

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 780**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2016** **PCT/FI2016/050481**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2017** **WO17001730**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2016** **E 16739526 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020** **EP 3423476**

54 Título: **Nuevos péptidos antimicrobianos, sus variantes y usos**

30 Prioridad:

30.06.2015 FI 20155515

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

01.03.2021

73 Titular/es:

CHAIN ANTIMICROBIALS OY (100.0%)
c/o Tejesvi Mysore, Teknologiantie 2
90590 Oulu, FI

72 Inventor/es:

MYSORE VISHAKANTE GOWDA, TEJESVI y
PIRTTILÄ, ANNA MARIA

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 808 780 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

Nuevos péptidos antimicrobianos, sus variantes y usos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a péptidos antimicrobianos, a un procedimiento para eliminar o inhibir el crecimiento de microbios y al uso del péptido descrito en el presente documento como medicamento, aditivo para piensos, conservante o tensioactivo.

Antecedentes

Entre los compuestos farmacológicos, los antibióticos han tenido un tremendo impacto en la esperanza de vida de la humanidad. Sin embargo, la capacidad de los microbios para desarrollar resistencia es casi ilimitada. La resistencia a múltiples fármacos se ha convertido en una característica muy común y peligrosa de muchos patógenos humanos, y la resistencia a los fármacos se está extendiendo por todo el mundo.

Los endófitos son productores prometedores de una amplia gama de metabolitos secundarios con posible aplicación en las industrias de biomedicina, farmacéutica y sanitaria. La metodología típicamente utilizada para estudiar la diversidad funcional de endófitos se basa en el aislamiento con énfasis en las cepas de rápido crecimiento, por lo tanto, no representa la biodiversidad completa. Los procedimientos tales como la electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE), el polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) o la clonación y secuenciación directa se utilizan para analizar la diversidad de comunidades fúngicas no cultivables en las plantas, pero tales procedimientos no son adecuados para los estudios funcionales. Un problema frecuente con los endófitos es que producen metabolitos solo durante un cierto período de tiempo *in vitro* y luego se vuelven inactivos, pierden viabilidad o capacidad de producir metabolitos secundarios bioactivos. Tales problemas de cultivo en otros microbios han sido anteriormente una de las fuerzas impulsoras para el desarrollo de nuevos procedimientos para acceder a la vasta riqueza microbiana.

Los péptidos antimicrobianos (PAM) se conservan y producen evolutivamente por el sistema inmunitario innato en todos los organismos complejos. Sirven como la primera línea de defensa en humanos y mamíferos. Los PAM son polipéptidos compuestos de 10-50 aminoácidos con > 30 % de proporciones hidrófobas y carga positiva. En general, los PAM tienen una actividad antimicrobiana de amplio espectro contra las bacterias, los hongos y las levaduras.

El documento WO 2011/113999 desvela polipéptidos tripticos de endófitos de *Empetrum nigrum* y procedimientos para obtenerlos. Basándose en los análisis por simulación informática, se predice que los péptidos tienen actividad antimicrobiana.

Hay una necesidad urgente de nuevas moléculas que tengan actividad contra varios microbios patógenos. La presente invención satisface estas necesidades tal como se explica a continuación.

Sumario de la invención

La baya de cuervo (*Empetrum nigrum*) es un arbusto perenne que crece en el hemisferio norte que tradicionalmente se ha utilizado para tratar enfermedades infecciosas y se consideraba un buen candidato para tales estudios. La presente invención proporciona nuevos (poli)péptidos antimicrobianos derivados de un endófito de *E. nigrum* y variantes de los mismos que tienen actividad mejorada contra diversos microbios.

El primer aspecto de la invención es proporcionar un péptido antimicrobiano. De acuerdo con la invención, dicho polipéptido tiene características dadas en la reivindicación 1.

El segundo aspecto de la invención es un procedimiento *in vitro* de eliminación o inhibición del crecimiento de microbios. De acuerdo con la invención, dicho procedimiento comprende una etapa de tratamiento de dichos microbios con un péptido descrito en el presente documento.

El tercer aspecto de la invención es un uso del péptido descrito en el presente documento como aditivo alimentario, conservante o tensioactivo.

