otras mono, di y trialquilaminas y arilaminas.

Los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden prepararse por diversos métodos. Por ejemplo, un polipéptido puede sintetizarse mediante métodos de síntesis en fase sólida comúnmente usados, por ejemplo, métodos que se conocen bien en la técnica implican la protección t-BOC o FMOC de grupos alfa-amino. Aquí, los aminoácidos se adionan secuencialmente a una cadena creciente de aminoácidos. 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, Londres, (1989). Los métodos de síntesis en fase sólida son particularmente adecuados para la síntesis de polipéptidos o de longitud relativamente corta, como los polipéptidos con una longitud de hasta aproximadamente 70 aminoácidos en la 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 que una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido se expresa en las células huésped. La invención proporciona así un método para la preparación de un polipéptido de acuerdo con la invención que comprende:

- se proporciona 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 bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polipéptido;
- cosechar dicho polipéptido de dichas células;
- opcionalmente, modificar N-terminalmente o C-terminalmente dicho polipéptido, por ejemplo mediante la adición de un grupo de elongación 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 en la presente descripción también se refiere como una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Como se usa en la presente, 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 de la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención. El término "vector" como se usa en la presente se define como una molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido, bacteriófago o virus animal, capaz de introducir una secuencia de ácido nucleico heterólogo en una célula huésped. Un vector de acuerdo con la invención permite la expresión o producción de un polipéptido de la invención codificado por una secuencia de ácido nucleico heterólogo en una célula huésped. Un vector usado de acuerdo con la invención se deriva, por ejemplo, de un virus animal, ejemplos que incluyen, pero no se limitan a, virus vaccinia (incluidos derivados atenuados tales como el virus Vaccinia modificado de Ankara, 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 que es adecuado para el inicio de la transcripción de un polipéptido de acuerdo con la invención en las células huésped seleccionadas. Los ejemplos de promotores adecuados para la expresión de polipéptidos de acuerdo con la invención en células huésped eucariotas incluyen, pero no se limitan a, promotor de beta-actina, promotor de inmunoglobina, promotor de 5S ARN o promotores derivados de virus tales como citomegalovirus (CMV), virus del sarcoma de Rous (RSV) y promotores del virus Simian 40 (SV40) para huéspedes mamíferos.

Además se proporciona por la invención 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 transformó, o es capaz de la transformación, por una molécula de ácido nucleico tal como un vector de acuerdo con la invención. "Transformación" se define en la presente invención como la introducción de un ácido nucleico externo 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. Adicionalmente, se puede lograr la expresión inducible de una proteína recombinante. Un sistema de expresión inducible requiere la

5 presencia o ausencia de una molécula que permite la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica a un polipéptido de la invención. Ejemplos de sistemas de expresión inducibles incluyen, pero no se limitan a, los sistemas de expresión Tet-On y Tet-Off, sistemas de expresión de genes inducibles por hormonas tales como por ejemplo un sistema de expresión de genes inducible por ecdisona, un sistema de expresión de genes inducible por arabinosa, sistema de expresión inducible por *Drosophila* mediante el uso de un vector pMT/BiP (Invitrogen) que comprende un promotor de metalotioneína inducible. Una célula huésped usada en un método para la preparación de un polipéptido de acuerdo con la invención es, por ejemplo, una procariota Gram-positivo, una procariota Gram-negativo 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. 10 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 células BY-2 o NT-1) y células de patata. Los ejemplos de células de levadura son *Saccharomyces* y *Pichia*. Los ejemplos de células de insectos son, células de *Spodoptera frugiperda*, tales como las células Tn5, SF-9 y SF-21, y las células de *Drosophila*, tales como las células *Drosophila Schneider 2 (S2)*. Los ejemplos de células de mamífero que son adecuadas para expresar una proteína recombinante de acuerdo con la invención incluye, 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 retina humana (por ejemplo las células PerC6), células de riñón embrionario humano (tal como las células HEK293), células de riñón canino Madin Darby (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 embrionarios de ratón (tal como células 3T3), células de ovario de hamster chino (CHO), 20 y derivados de estos tipos de células.

Un método de acuerdo con la invención que comprende además preferentemente una etapa de recolección, purificación y/o aislamiento de polipéptidos de acuerdo con la invención. Los polipéptidos obtenidos 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. 25

Un polipéptido de acuerdo con la invención exhibe una serie 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. La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de acuerdo con la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un portador, diluyente, excipiente y/o 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 portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. 30

La invención proporciona además un polipéptido de acuerdo con la invención para uso 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 su uso como un medicamento. Dicho medicamento puede ser un agente terapéutico o profiláctico. 35

En una modalidad, la invención proporciona un método para el tratamiento de un sujeto que padece una infección bacteriana que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva 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 proporciona un método para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto infectado con un microbio o para la profilaxis de una infección microbiana. En una modalidad preferida, dicho microbio es una bacteria. Además se proporciona una molécula de polipéptido y/o ácido nucleico para usar de acuerdo con la invención en el tratamiento de una infección bacteriana o una condición resultante de una infección bacteriana. 40 45

Como se usa en la presente, un "sujeto" es un ser humano o un animal. Los sujetos incluyen, pero no se limitan a, mamíferos tales como 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, dicho sujeto es un mamífero. En una modalidad preferida particularmente, el sujeto es un ser humano. 50

La invención también proporciona un método para inhibir el crecimiento de una bacteria que comprende poner en contacto dicho microbio con un polipéptido o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención. Dicho contacto puede realizarse *en vivo* e *in vitro*. 55

Los polipéptidos y las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención son efectivos en el tratamiento de una variedad de infecciones microbianas. Por ejemplo, los polipéptidos y las composiciones farmacéuticas son efectivos en el tratamiento de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Los ejemplos de bacterias patógenas que pueden causar infecciones en humanos o animales que son tratables con polipéptidos y composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a las bacterias: *Listeria*, *Escherichia*, *Clamidia*, *Rickettsiales* y bacterias de micobacterias, estafilococos, estreptococos, neumonococos, meningococos, *Klebsiella*, *pseudomonas*, *Legionella*, *difteria*, *salmonella*, bacilos, *Vibrio cholerae*, tétanos, *Clostridium*, *Bacillus*, *Yersinia* y *Leptospira*. 60

Los ejemplos de virus patógenos que pueden causar infecciones en seres humanos o animales incluyen, pero no se limitan a, hepatitis A, B o C, virus del herpes (por ejemplo, VZV, HSV-I, HAV-6, HSV-II, CMV, virus de Epstein-Barr), 65

adenovirus, virus de la influenza, flavivirus, echovirus, rinovirus, virus coxsackie, coronavirus, virus sincitial respiratorio (RSV), rotavirus, Morbillivirus, virus de la rubéola, parvovirus, virus vaccinia, virus HTLV, virus del dengue, virus del papiloma, poliovirus, virus de la rabia y virus de inmunodeficiencia humana (virus del VIH; por ejemplo, tipo I y II).

5 Los ejemplos de hongos patógenos que pueden causar infecciones en seres humanos o animales 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*.

10 Los ejemplos de parásitos patógenos que pueden causar infecciones en seres humanos o animales incluyen, pero no se limitan a, *Entamoeba histolytica*, *Plasmodium* (por ejemplo, *Falciparum*, *vivax*), *Entamoeba*, *Giardia*, *Balantidium coli*, *Acanthamoeba*, *Cryptosporidium sp.*, *Pneumocystis carinii*, *Babesia microti*, *Babesia microti*, *Babesia microti*, *Babesia microti*, *Babesia microti*, *Tripanosoma* (por ejemplo, *brucei*, *cruzi*), *Leishmania* (por ejemplo, *donovani*) y *Toxoplasma gondii*.

15 En una modalidad preferida, los polipéptidos y las composiciones farmacéuticas de la invención son efectivos en el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y *S. aureus* (no resistente), la bacteria gramnegativa *Pseudomonas aeruginosa* y las especies de hongos *Candida albicans* y *Aspergillus niger*.

20 Las composiciones que contienen los polipéptidos pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, los polipéptidos o composiciones se administran a un sujeto, preferentemente un ser humano, que ya padece una enfermedad en una cantidad suficiente para contrarrestar los síntomas de la infección o la condición resultante de la infección y sus complicaciones. En aplicaciones profilácticas, los polipéptidos o composiciones se administran a un sujeto, por ejemplo, un ser humano o animal en riesgo de sufrir una infección microbiana en una cantidad suficiente para prevenir la infección o al menos inhibir el desarrollo de una infección. El polipéptido está típicamente presente en una composición farmacéutica de acuerdo con la invención en una cantidad terapéutica, que es una cantidad suficiente para remediar una condición o enfermedad, particularmente los síntomas asociados con una infección microbiana. Las dosis típicas de administración de un polipéptido de acuerdo con la invención o combinaciones de al menos dos del mismo están entre 0,01 y 10 mg de polipéptido por kg de peso corporal, en dependencia del tamaño del polipéptido.

35 Los polipéptidos y la composición farmacéutica de la invención son particularmente adecuados para la aplicación tópica, por ejemplo, en el tratamiento o prevención de infecciones de la piel, infecciones de heridas e infecciones del tracto urinario. Como se detalla antes en la presente descripción, los polipéptidos de la invención son capaces de prevenir la formación de biopelículas y dispersar las biopelículas existentes, destruir las bacterias en y alrededor del sitio de formación de las biopelículas, las biopelículas bacterianas pueden retrasar la cicatrización de la herida cutánea y reducir la eficiencia antibacteriana tópica de los antibióticos convencionales en la cicatrización o el tratamiento de heridas infectadas de la piel, infecciones de la piel o infecciones del tracto urinario. Los polipéptidos de acuerdo con la invención son, por ejemplo, particularmente útiles en la cicatrización como se demuestra en los Ejemplos de la presente solicitud. Los ejemplos muestran que los polipéptidos de la invención son efectivos para destruir bacterias que residen en las biopelículas en un modelo de infección de heridas por quemaduras de los fibroblastos humanos. Por lo tanto, en una modalidad, la invención proporciona un polipéptido, una composición farmacéutica y/o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención para usar en el tratamiento o prevención de una infección de la piel, infección de heridas y/o infecciones del tracto urinario.

45 También se proporciona el uso de un polipéptido, composición farmacéutica y/o molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención para su uso en la cicatrización. 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 fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de infección de la piel, infección de heridas, infección del tracto urinario y/o para la cicatrización. La invención proporciona además un método para el tratamiento de un sujeto que padece infección de la piel, infección de la herida y/o infección del tracto urinario que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva 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.

55 Los polipéptidos y las composiciones farmacéuticas también son útiles como agentes antiinflamatorios, ya que neutralizan las endotoxinas microbianas proinflamatorias como el ácido lipoteicoico, el peptidoglucano y los lipopolisacáridos, de esta manera inhibiendo, reduciendo o previniendo la entrada de neutrófilos, macrófagos/monocitos y linfocitos y la liberación de pro-compuestos microbianos proinflamatorios por el sujeto infectado. Por lo tanto, también se proporciona un método para inhibir la liberación de compuestos proinflamatorios que comprende poner en contacto una célula capaz de liberar compuestos proinflamatorios con un polipéptido. Dicho contacto puede realizarse *en vivo* e *in vitro*. Un polipéptido de la invención se incorpora ventajosamente en un portador de liberación controlada y/o administración dirigida. Como se usa en la presente, el término "liberación controlada" se refiere a la liberación del polipéptido de la invención de una manera dependiente del tiempo. En una modalidad, la liberación controlada se refiere a la liberación lenta. Como se usa en la presente, el término "administración dirigida" se refiere a la liberación del polipéptido de la invención de una manera dirigida al sitio. El uso de un vehículo de liberación controlada tiene la ventaja de que se puede evitar la administración frecuente tal como mediante la 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 efectivamente 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 está dirigido a un sitio infectado por microorganismos que incluyen bacterias, hongos, virus y parásitos. Los portadores de liberación controlada y/o administración dirigida se conocen bien en la técnica. Los ejemplos no limitativos de vehículos de liberación controlada y/o administración dirigida son nanopartículas, micropartículas, nanocápsulas, microcápsulas, liposomas, microesferas, hidrogeles, polímeros, complejos lipídicos, albúmina sérica, anticuerpos, ciclodextrinas y dextranos. La liberación controlada se proporciona, por ejemplo, incorporando un polipéptido de la invención en la superficie de dicho portador. Los portadores son de materiales que forman partículas que capturan un polipéptido de la invención y se degradan o disuelven lentamente en un entorno adecuado, tales como entorno acuoso, ácido o básico o de fluidos corporales, y de esta manera liberan el polipéptido. La administración dirigida se logra, por ejemplo, al proporcionar a un portador grupos de orientación en la superficie del mismo. Los ejemplos de tales portadores que comprenden grupos de direccionamiento son portadores funcionalizados con anticuerpos, portadores que tienen un ligando específico del sitio y portadores que tienen una carga superficial positiva o negativa. Las partículas preferidas para liberación controlada y/o suministro dirigido son nanopartículas, es decir, partículas en el intervalo de aproximadamente 1 a 500 nm de diámetro, preferiblemente hasta aproximadamente 200 nm de diámetro, y liposomas, opcionalmente provistos de grupos de direccionamiento.

Por lo tanto, la invención proporciona además un portador de liberación controlada que comprende un polipéptido de la invención y composiciones farmacéuticas que comprenden dicho portador de liberación controlada. También se proporciona un portador de administración dirigida que comprende un polipéptido de la invención, y composiciones farmacéuticas que comprenden dicho portador de administración dirigida. Dicho portador se selecciona en una modalidad del grupo que consiste en nanopartículas, micropartículas, nanocápsulas, microcápsulas, liposomas, microesferas, hidrogeles, polímeros, complejos lipídicos, albúmina sérica, anticuerpos, ciclodextrinas y dextrano.

Los portadores preferentes de administración dirigida y/o liberación controlada son de material biodegradable. "Biodegradable", como se usa en la presente, se refiere a moléculas que se degradan en condiciones fisiológicas. Esto incluye moléculas que son hidrolíticamente degradables y moléculas que requieren degradación enzimática. Los materiales biodegradables adecuados incluyen, pero no se limitan a, polímeros biodegradables y material biodegradable natural tal como PLA (ácido poliláctico), PGA (ácido poliglicólico), policaprolactona (PCA), óxido de polietileno (PEO), polidioxanona (PDS), policaprolactona (PCL), fumarato de polipropileno, polímeros derivados de lactonas, tales como lactida, glicólido y caprolactona, carbonatos como carbonato de trimetileno y carbonato de tetrametileno, dioxanonas, etilenglicol, amida de poliéster (PEA), óxido de etileno, esteramidas, γ -hidroxivalerato, 6- hidroxipropionato, α -hidroxiácido, hidroxibuteratos, hidroxialcanoatos, carbonatos de poliimida, poliuretanos, polianhídridos y sus combinaciones, polisacáridos como el ácido hialurónico, quitosano y celulosa, y proteínas tales como la gelatina y el colágeno.

Los polipéptidos de la invención pueden usarse además ventajosamente como un conservante para o materiales que son susceptibles a la infección microbiana. Dicho material puede estar impregnado o recubierto con o cubierto por un polipéptido de la invención. En una modalidad, un polipéptido de la invención se usa como conservante para dispositivos médicos. El término "dispositivos médicos", como se usa en la presente, se refiere a dispositivos que pueden 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 mamarios, dispositivos implantables tales como marcapasos, válvulas cardíacas, stents, catéteres, tubos auditivos, férulas, tornillos para dispositivos médicos y apósitos para heridas o tejidos. Dichos dispositivos médicos son particularmente adecuados para la adherencia, por ejemplo, de bacterias, tanto para la adherencia de bacterias individuales como para las bacterias en biopelículas.

Por lo tanto, también se proporciona el uso de un polipéptido de la invención como un conservante para dispositivos médicos. Además se proporciona un recubrimiento, preferentemente para dispositivos médicos, que comprende un polipéptido de la invención. En una modalidad, dicho recubrimiento proporciona la liberación controlada del polipéptido de la invención. Tal recubrimiento de liberación controlada para dispositivos médicos comprende preferentemente un material biodegradable de modo que la liberación del polipéptido de la invención se logra por la degradación del material de recubrimiento. Por lo tanto, también se proporciona un recubrimiento de liberación controlada que comprende un polipéptido de la invención. Además se proporciona un dispositivo médico que comprende este 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 seleccionado del grupo que consiste en PLA (ácido poliláctico), PGA (ácido poliglicólico), policaprolactona (PCA), óxido de polietileno (PEO), polidioxanona (PDS), policaprolactona (PCL), fumarato de polipropileno, polímeros derivados de lactonas, tales como lactida, glicólido y caprolactona, carbonatos como el carbonato de trimetileno y el carbonato de tetrametileno, dioxanonas, etilenglicol, poliéster amida (PEA) óxido de etileno, esteramidas, γ -hidroxivalerato, β -hidroxipropionato, α - hidroxiácidos, hidroxibuteratos, hidroxialcanoatos, carbonatos de poliimida, poliuretanos, polianhídridos y sus combinaciones, polisacáridos tales como el ácido hialurónico, quitosano y celulosa, y proteínas como la gelatina y el colágeno.