El cuarto aspecto de la invención es el péptido para su uso en terapia o para su uso como medicamento.

Se obtienen ventajas considerables por la invención. Se sabe que los PAM son activos contra un amplio espectro de microbios, incluyendo hongos y bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los PAM pequeños son fáciles de sintetizar y comercialmente viables ya que el costo de producción es mínimo. No se sabe que los PAM desarrollen resistencia en las bacterias. La presente invención se refiere a nuevos péptidos antimicrobianos y a su uso en diversas aplicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Un ensayo de recubrimiento de agar que muestra subclones con actividad antibacteriana (a) y subclones

sin actividad (s) hacia *S. aureus*, identificado en la biblioteca metagenómica endofítica basada en *E. coli*.

Figura 2. Secuencia de aminoácidos predicha de la proteína antibacteriana metagenómica 1 de *Empetrum nigrum*. La proteína predicha tiene 549 restos. Las secuencias de PPR altamente conservadas (repeticiones pentatricopeptídicas) están subrayadas.

Figura 3. El ensayo representativo de difusión radial (EDR) de péptidos sintetizados Met1-Met12, 100 µg cada uno, probado contra *E. coli* (A) y *S. aureus* (B) NC = control negativo, Gentamicina 10 µg.

La **Figura 4a** muestra una alineación de 25 variantes del péptido "Met10" (Cadena 100) definido por la SEQ ID NO: 4.

La **Figura 4b** muestra una alineación de 23 variantes del péptido "Met11" (Cadena 200) definido por la SEQ ID NO: 5.

La **Figura 4c** muestra una alineación de 25 variantes del péptido "Met12" (Cadena 300) definido por la SEQ ID NO: 6.

La **Figura 5a** muestra una alineación de 9 variantes del péptido "Met10" (Cadena 100) definido por la SEQ ID NO: 4.

La **Figura 5b** muestra una alineación de 10 variantes del péptido "Met11" (Cadena 200) definido por la SEQ ID NO: 5.

La **Figura 5c** muestra una alineación de 13 variantes del péptido "Met12" (Cadena 300) definido por la SEQ ID NO: 6.

Figura 6a. Ensayo de difusión radial (EDR) de las variantes peptídicas sintetizadas Cadenas 100-109, de 50 µg cada una, probado contra *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), NC = control negativo, Gentamicina 5 µg

Figura 6b. Ensayo de difusión radial (EDR) de las variantes peptídicas sintetizadas Cadenas 200-210, de 50 µg cada una, probado contra *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), NC = control negativo, Gentamicina 5 µg

Figura 6c. Ensayo de difusión radial (EDR) de las variantes peptídicas sintetizadas Cadenas 300-313, de 50 µg cada una, probado contra *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), NC = control negativo, Gentamicina 5 µg

Figura 7a. Ensayo de difusión radial (EDR) de las variantes de péptidos sintetizados Cadenas 109, 105, 104, 201, 204, 310, 308, 307 y 306, de 20 µg cada una, probado contra *Aspergillus flavus* (DSM 1959), NC = control negativo, Anfotericina B 20 µg.

Figura 7b. Ensayo de difusión radial (EDR) de las variantes de péptidos sintetizados Cadenas 109, 105, 104, 201, 204, 310, 308, 307 y 306, de 20 µg cada una, probado contra *Penicillium chrysogenum* (DSM 1075), NC = control negativo, Anfotericina B 20 µg.

Figura 8a. La termoestabilidad de los péptidos de cadena 104 (A-D) y 105 (E-H) probados a varias temperaturas durante un período de 14 días por ensayo de difusión radial. La actividad antibacteriana se probó alicuotando 20 µg de péptidos incubados a diferentes temperaturas y la actividad se midió por zona de inhibición. Los péptidos a -20 °C sirvieron como control.

Figura 8b. La termoestabilidad de los péptidos de cadena 201 (A-D) y 204 (E-H) probados a varias temperaturas durante un período de 14 días por ensayo de difusión radial. La actividad antibacteriana se probó alicuotando 20 µg de péptidos incubados a diferentes temperaturas y la actividad se midió por zona de inhibición. Los péptidos a -20 °C sirvieron como control.