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 químicos, por ejemplo, sensibilizadores, nanopartículas. Dicha combinación puede dar como resultado un aumento de la actividad antimicrobiana 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 tratar 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 como oseltamivir, peramivir o zanamivir. Para el tratamiento de infecciones fúngicas, los polipéptidos y las composiciones de la invención se pueden combinar con antifúngicos de polieno, imidazoles, triazoles, alilaminas, equinocandinas, ciclopirox, flucitosina y/o griseofulvina. Por lo tanto, la invención 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, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, mupirocina.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención comprenden al menos un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de portadores adecuados comprenden, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero (por ejemplo, BSA o RSA) y ovalbúmina. En una modalidad preferida, dicho portador adecuado es una solución, por ejemplo, solución salina. Los ejemplos de excipientes que pueden incorporarse en tabletas, cápsulas y similares son los siguientes: un aglutinante tal como: goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina, un excipiente tal como: celulosa microcristalina, un agente desintegrante 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, y un agente saborizante tal como: menta, aceite de gaulteria o cereza. Cuando la forma de unidad de dosificación es una cápsula, esta puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido, tal como: aceite graso. Diversos materiales diferentes pueden estar presentes como recubrimientos o para de cualquier otra manera modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, las tabletas se pueden recubrir con laca, azúcar, o ambas. Un jarabe o un elixir pueden contener el compuesto activo, sacarosa como un agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y saborizante como el sabor a cereza o a naranja. Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención es preferentemente adecuada para uso humano.

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

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

En una modalidad preferida, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se formula para administración tópica. "Administración tópica" como se usa en la presente se refiere a la aplicación a una superficie corporal tal como la piel o las membranas de las mucosas para tratar localmente afecciones como resultado de infecciones microbianas o parasitarias. Los ejemplos de formulación adecuada para administración tópica incluyen, pero no se limitan a, crema, gel, ungüento, loción, espuma, suspensión, atomización, aerosol, aerosol en polvo. Los medicamentos de uso tópico pueden ser epicutáneos, lo que significa que se aplican directamente a la piel. Los medicamentos de uso tópico también pueden ser inhalables, por ejemplo, para su aplicación en el epitelio de la mucosa del tracto respiratorio, o aplicarse a la superficie de tejidos distintos que no sean la piel, como las gotas oculares aplicadas a la conjuntiva o las gotas óticas colocadas en el oído. Dicha composición farmacéutica formulada para administración tópica comprende preferentemente al menos un excipiente farmacéutico adecuado para la aplicación tópica, tal como un emulgente, un diluyente, un humectante, un conservante, un balanceador de pH y/o agua.

Un polipéptido de acuerdo con la invención también es particularmente adecuado para uso diagnóstico. Los polipéptidos pueden usarse para la detección de una infección microbiana, por ejemplo mediante la detección de toxinas microbianas, por ejemplo, toxinas bacterianas que incluyen LPS, LTA y PG, presentes en muestras fisiológicas, tales como sangre, plasma, moco, exudado de 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 polipeptídico de acuerdo con la invención para su uso como agente de diagnóstico. Además se proporciona el 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 una muestra de sangre, plasma, moco, 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 cercano al infrarrojo o un isótopo radiactivo. 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 usado unido al polipéptido, es posible detectar sitios de infección. Por lo tanto, la invención también proporciona métodos para detectar infecciones microbianas tales como infecciones bacterianas. El método típicamente implica la administración de un polipéptido marcado a un sujeto infectado con o sospechoso de estar infectado con un organismo microbiano. Debido a que el polipéptido marcado es capaz de interactuar con el organismo infeccioso, este 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 con o sospechoso de estar infectado con un organismo microbiano. Es posible detectar la acumulación del polipéptido en el sitio de infección o en una muestra mediante el uso de varios detectores que son sensibles al marcador que está unida al polipéptido.

Otra aplicación útil de los polipéptidos de acuerdo con la invención es en la conservación de productos alimenticios. Por lo tanto, también se proporciona el uso de un polipéptido de acuerdo con la invención como conservante alimentario. Generalmente, los microorganismos patógenos o deteriorados se destruyen mediante el procesamiento térmico de los alimentos sometidos a temperaturas que varían de 60 a 100 °C. Tal tratamiento puede tener efectos indeseables en el producto alimenticio, tales como efectos organolépticos indeseables. El uso de un polipéptido de acuerdo con la invención como conservante en productos alimenticios puede dar como resultado una vida de almacenamiento prolongada y/o una seguridad reforzada del producto alimenticio.

Los microorganismos patógenos en los alimentos pueden causar infecciones o intoxicación de los sujetos e incluir bacterias tales como: *Campylobacter jejuni*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* y especies de *Salmonella no tíficas*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* y *Clostridium botulinum*, virus tales como: los rotavirus y el virus de Norwalk, parásitos tales como: *Taenia solium*, *Taenia saginata* y *Trichinella spiralis* y Moulds. El deterioro de los alimentos se refiere al cambio de aspecto, consistencia, sabor y/u olor de los productos alimenticios, y puede ser causado por bacterias tales como: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Serratia*, *Enterobacter* and *Streptococcus*, hongos tales como: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Cladosporium* y levaduras.

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

Breve descripción de las figuras

Figura 1: El esquema simplificado de las etapas involucradas en el modo de acción de los AMPs que indican los dos modelos más importantes para la ruptura de la membrana (formación de alfombras y poros) y la transferencia de AMP al entorno intracelular. Para unirse a la membrana bacteriana citoplasmática, compuesta predominantemente de fosfatidilglicerol (PG) aniónico y fosfatidiletanolamina neutra (PE), los AMPs deben translocarse a través de la matriz extracelular de biopelícula del polímero, así como también la membrana externa y/o la capa de peptidoglicano/ácido lipoteicoico (no se muestra por simplicidad), que es en su mayoría impulsada electrostáticamente.

Figura 2: Destrucción de MRSA LUH14616 por los péptidos P60.4Ac (Nell MJ y otros Péptidos (2006) 649-660) y péptidos P2, P3, P4, P5, P6, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17 y P19, representada por la cantidad de UFC (unidades formadoras de colonias) de MRSA por ml de cultivo medio mediante diferentes concentraciones de los péptidos (A) e CI 90, CI 99 y CI 99,9 (90 %, 99 % y 99,9 % de concentración inhibitoria) valores para los péptidos (B).

Figura 3: Destrucción de MRSA por diferentes concentraciones de P60.4Ac y P10, como se muestra por la cantidad de UFC de MRSA por ml de medio de cultivo.

Figura 4: Efecto de LL-37, P60.4Ac, P10 y mupirocina sobre MRSA LUH14616 en el modelo de piel con heridas térmicas representado como la cantidad de UFC de MRSA LUH14616 por modelo de la piel (A) y la supervivencia de MRSA LUH14616 (en %) por modelo de la piel.

Figura 5: Efecto de LL-37, P60.4AC, P10 y mupirocina sobre MRSA LUH15051 resistente a la mupirocina en el modelo de la piel con heridas térmicas representado como la cantidad de UFC de MRSA LUH15051 por modelo de la piel (A) y la supervivencia de MRSA LUH15051 (en %) por modelo de la piel.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Síntesis de péptidos antimicrobianos.

Los péptidos sintéticos se preparan mediante química Fmoc normal mediante 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 realizan durante 60 minutos 6 veces con especies acilantes. Después de la eliminación final de Fmoc, los péptidos se escinden con TFA/H₂O 19/1 (v/v) que contiene limpiadores adicionales cuando C (trietilsilano) o W (etanetiol) estaban presentes en la secuencia del péptido. Los péptidos se aíslan mediante precipitación con éter/pentano 1/1 (v/v) y el aislamiento del producto mediante centrifugación. Después del secado al aire a aproximadamente 40 °C, los péptidos se disuelven en ácido acético/agua 1/10 (v/v) y se liofilizan. Los péptidos se verifican con respecto a la pureza mediante el uso de UPLC-MS (Acquity, Waters) y la integridad mediante el uso de la espectrometría de masas Maldi-Tof (Microflex, Bruker), mostrando las masas moleculares esperadas.

Abreviaturas:

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

5

Cepas bacterianas

El aislado clínico de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), LUH14616 fue amablemente proporcionado por el Dr. S. Croes, Maastricht University Medical Center, Maastricht, Países Bajos (ver Croes S BMC Microbiol. 2009; 9: 229. doi: 10.1186/1471-2180-9-229) y el MRSA LUH 15051 resistente a la mupirocina fue un regalo del Dr. MEOC Heck (Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Pesquisa, Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente, RIVM, Bilthoven, Países Bajos).

15

El *S. aureus* JAR se describe en Campoccia y otros (Int J Artif Organs. 2008 Sep; 31 (9): 841-7).

Las bacterias se almacenaron a -80 ° C hasta su uso. Se preparan los inóculos de las bacterias de la fase logarítmica media incubando colonias de MRSA aisladas de placas de agar sangre en el medio de caldo de soja tríptico (TSB) (Becton Dickinson, Le Pont de Clax, Francia) durante 2,5 horas y luego se diluyen a la concentración necesaria.

20

Tabla 1

| ID de la Cepa | especies | Resistencia | |
|---------------|------------------|-------------------------|------------------------|
| LUH 14616 | <i>S. aureus</i> | meticilina | Croes y otros. 2009 |
| LUH 15051 | <i>S. aureus</i> | Meticilina y mupirocina | RIVM |
| JAR | <i>S. aureus</i> | | Campoccia y otros 2008 |

25

Ensayo de eliminación *in vitro*

30

Para el ensayo de eliminación *in vitro* en bacterias de fase logarítmica media, MRSA LUH14616 y MRSA LUH 15051 se resuspenden a una concentración de 1×10^6 bacterias/ml en PBS. Subsecuentemente, se añaden 200 μ l a un intervalo de concentración de péptidos LL-37, P60.4Ac (OP-145) y P10 que fueron liofilizados de antemano. Subsecuentemente, la mezcla de bacterias y péptidos se incubó durante 1 hora a 37 °C. Para establecer la capacidad de eliminación de estos péptidos, las suspensiones se diluyen seriadamente y se colocan en placas sobre placas de agar DST para medir los recuentos de UFC viables. Los valores de CI 90, CI 99 e CI 99,9 se calculan mediante análisis de regresión lineal.

35

Para un ensayo de eliminación *in vitro* con las variantes P10, el *S. aureus* JAR (1 mln de UFC/ml) se incuban durante 2 horas a 37 °C con diversas concentraciones de los péptidos en PBS o en PBS/plasma humano (1/1, v/v). En las tablas 2-6 se representa la concentración del péptido que resulta de la eliminación del 99,9 % de las bacterias (1000 UFC/ml restantes). La CL 99,9 es el valor promedio de dos experimentos independientes.

40

Equivalente de piel humana

45

Se preparan equivalentes de piel humana como se describió en El Ghalbzouri y otros (Lab Invest. 2004 enero; 84 (1): 102-12). En resumen, 5×10^5 queratinocitos humanos normales se siembran sobre matrices de colágeno de cola de rata pobladas con fibroblastos. Las matrices de colágeno se preparan de antemano haciendo un basal (ácido acético al 0,1 %, colágeno 4 mg/ml, solución salina equilibrada de Hank (HBSS, 10x), NaOH 1 M y FCS) y una capa superior de colágeno en la que se siembran fibroblastos humanos normales (4 mg/ml de colágeno, 10x HBSS, NaOH 1 M, FCS y fibroblastos). Se usan filtros Transwell con un tamaño de los poros de 3 μ m (Corning 3414, Costar) para cultivar los equivalentes de piel humana. Las matrices de colágeno se cultivan en medio de fibroblastos durante una semana. Los equivalentes de piel humana de grosor completo se cultivan primero sumergidos en medio de queratinocitos durante 2 o 3 días a 37 °C y 7,3 % de CO₂ y luego se cultivan en medio de queratinocitos como se describió anteriormente, pero con FCS al 1 % y suplementado con L-serina 2 M, L-carnitina 10 mM, DL- α -tocoferol-acetato 1 μ M, ácido ascórbico 50 μ M, un suplemento lipídico que contiene ácido palmítico, ácido linoleico y ácido araquidónico en una relación 1:1:1 y $2,4 \times 10^{-5}$ M de albúmina de suero bovino. Después de 2 o 3 días, los HSE se cultivan en la interfaz aire-líquido durante 14 días en medio de queratinocitos como se describió anteriormente, pero sin suero y suplementado con L-serina 2M, L-carnitina 10 mM, DL- α -acetato de tocoferol 1 μ M, ácido ascórbico 50 μ M, un suplemento lipídico que contiene ácido palmítico 25 μ M, ácido linoleico 30 μ M y ácido araquidónico 7 μ M (2:1:1) y $2,4 \times 10^{-5}$ M de albúmina de suero bovino. El medio de cultivo se renueva dos veces por semana.

50

55

Modelo de infección por heridas por quemaduras y tratamiento experimental

60

Los modelos de piel de espesor completo se reconstruyen como se describió anteriormente mediante el uso de filtros Transwell con un tamaño de poro de 0,4 μ m, (Corning 3460, Costar). Después de 10 días de cultivo en la interfase aire-líquido, se hacen heridas por quemaduras de 20 mm² aplicando el nitrógeno líquido sobre los equivalentes de piel durante

15 segundos. Los equivalentes de piel dañados térmicamente se incuban durante 1 hora a 37 °C y 7,3 % de CO₂ antes de la infección. La infección se realiza mediante la aplicación de un inóculo de 1x10⁵ MRSA sobre los equivalentes de piel. Después de la incubación durante 1 hora, se eliminan las bacterias no adherentes. El tratamiento comienza 1 u 8 h después de la infección y se administra una dosis (100 µg en 100 ml de PBS) de LL-37, P60.4Ac o P10. El tratamiento se prolonga durante 4 o 24 h antes del procesamiento. Los equivalentes de piel se lavan con 1 ml de PBS para eliminar todas las bacterias no adherentes. Luego se toman dos biopsias de 4 mm y se homogenizan en 1 ml de PBS. Los homogenizados y los lavados se diluyen en serie para medir los recuentos de UFC viables en placas de agar de prueba de diagnóstico de sensibilidad (DST).

Resultados

Identificación de P10

Se sintetiza un conjunto de 15 péptidos. Los péptidos se diseñan para fortalecer o debilitar la estructura anfipática prevista en comparación con el P60.4Ac (Nell MJ y otros Péptidos (2006) 649-660), en base a las predicciones de la estructura asistida por computadora. La actividad anti-biopelícula es muy variable entre los péptidos (se generaron de esta manera los péptidos antimicrobianos de mayor y menor actividad). Se anticipa que existe una relación delicada entre la modificación de la estructura helicoidal anfipática y la actividad anti-biopelícula dentro de los péptidos antimicrobianos. Por lo tanto, se desarrolla una serie de péptidos sintéticos cortos basados en estas observaciones, y se evalúa su actividad antimicrobiana. La actividad de estos péptidos varía desde la ausencia de actividad antimicrobiana hasta péptidos con una actividad que excede la de LL-37 en una base molar. Las secuencias de P60.4Ac y los 15 péptidos probados son:

| | |
|---------|---|
| P60.4Ac | I G K E F K R I V E R I K R F L R E L V R P L R |
| P2 | I A K E F K R I V E R I K R F L R E L V R P L R |
| P3 | L A R D Y K R L V E R L K R W L R E L V R P L K |
| P4 | I A K E F K R I L E R I K R F I R E I T R P I R |
| P5 | T A K E Y K R I L D R I K R Y L R E L V R A I K |
| P6 | V A K D Y R K V V D R I K R F L R Y L L R P V R |
| P9 | L A K D Y K K I V E R L R K W L R E V L R P V K |
| P10 | L A R E Y K K I V E K L K R W L R Q V L R T L R |
| P11 | L A K E Y R K I F D R L K K W L R Q I V R P S K |
| P12 | L A R E Y K R I F E R L R K W L R Q I V K P V R |
| P13 | L A K E W R K I V D R L K R W L R D I L K A T K |
| P14 | V A R E W K R I L E K I K R W L R D I L K A L R |
| P15 | V A K E W R K I V D R I K R Y L R D I S K A T K |
| P16 | T A R E W K R I L E K I R K Y L R D V S R V T R |
| P17 | V A K D W K R I V D K V R R Y L R E V T K I L K |
| P19 | T A K D Y R K I F E K I K K Y L K D L T R I L K |

El péptido P10 destruye MRSA LYH14616 de manera muy eficiente. Tiene la mayor actividad contra MRSA LUH14616 de todos los péptidos probados, e incluso es considerablemente más efectivo que P60.4Ac (OP-145), ver Figura 2A y B. Por ejemplo, P10 tiene una CI 99,9 de 0,59 µM, lo que significa que a esta concentración P10 destruye a 999 de 1000 bacterias. El P60.4Ac, a una concentración similar, incluso ligeramente superior, de 0,75 µM destruye solo 900 de 1000 bacterias (CI 90 de 0,75 µM). Por lo tanto, sobreviven 100 veces más bacterias después del tratamiento con P60.4Ac en comparación con el tratamiento con P10 a una concentración similar. Por lo tanto, el P10 tiene una actividad aproximadamente 100 veces mejor que el P60.4Ac.

Actividad de P10 y variantes

El péptido 10 es más efectivo que LL-37 y P60.4Ac para destruir el MRSA y el MRSA resistente a la mupirocina y para eliminar estas bacterias de los equivalentes de piel humana herida térmicamente (Figuras 3-5).

El P10 es altamente efectivo contra las bacterias MRSA en la fase logarítmica, las bacterias estacionarias y las bacterias que residen en las biopelículas.

Además, el P10 es altamente efectivo contra:

- 1) Bacterias grampositivas, por ejemplo, varias cepas meticilina resistentes así como también cepas sensibles (ver figuras 4 y 5), *Staphylococcus epidermidis*,
- 2) Bacterias gramnegativas que incluyen varias cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (resistentes a medicamentos), cepas de *Acinetobacter baumannii* (resistentes a medicamentos),
- 3) micobacterias y
- 4) los patógenos fúngicos *Candida albicans* (resistentes a fluconazol) y *Aspergillus niger*.