Figura 8c. La termoestabilidad de los péptidos de cadena 306 (A-D) y 308 (E-H) probados a varias temperaturas durante un período de 14 días por ensayo de difusión radial. La actividad antibacteriana se probó alicuotando 20 µg de péptidos incubados a diferentes temperaturas y la actividad se midió por zona de inhibición. Los péptidos a -20 °C sirvieron como control.

Figura 9a. La estabilidad del pH de los péptidos de cadena 104 y 105 se determinó por ensayo de difusión radial (EDR). Se utilizó un pH diferente que oscilaba entre 4 y 9 para verificar la zona de inhibición.

Figura 9b. La estabilidad del pH de los péptidos de cadena 201 y 204 se determinó por ensayo de difusión radial (EDR). Se utilizó un pH diferente que oscilaba entre 4 y 9 para verificar la zona de inhibición.

Figura 9c. La estabilidad del pH de los péptidos de cadena 306 y 308 se determinó por ensayo de difusión radial

(EDR). Se utilizó un pH diferente que oscilaba entre 4 y 9 para verificar la zona de inhibición.

Figura 10c. Actividad antimicrobiana de espectro estrecho del péptido de cadena 306.

Figura 11a. Imagen de microscopía electrónica de transmisión (MET) de *E. coli* (A-C) y *S. aureus* (D-G) expuesto a 10 µg/ml de cadena 105 a 37 °C durante 1 h. Control (A y D); Tratado con la cadena 105 (B-C y E-G).

5 **Figura 11b.** Imagen de microscopía electrónica de transmisión (MET) de *E. coli* (A-C) y *S. aureus* (D-F) expuesto a 10 mg/ml de cadena 201 a 37 °C durante 1 h. Control (A y D); Tratado con la cadena 201 (B-C y E-F).

Figura 11c. Imagen de microscopía electrónica de transmisión (MET) de *E. coli* (A-C) y *S. aureus* (D-F) expuesto a 10 µg/ml de cadena 308 a 37 °C durante 1 h. Control (A y D); Tratado con la cadena 308 (B-C y E-F).

10 **Figura 12.** Actividad antibacteriana de los catéteres inmovilizados de las cadenas 105 y 201. Se usaron catéteres de silicio como controles.

Descripción detallada

Los endófitos, microorganismos que pasan todo su ciclo de vida, o partes de él, dentro de tejidos sanos de una planta hospedadora, se encuentran en todas las especies de plantas. Mientras que la mayoría de los endófitos no se pueden cultivar, no es sorprendente que una estructura química aislada de una planta pueda tener un origen microbiano. La metagenómica proporciona una herramienta valiosa para acceder a los recursos de compuestos bioactivos obtenidos de microorganismos no cultivables.

En el presente estudio, los presentes inventores han construido una biblioteca metagenómica a partir de endófitos y analizan la actividad antibacteriana. La biblioteca se cribó para seleccionar clones antimicrobianos usando *Staphylococcus aureus* como organismo diana por el procedimiento de agar doble capa. Se seleccionó un clon único que presenta actividad antibacteriana de la biblioteca metagenómica. Se generaron bibliotecas secundarias para obtener subclones antibacterianos con un tamaño de inserto reducido para la caracterización del gen responsable de la actividad antibacteriana.

25 La secuencia de nucleótidos del subclon se sometió a análisis BLAST contra secuencias presentes en las bases de datos de Genbank, pero no se identificó similitud con ninguna secuencia conocida. El gen aislado codificado para una proteína desvelada se encuentra en el documento WO 2011/113999 y se denomina como proteína antibacteriana metagenómica 1 de *Empetrum nigrum* (En-MAP1, número de referencia de GenBank KC466596). El análisis de la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 1) reveló que *En-MAP1* codifica una proteína de 549 aminoácidos que comparte la mayor similitud del 32 % con una proteína hipotética de *Pseudozyma hubeiensis* y sin similitud con ninguna proteína de función conocida.