Las variantes de P10 en las que uno o todos los aminoácidos han sido reemplazados por su D-aminoácido correspondiente, o un aminoácido ha sido reemplazado por otro L-aminoácido tienen actividad antimicrobiana que es comparable a la de P10. También las variantes que tienen un N-terminal elongado de C-terminal con diferentes grupos que incluyen acetilo, amida, NH- (CH₂-CH₂-O)₁₁-CO, hexanoilo, decanoilo, miristoilo, propionilo, uno o dos grupos aminohexanoilo, y las variantes más cortas de P-10 tienen una actividad antimicrobiana comparable a la de P10. La secuencia y la actividad de estas variantes de P10 se muestran en las tablas 2, 3, 5 y 6. Los péptidos en los que se introdujeron sustituciones de prolina para romper la hélice fueron en su mayoría inactivos (ver Tabla 4).

Tabla 2. Actividad de las variantes de P-10 en las que un aminoácido ha sido reemplazado por su D-aminoácido (letras minúsculas) y contrapartida y péptido retro-inverso. J = acetilo, B = amida

| Péptido | Secuencia | CL 99,9 (µM) (PBS) | CL 99,9 (µM) (50 % de plasma) |
|---------|-------------------------------|--------------------|-------------------------------|
| P-10 | JLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 102,4 |
| 1301-1 | J1AREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 0,6 | 38,4 |
| 1301-2 | JLaREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 0,6 | 38,4 |
| 1301-3 | JLArEYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 0,6 | 38,4 |
| 1301-4 | JLAREyKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 0,6 | 38,4 |
| 1301-5 | JLAREyKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 0,6 | 38,4 |
| 1301-6 | JLAREYkKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 0,6 | 38,4 |
| 1301-7 | JLAREYKkIVEKLRWLRQVLRTRLB | 0,6 | 25,6 |
| 1301-8 | JLAREYKKiVEKLRWLRQVLRTRLB | 0,6 | 38,4 |
| 1301-9 | JLAREYKKIvEKLRWLRQVLRTRLB | 0,6 | 38,4 |
| 1301-10 | JLAREYKKIVeKLRWLRQVLRTRLB | 0,6 | 38,4 |
| 1301-11 | JLAREYKKIVEkKLRWLRQVLRTRLB | 0,4 | 19,2 |
| 1301-12 | JLAREYKKIVEK1KRWLRQVLRTRLB | 0,6 | 32,0 |
| 1301-13 | JLAREYKKIVEKlKRWLRQVLRTRLB | 0,6 | 38,4 |
| 1301-14 | JLAREYKKIVEKlKrWLRQVLRTRLB | 0,6 | 38,4 |
| 1301-15 | JLAREYKKIVEKlKRwLRQVLRTRLB | 0,4 | 38,4 |
| 1301-16 | JLAREYKKIVEKlKRW1RQVLRTRLB | 0,6 | 38,4 |
| 1301-17 | JLAREYKKIVEKlKRWlRQVLRTRLB | 0,6 | 38,4 |
| 1301-18 | JLAREYKKIVEKlKRWlRqVLRTRLB | 0,6 | 38,4 |
| 1301-19 | JLAREYKKIVEKlKRWlRQvLRTRLB | 0,6 | 32,0 |
| 1301-20 | JLAREYKKIVEKlKRWlRQV1RTRLB | 0,6 | 38,4 |
| 1301-21 | JLAREYKKIVEKlKRWlRQVlRTRLB | 0,6 | 38,4 |
| 1301-22 | JLAREYKKIVEKlKRWlRQVlRlRTRLB | 0,6 | 38,4 |
| 1301-23 | JLAREYKKIVEKlKRWlRQVlRl1RTRLB | 0,4 | 32,0 |

| | | | |
|---------|----------------------------|-----|---------|
| 1301-24 | JLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLrB | 0,6 | 19,2 |
| 1241-03 | rtrlvqrlwrklkevikkyaB | 3,2 | > 102,4 |
| 1313-07 | JlareykkiveklkrwlrqvlrtlB | 1,6 | 25,6 |

Tabla 3. Actividad de variantes de P-10 en las que el péptido se ha elongado N-terminalmente de C-terminalmente con diferentes grupos. J = acetilo, B = amida, o = NH- (CH₂-CH₂-O)₁₁-CO, b = hexanoilo, j = decanoilo, u = miristoilo, U = propionilo. Z = amino-hexanoilo

| Péptido | Secuencia | CL 99,9 (µM) (PBS) | CL 99,9 (µM) (50 % de plasma) |
|---------|------------------------------|--------------------|-------------------------------|
| P-10 | JLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 102,4 |
| 1302-4 | JLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLRZZB | 0,8 | 38,4 |
| 1302-5 | JLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLRoB | 0,8 | 102,4 |
| 1302-6 | JLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLRZB | 0,6 | 38,4 |
| 1302-7 | oLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 102,4 |
| 1302-8 | bLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,2 | 102,4 |
| 1302-9 | jLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | > 102,4 |
| 1302-10 | uLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 2,0 | 102,4 |
| 1302-11 | ULAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 102,4 |

Tabla 4. Actividad de las variantes de P-10 en las que el péptido ha sido modificado por dos sustituciones de un aminoácido particular por P (prolina, que se ha informado que es un residuo que rompe la hélice). J = acetilo, B = amida

| Péptido | Secuencia | CL 99,9 (µM) (PBS) | CL 99,9 (µM) (50 % de plasma) |
|---------|---------------------------|--------------------|-------------------------------|
| P-10 | JLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 102,4 |
| 1302-13 | JLAREYKPIVEKLRWPRQVLRTRLB | > 3,2 | > 102,4 |
| 1302-14 | JLAREYPKIVEKLRWLRPVLRLB | 3,2 | 102,4 |
| 1302-15 | JLAREYKKIVPKLRWLRQVPRLB | > 3,2 | 76,8 |
| 1302-16 | JLAREYKPPVEKLRWLPQVLRTRLB | > 3,2 | 102,4 |

Tabla 5. Actividad de variantes de P-10 en las que un aminoácido ha sido reemplazado por otro L-aminoácido. J = acetilo, B = amida

| Péptido | Secuencia | CL 99,9 (µM) (PBS) | CL 99,9 (µM) (50 % de plasma) |
|---------|---------------------------|--------------------|-------------------------------|
| P-10 | JLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 102,4 |
| 1302-17 | JIAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 102,4 |
| 1302-18 | JVAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 76,8 |
| 1302-19 | JAAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 76,8 |
| 1302-20 | JLLREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 102,4 |
| 1302-21 | JLVREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,2 | 76,8 |
| 1302-22 | JLQREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 76,8 |

ES 2 784 484 T3

| | | | | |
|----|---------|-----------------------------|-----|-------|
| 5 | 1302-23 | JLAKEYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 102,4 |
| | 1302-24 | JLAHEYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 102,4 |
| | 1302-25 | JLARQYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,2 | 51,2 |
| | 1302-26 | JLAREFKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 0,8 | 76,8 |
| 10 | 1302-27 | JLAREYRKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 0,8 | 76,8 |
| | 1302-28 | JLAREYHKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,2 | 102,4 |
| | 1302-29 | JLAREYKRIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 102,4 |
| | 1302-30 | JLAREYKHIVEKLRWLRQVLRTRLB | 3,2 | 102,4 |
| 15 | 1302-31 | JLAREYKKIVERLKRWLRQVLRTRLB | 3,2 | 102,4 |
| | 1302-32 | JLAREYKKIVEHLKRWLRQVLRTRLB | 3,2 | 102,4 |
| | 1302-33 | JLAREYKKIVEKIKRWLRQVLRTRLB | 3,2 | 102,4 |
| 20 | 1302-34 | JLAREYKKIVEKVLRWLRQVLRTRLB | 3,2 | 102,4 |
| | 1302-36 | JLAREYKKIVEKAKRWLRQVLRTRLB | 3,2 | 76,8 |
| | 1302-37 | JLAREYKKIVEKLHRWLRQVLRTRLB | 3,2 | 102,4 |
| | 1302-38 | JLAREYKKIVEKLLKRWLRQVLRTRLB | 2,4 | 102,4 |
| 25 | 1302-39 | JLAREYKKIVEKLKHWRQVLRTRLB | 3,2 | 102,4 |
| | 1302-40 | JLAREYKKIVEKLRFLRQVLRTRLB | 1,6 | 76,8 |
| | 1302-41 | JLAREYKKIVEKLRWLHQVLRTRLB | 1,6 | 102,4 |
| 30 | 1302-42 | JLAREYKKIVEKLRWLRNVLRTRLB | 1,6 | 76,8 |
| | 1302-43 | JLAREYKKIVEKLRWLRVLRTRLB | 1,6 | 102,4 |
| | 1302-44 | JLAREYKKIVEKLRWLRVLRTRLB | 1,6 | 76,8 |
| 35 | 1302-45 | JLAREYKKIVEKLRWLRVLRTRLB | 1,6 | 76,8 |
| | 1302-46 | JLAREYKKIVEKLRWLRQLLRTRLB | 1,6 | 102,4 |
| | 1302-47 | JLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 76,8 |
| 40 | 1302-48 | JLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,2 | 76,8 |
| | 1302-49 | JLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 51,2 |
| | 1302-50 | JLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 0,8 | 51,2 |
| 45 | 1302-51 | JLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 102,4 |
| | 1302-52 | JLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 76,8 |
| | 1302-53 | JLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 51,2 |
| 50 | 1302-54 | JLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 0,8 | 51,2 |
| | 1302-55 | JLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,2 | 102,4 |

Tabla 6. Actividad de variantes más cortas de P-10. J = acetilo, B = amida

| Péptido | Secuencia | CL 99,9 (µM) (PBS) | CL 99,9 (µM) (50 % de plasma) | |
|---------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|------|
| P-10 | JLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 102,4 | |
| | | | | |
| 60 | 1302-56 | JREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 51,2 |
| | 1302-57 | JLAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 51,2 |
| 65 | 1302-58 | JREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLB | 1,6 | 76,8 |

ES 2 784 484 T3

| | | | |
|---------|-----------------------|-------|-------|
| 1302-59 | JYKKIVEKLRWLRQVLRTRB | 1,6 | 51,2 |
| 1302-60 | JLAREYKKIVEKLRWLRQVLB | 1,6 | 102,4 |
| 1302-61 | JEYKKIVEKLRWLRQVLRB | 2,4 | 102,4 |
| 1302-62 | JYKKIVEKLRWLRQVLB | 1,6 | 76,8 |
| 1302-63 | JKKIVEKLRWLRQB | > 3,2 | 102,4 |

5

10

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado o recombinante que comprende hasta 200 aminoácidos de longitud y que comprende una secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLRWLRQVLRRTLRL o una variante de dicha secuencia de aminoácidos, dicho polipéptido que tiene actividad antibacteriana, dicha variante que tiene al menos 16 aminoácidos y:
- que tiene hasta 5 de las siguientes sustituciones de aminoácidos:
 - sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de L, I, V o A por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo;
 - sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de R, K o H por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo;
 - sustitución de E por Q
 - sustitución de Y o W por F
 - sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de Q, N, A, S o T por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo
 - que tiene una o más sustituciones de un aminoácido por su D-aminoácido correspondiente,
 - que tiene hasta 5 sustituciones de un aminoácido por su aminoácido no natural correspondiente en donde dicho aminoácido no natural correspondiente:
 - es un β -aminoácido correspondiente;
 - es t-butilalanina, 2-naftilalanina; L-3-(2-naftil)alanina o ácido 2-aminoisobutírico cuando el aminoácido natural es alanina;
 - es homoarginina, ornitina, N5-carbamoilclornitina o ácido 3-amino-propiónico cuando el aminoácido natural es arginina;
 - es N-etilparagina cuando el aminoácido natural es asparagina;
 - es 4-terc-butil hidrógeno 2-azidosuccinato cuando el aminoácido natural es ácido aspártico.
 - es ácido cisteico u homocisteína cuando el aminoácido natural es cisteína;
 - es ácido γ -carboxi-DL-glutámico o ácido 4-fluoro-DL-glutámico cuando el aminoácido natural es ácido glutámico;
 - es D-citrulina o tio-L-citrulina cuando el aminoácido natural es glutamina;
 - es N-metilglicina, t-butilglicina, N-metilglicina o D-alilglicina cuando el aminoácido natural es glicina;
 - es éster metílico de 3-(3-metil-4-nitrobencil)-L-histidina cuando el aminoácido natural es histidina;
 - es isodesmosina, N-metilisoleucina o alo-isoleucina cuando el aminoácido natural es isoleucina;
 - es norleucina, desmosina o 5,5,5-trifluoro-leucina cuando el aminoácido natural es leucina;
 - es 6-N-metilisina, ácido 2-aminoheptanoico, N-acetilsina, hidroxilisina o alo-hidroxilisina cuando el aminoácido natural es lisina;
 - es sulfóxido de metionina cuando el aminoácido natural es metionina;
 - es p-amino-L-fenilalanina, 3-benzotienilalanina p-bromofenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, 2-fluorofenilalanina, 3-fluorofenilalanina o 4-fluorofenilalanina cuando el aminoácido natural es fenilalanina;
 - es 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina o 1-acetil-4-hidroxi-L-prolina cuando el aminoácido natural es prolina;
 - es homoserina, isoserina o 3-fenilserina cuando el aminoácido natural es serina;
 - es D-tiroxina o alo-treonina cuando el aminoácido natural es treonina;
 - es 5-hidroxi-triptófano, 5-metoxi-triptófano o 5-fluoro-triptófano cuando el aminoácido natural es triptófano.
 - es O-metil-L-tirosina, O-4-alil-L-tirosina o 3-cloro-tirosina cuando el aminoácido natural es tirosina; o
 - es norvalina, N-metilvalina o 3-fluoro-valina cuando el aminoácido natural es valina; y/o
 - que tiene una secuencia retro-inversa de al menos 16 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia de aminoácidos.
2. Un polipéptido aislado o recombinante que comprende hasta 200 aminoácidos de longitud y que comprende una secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLRWLRQVLRRTLRL, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos, dicho polipéptido que tiene actividad antibacteriana, dicha variante que tiene al menos 16 aminoácidos y que tiene hasta 5 de las siguientes sustituciones de aminoácidos:
- sustitución de L en la posición 1 del aminoácido por I, V o A
 - sustitución de A en la posición 2 del aminoácido por L, V, Q o I
 - sustitución de R en la posición 3 del aminoácido por K o H
 - sustitución de E en la posición 4 del aminoácido por Q
 - sustitución de Y en la posición 5 del aminoácido por F o W
 - sustitución de K en la posición 6 del aminoácido por R o H
 - sustitución de K en la posición 7 del aminoácido por R o H
 - sustitución de I en la posición 8 del aminoácido por L, V o A
 - sustitución de V en la posición 9 del aminoácido por L, I o A
 - sustitución de E en la posición 10 del aminoácido por Q
 - sustitución de K en la posición 11 del aminoácido por R o H
 - sustitución de L en la posición 12 del aminoácido por I, V o A

- sustitución de K en la posición 13 del aminoácido por R o H
 - sustitución de R en la posición 14 del aminoácido por K o H
 - sustitución de W en la posición 15 del aminoácido por F o Y
 - sustitución de R en la posición 17 del aminoácido por H o K
 - 5 - sustitución de Q en la posición 18 del aminoácido por N, A, S o T
 - sustitución de V en la posición 19 del aminoácido por L, I o A
 - sustitución de L en la posición 20 del aminoácido por I, V o A
 - sustitución de R en la posición 21 del aminoácido por K o H
 - sustitución de T en la posición 22 del aminoácido por Q, N o A
 - 10 - sustitución de R en la posición 24 del aminoácido por H o K.
3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido está modificado N-terminalmente y/o C-terminalmente, que comprende preferentemente un residuo acetilo, hexanoilo, decanoilo, miristoilo, NH-(CH₂-CH₂-O)₁₁-CO- o propionilo N-terminal y/o que comprende una amida, NH-(CH₂-CH₂-O)₁₁-CO-amida- C-terminal, o uno o dos grupos amino-hexanoilo.
 - 15 4. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, en donde dicha variante comprende al menos una secuencia de aminoácidos YKKIVEKLRWLRQVL que tiene hasta 5 de las sustituciones de aminoácidos como se define en la reivindicación 1.
 - 20 5. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2 o un polipéptido que comprende hasta 200 aminoácidos de longitud y que comprende una secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLRWLRQVLRTLR o una variante de dicha secuencia de aminoácidos, dicho polipéptido que tiene actividad antibacteriana, dicha variante tiene al menos 16 aminoácidos y:
 - que tiene hasta 5 de las siguientes sustituciones de aminoácidos:
 - sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de L, I, V o A por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo;
 - sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de R, K o H por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo;
 - sustitución de E por Q
 - sustitución de Y o W por F
 - sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de Q, N, A, S o T por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo y/o
 - que tiene una secuencia retro-inversa de al menos 16 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia de aminoácidos
 - 25 6. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5.
 - 30 7. Una célula huésped recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 y/o el vector de acuerdo con la reivindicación 6.
 - 35 8. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 y/o el vector de acuerdo con la reivindicación 6 y al menos un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
 - 40 9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, que está formulada para administración tópica, tal como, una crema, gel, ungüento, loción, espuma, suspensión, atomización, aerosol, aerosol en polvo.
 - 45 10. Las composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, que comprende además un agente antimicrobiano adicional, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en penicilinas, cefalosporinas, mupirocina, carbapenemas.
 - 50 11. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10 que comprende un portador de liberación controlada y/o administración dirigida que comprende dicho polipéptido, de manera que dicho portador se selecciona preferentemente del grupo que consiste en nanopartículas, micropartículas, nanocápsulas, microcápsulas, liposomas, microsferas, hidrogeles, polímeros, complejos lipídicos, albúmina sérica, anticuerpos, ciclodextrinas y dextrano.
 - 55 12. El recubrimiento para un dispositivo médico que comprende un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
 - 60 13. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y/o la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 para usar como un agente terapéutico, profiláctico o de diagnóstico.
 - 65