30 La proteína endofítica aislada se expresó y aisló pero no se observó actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana de los péptidos digeridos por simulación informática se predijo después usando algoritmos descritos en la parte experimental. Los péptidos también se probaron para la actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli* y *Verticillium dahliae*. En pruebas preliminares, algunos de los péptidos que predijeron tener actividad antimicrobiana mostraron actividad también en pruebas *in vitro*. Los mejores candidatos se seleccionaron para estudios posteriores.

35 Los péptidos antimicrobianos interactúan con las membranas bacterianas para la eliminación eficaz a una concentración óptima. Los PAM también deben poseer biocompatibilidad, tolerancia a la sal y actividad antimicrobiana de amplio espectro. Mediante el uso de técnicas de diseño racional, los presentes inventores pudieron mejorar la actividad antimicrobiana del péptido incorporando o reemplazando varios aminoácidos. Los presentes inventores han diseñado y modificado los péptidos Met10 (Cadena 100 definida por la SEQ ID NO: 4), Met11 (Cadena 200 definida por la SEQ ID NO: 5) y Met12 (Cadena 300 definida por la SEQ ID NO: 6) con triptófano (W), arginina (R) y lisina (K) en diversas posiciones para mejorar la actividad antibacteriana.

La base de datos APD2 se utilizó para verificar la homología e identidades de los péptidos con antimicrobianos conocidos (Wang y col., 2009).

45 Los presentes inventores desvelan en el presente documento un péptido antimicrobiano o una variante del mismo que comprende la SEQ ID NO: 4 (Met 10, cadena 100), la SEQ ID NO: 5 (Met11, cadena 200), la SEQ ID NO: 6 (Met12, cadena 300), o que tiene al menos un 37 % de identidad con la SEQ ID NO: la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6. Sorprendentemente, se ha descubierto que los fragmentos relativamente pequeños pueden tener la actividad deseada.

50 Según la divulgación, el péptido o una variante del mismo comprende cualquiera de la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6 o un péptido que tiene al menos el 40 %, preferentemente, al menos el 50 %, el 60 %, el 70 % de identidad con cualquiera de dichas secuencias, más preferentemente al menos el 80 % de identidad con cualquiera de dichas secuencias y lo más preferentemente el 90 % o incluso el 95 % de identidad con dicha SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.

A este respecto, el término "identidad" se refiere a la identidad global entre dos secuencias de aminoácidos

comparadas entre sí desde el primer aminoácido hasta el último aminoácido correspondiente. Por lo tanto, un fragmento solo se puede comparar con los respectivos aminoácidos (esencialmente el mismo número de aminoácidos) del (poli)péptido maduro.

5 De acuerdo con la divulgación, el péptido que comprende cualquiera de la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 6 se modifica para aumentar la actividad antimicrobiana.

Según un ejemplo, el péptido se modifica con una o más sustituciones de W, R, K, L, C, I, F y A, más preferentemente, con una o más sustituciones de W, R y A. Estas sustituciones aumentan la interacción con las membranas microbianas y, por lo tanto, mejoran la actividad antimicrobiana.

10 En un ejemplo, el péptido definido por la SEQ ID NO: 4 (cadena 100) comprende una o más, preferentemente, cinco, seis o incluso siete sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en V16K/I/W/R; Q15R/I/W/I/F/C; N14L/K/R/W; /W; A11W; M6W y I7W.

Preferentemente, los restos de los aminoácidos R8, L9 y H10 de la SEQ ID NO: 4 no se modifican.

Según un ejemplo, el péptido comprende una o más sustituciones o deleciones en la SEQ ID NO: 4 (cadena 100) seleccionada del grupo que consisten en

- 15 a. D1-/R
- b. C2-/K
- c. W3-
- d. S4-/R
- e. A5-
- 20 f. M6W
- g. I7W
- h. A11W
- i. Y13W/R
- j. N14L/K
- 25 k. Q15R/I
- l. V16K/W

en las que "-" indica la delección del aminoácido.

30 De acuerdo con la divulgación, el péptido en comparación con el péptido original definido por la SEQ ID NO: 4 (cadena 100), tiene de 1 a 5, preferentemente se han delecionado 5 aminoácidos N-terminales. Se ha descubierto que los péptidos más cortos pueden mantener su actividad antimicrobiana. Además, los péptidos más cortos dan como resultado un menor coste de síntesis.