14. La molécula del polipéptido y/o ácido nucleico para usar de acuerdo con la reivindicación 13 en el tratamiento de una infección bacteriana y/o en el tratamiento de una afección resultante de una infección bacteriana.
- 5 15. Un método para la preparación de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2 o un polipéptido que comprende hasta 200 aminoácidos de longitud y que comprende una secuencia de aminoácidos LAREYKKIVEKLRWLRQVLRTRLR o una variante de dicha secuencia de aminoácidos, dicho polipéptido tiene actividad antibacteriana, dicha variante que tiene al menos 16 aminoácidos y:
- 10 – que tiene hasta 5 de las siguientes sustituciones de aminoácidos:
- sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de L, I, V o A por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo;
 - sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de R, K o H por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo;
 - sustitución de E por Q
 - sustitución de Y o W por F
 - sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo de Q, N, A, S o T por otro aminoácido seleccionado de dicho grupo y/o
- 15 – que tiene una secuencia retro-inversa de al menos 16 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia de aminoácidos, dicho método que comprende:
- 20 – proporcionar una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5;
- transformar una célula huésped con dicha molécula de ácido nucleico;
- cultivar dicha célula huésped bajo condiciones que permitan la expresión de dicho polipéptido;
- cosechar dicho polipéptido de dichas células;
- opcionalmente, modificar dicho polipéptido N-terminalmente o C-terminalmente.
- 25

Figura 1

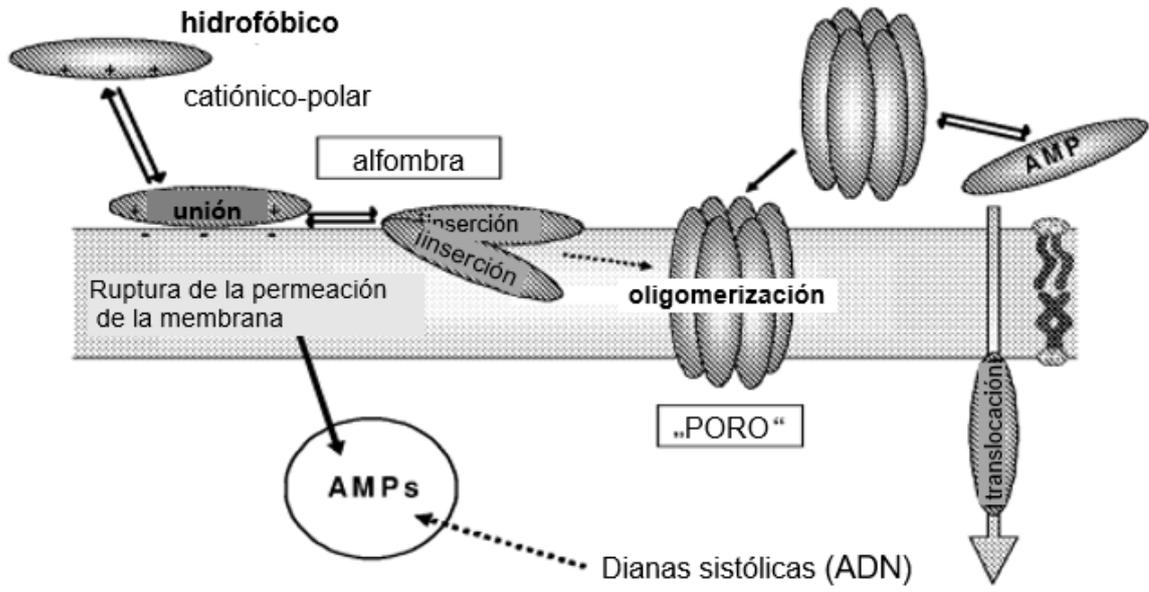
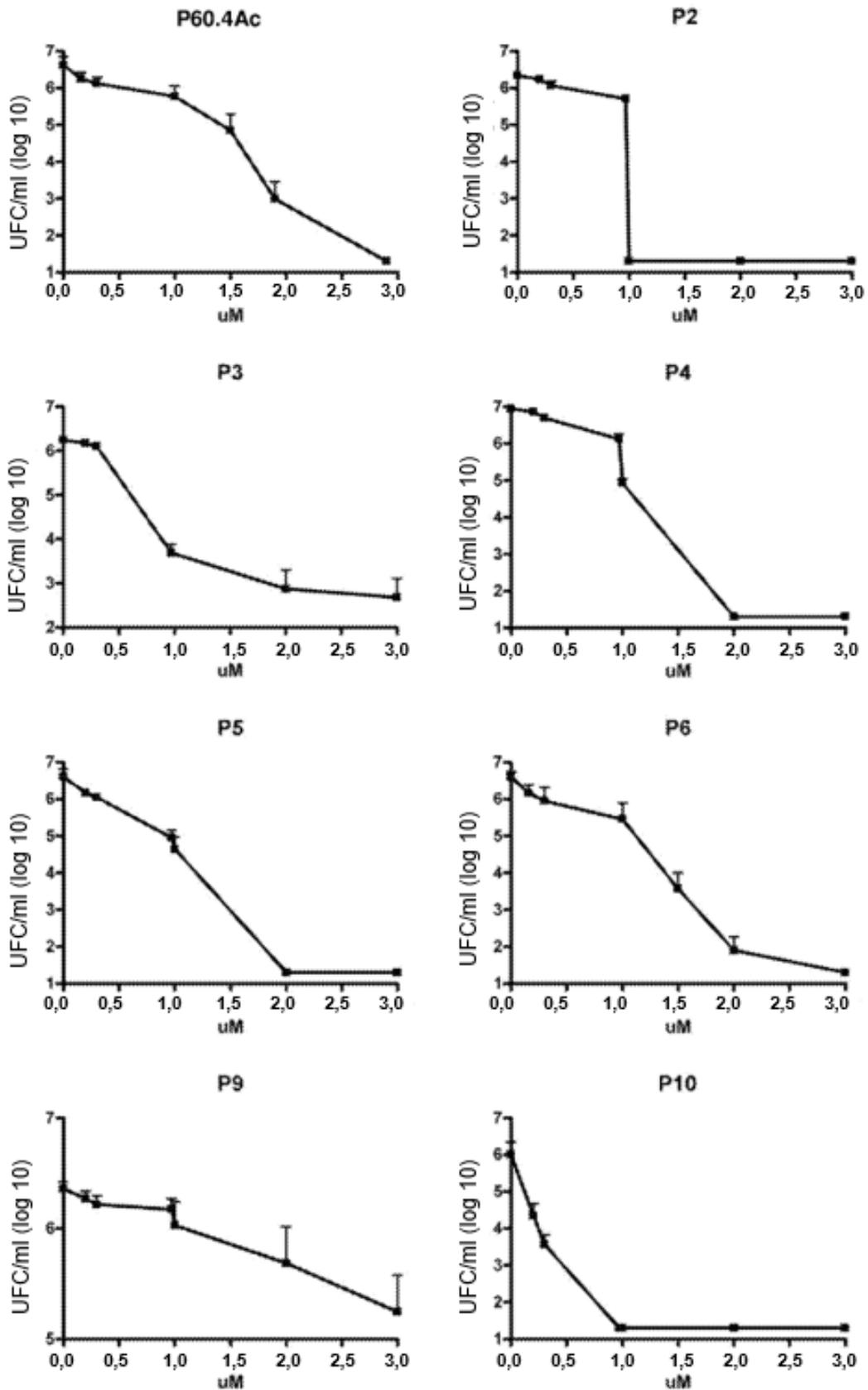


Figura 2A



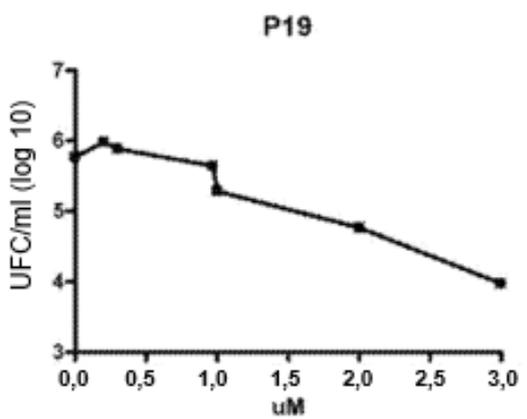
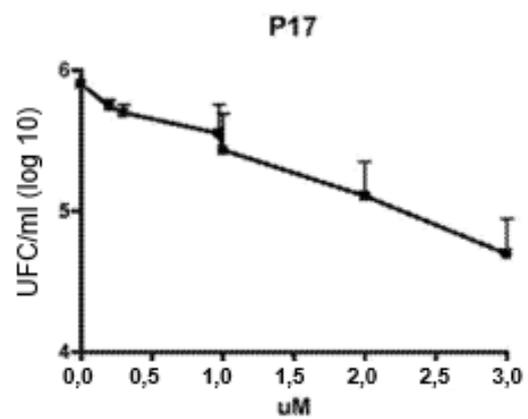
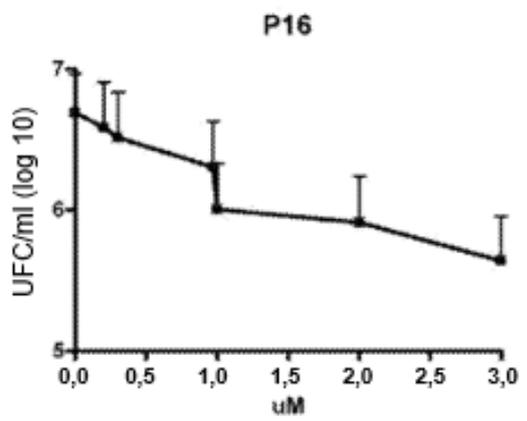
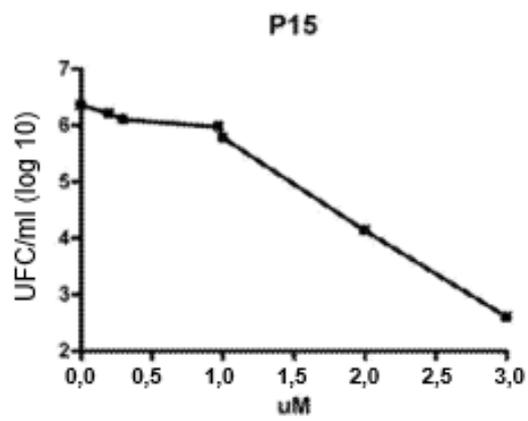
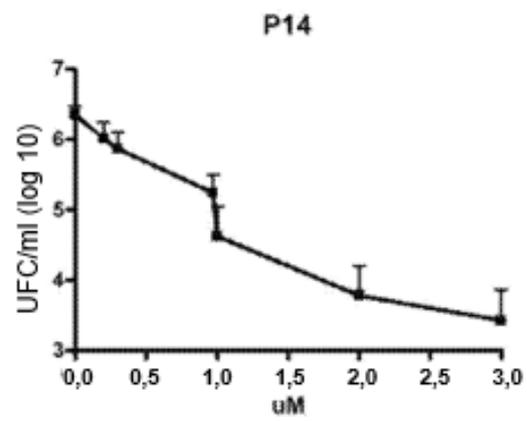
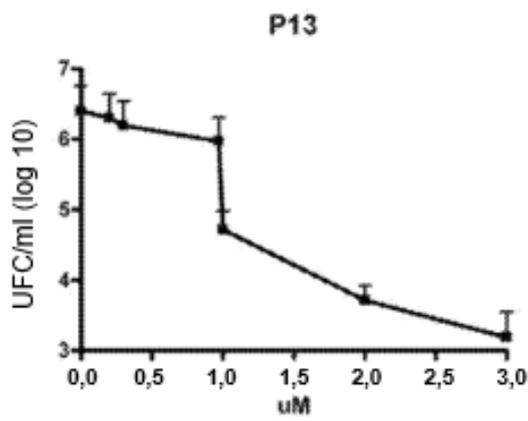
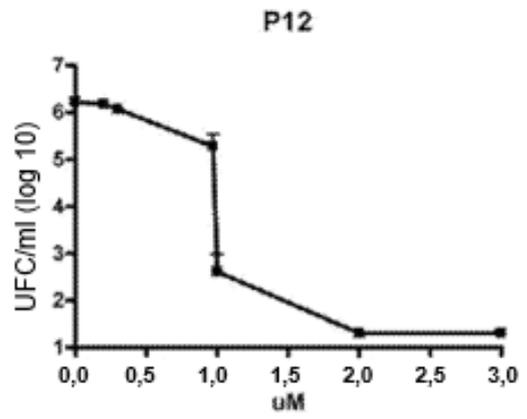
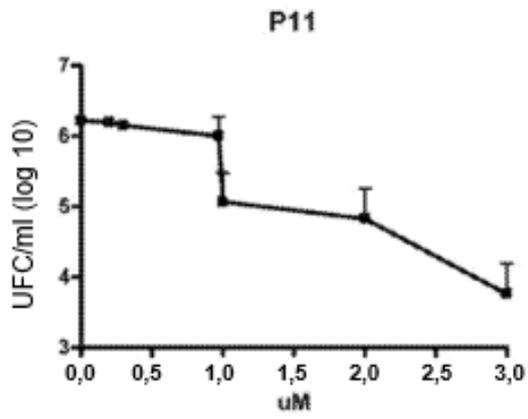


Figura 2B

| Péptido | CI 90 (μM) | CI 99 (μM) | CI 99,9 (μM) |
|----------------|---|---|---|
| P60.4Ac | 0,75 \pm 0,29 | 1,13 \pm 0,34 | 1,51 \pm 0,40 |
| P2 | 0,51 \pm 0,02 | 0,76 \pm 0,00 | 1,02 \pm 0,02 |
| P3 | 0,50 \pm 0,10 | 0,97 \pm 0,10 | 1,44 \pm 0,29 |
| P4 | 0,79 \pm 0,14 | 1,07 \pm 0,10 | 1,35 \pm 0,06 |
| P5 | 0,58 \pm 0,22 | 0,93 \pm 0,21 | 1,28 \pm 0,20 |
| P6 | 0,41 \pm 0,29 | 0,69 \pm 0,46 | 0,97 \pm 0,63 |
| P9 | 2,29 \pm 1,06 | 4,32 \pm 1,72 | 6,35 \pm 2,46 |
| P10 | 0,10 \pm 0,04 | 0,34 \pm 0,04 | 0,59 \pm 0,08 |
| P11 | 1,11 \pm 0,68 | 1,75 \pm 1,21 | 2,39 \pm 1,74 |
| P12 | 0,54 \pm 0,03 | 0,84 \pm 0,11 | 1,14 \pm 0,20 |
| P13 | 0,95 \pm 0,21 | 1,77 \pm 0,34 | 2,59 \pm 0,54 |
| P14 | 0,62 \pm 0,44 | 1,39 \pm 0,89 | 2,15 \pm 1,34 |
| P15 | 1,14 | 1,85 | 2,56 |
| P16 | 2,40 \pm 0,51 | 5,23 \pm 0,65 | 8,07 \pm 0,79 |
| P17 | 2,29 \pm 1,25 | 4,67 \pm 1,92 | 7,05 \pm 2,60 |
| P19 | 1,94 \pm 0,01 | 3,32 \pm 0,03 | 4,70 \pm 0,06 |

Figura 3

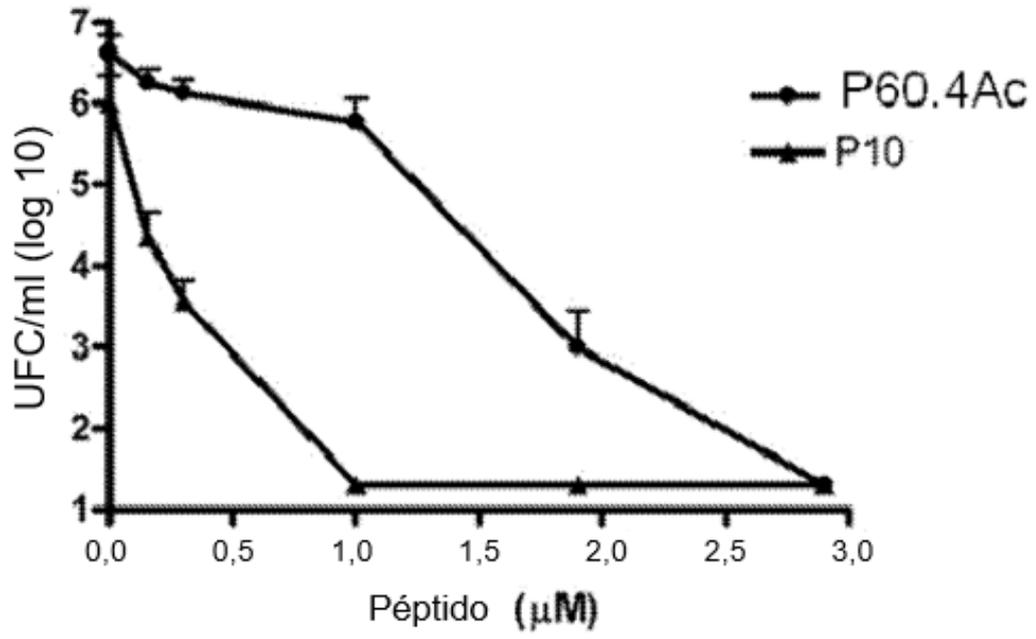


Figura 5