En otro ejemplo, la variante peptídica de la SEQ ID NO: 4 con delección en N-terminal comprende además uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o todas las modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en V16K/W; Q15R/I; N14UK; Y13R/W; A11W; I7W y M6W.

35 Según un ejemplo, el péptido definido por la SEQ ID NO: 5 se modifica con una sustitución o más de W, R, K, F, I y L, más preferentemente, con una sustitución o más de W, K y R. Estas sustituciones aumentan la interacción con las membranas microbianas y, por lo tanto, mejoran la actividad antimicrobiana.

40 En un ejemplo, el péptido definido por la SEQ ID NO: 5 (cadena 200) comprende una o más, preferentemente al menos seis, siete, ocho, nueve o incluso 10 sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en N1 R/K/W, R2W, I3L, V4/I/I, Q5W/K/R, Q6R/I/W, R7W, T8R/W/F, S9F/W/R/I y S10K/I.

Como alternativa o además, el péptido definido por la SEQ ID NO: 5 se puede modificar mediante la adición en C-terminal de K (por ejemplo, la cadena 207 definida por la SEQ ID NO: 15)

En un ejemplo, el resto de aminoácido R11 del péptido definido por la SEQ ID NO: 5 no se modifica.

45 Según un ejemplo, el péptido comprende una o más sustituciones o deleciones en la SEQ ID NO: 5 (cadena 200) seleccionada del grupo que consisten en

- a. N1K/R/W
- b. R2W
- c. I3L
- d. V4/I/I
- 50 e. Q5W/K/R
- f. Q6R/I/W
- g. R7W/R
- h. T8R/W/F/K
- i. S9F/W/R/I

j. S10K/I

Según un ejemplo, el péptido definido por la SEQ ID NO: 6 se modifica con una sustitución o más de W, R, K, L e I, más preferentemente, con una sustitución o más de W y R. Estas sustituciones aumentan la interacción con las membranas microbianas y, por lo tanto, mejoran la actividad antimicrobiana.

- 5 En un ejemplo, el péptido definido por la SEQ ID NO: 6 (cadena 300) comprende una o más, preferentemente cuatro, cinco, seis, siete, ocho o incluso nueve sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en Y1I/R/W/K, D2I/I/W/R, G4R/W, F5W/R, G6R/W/I, F8R, K9R, K10R y M11L/R/W/K.

Preferentemente, los restos de aminoácidos K3 y L7 del péptido definido por la SEQ ID NO: 6 no se modifican.

- 10 Como alternativa o adicionalmente, el péptido definido por la SEQ ID NO: 6 se puede modificar mediante la adición de K entre los restos de aminoácidos 9 y 10 (por ejemplo, la cadena 313 definida por la SEQ ID NO: 32).

Según un ejemplo, el péptido comprende una o más sustituciones o deleciones en la SEQ ID NO: 6 (cadena 300) seleccionada del grupo que consisten en

- 15 a. Y1I/R/W/K
b. D2I/I/W/R
d. G4R/W
e. F5W/R
f. G6R/W/I
h. F8R
i. K9R
20 j. K10R
k. M11L/R/W/K.

En un ejemplo, el péptido o una variante del mismo comprende una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 4 (cadena 100) o una de las SEQ ID NO 7 a 31 (cadenas 101 a 125) o consiste en ella.

- 25 En un ejemplo, la variante peptídica (péptido) comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 7 a 15 (cadenas 101 a 109) o consiste en ella. En un ejemplo, la variante peptídica comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 10 a 15 (cadenas 104 a 109) o consiste en ella. En un ejemplo, la variante peptídica comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 10, 11 y 15 (cadenas 104, 105 y 109) o consiste en ella.

En un ejemplo, el péptido comprende la SEQ ID NO: 4 (cadena 100). En un ejemplo, el péptido consiste en la SEQ ID NO: 4 (cadena 100).

- 30 En un ejemplo, el péptido o una variante del mismo comprende una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 5 (cadena 200) o una de las SEQ ID NO 32 a 54 (cadenas 201 a 223) o consiste en ella.

En un ejemplo, la variante peptídica comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 32 a 41 (cadenas 201 a 210) o consiste en ella. En un ejemplo, la variante peptídica comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 32, 34, 35 y 39 (cadenas 201, 203, 204 o 208) o consiste en ellas.

- 35 En un ejemplo, el péptido comprende la SEQ ID NO: 5 (cadena 200). En un ejemplo, el péptido consiste en la SEQ ID NO: 5 (cadena 200).

En un ejemplo, el péptido o una variante del mismo comprende una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 6 (cadena 300) o una de las SEQ ID NO 55 a 79 (cadenas 301 a 325) o consiste en ella.

- 40 En un ejemplo, la variante peptídica comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 55 a 67 (cadenas 301 a 313) o consiste en ella. En un ejemplo, la variante peptídica comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 55, 58, 59 y 61 a 65 (cadenas 301, 304, 305 o 307 a 311) o consiste en ellas.

En un ejemplo, la variante peptídica comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 61 y 62 (cadenas 307 y 308) o consiste en ellas.

- 45 En un ejemplo, el péptido comprende la SEQ ID NO: 6 (cadena 300). En un ejemplo, el péptido consiste en la SEQ ID NO: 6 (cadena 300).

Es evidente que los péptidos y sus variantes tienen diferentes actividades antimicrobianas contra diferentes microbios. En el presente estudio se probó la actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos.

- 50 La actividad antibacteriana de péptidos seleccionados (variantes de péptidos) se probó contra *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Se usó un ensayo de difusión radial y una concentración inhibitoria mínima para determinar la actividad antibacteriana, en el que se usó el ensayo de difusión radial para evaluar la actividad antifúngica de las variantes

peptídicas.

La actividad antifúngica se probó contra *Aspergillus flavus* (DSM 1959) y *Penicillium chrysogenum* (DSM 1075).

En un ejemplo, el péptido o un fragmento del mismo se sintetiza químicamente (péptido sintético). En otro ejemplo, el péptido se ha producido de forma recombinante. En un ejemplo, el péptido o los péptidos se aíslan del medio de crecimiento de producción de péptido recombinante o medio de síntesis.

En un ejemplo, el péptido antimicrobiano está unido a una superficie de un dispositivo médico, paquete de comida, sustancia de vehículo o, por ejemplo, biosensor, opcionalmente usando un péptido enlazador. Como alternativa, o adicionalmente, en otro ejemplo, el péptido está unido a agentes detectables tales como, por ejemplo, agente fluorescente o un sustrato enzimático, por ejemplo, cuando se usa el péptido antimicrobiano en biosensores. En un ejemplo, dichos péptidos están inmovilizados en silicio, polietileno y otros materiales para ser utilizados como medicamentos o agentes de recubrimiento.

En los ensayos de hemólisis, se midió la capacidad de los péptidos a una concentración de 128 µg/ml para lisar los eritrocitos humanos para liberar hemoglobina. Los péptidos descritos en el presente documento preferentemente tienen baja actividad hemolítica (0,2 al 3,8 % de hemólisis) en el cuerpo de los mamíferos. La concentración hemolítica probada (128 µg/ml) es más de 50 veces la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las cadenas 105, 201 y 308 y la hemólisis es insignificante al 0,2-0,5 %, respectivamente. Estos péptidos son útiles como medicamentos antimicrobianos ya que muestran pocos o ningún efecto secundario a las concentraciones necesarias para matar las bacterias.

Por ejemplo, el péptido o una variante del mismo presenta una actividad contra los microorganismos, en particular contra bacterias gram positivas y gram negativas, en particular contra las familias *Staphylococcaceae* y *Enterobacteriaceae*. En un ejemplo, el péptido presenta una actividad contra levaduras y/u hongos.

En un ejemplo, el péptido o una variante del mismo presenta una actividad contra las bacterias. En un ejemplo, el péptido o una variante del mismo presenta una actividad contra los hongos. En un ejemplo, el péptido o una variante del mismo presenta una actividad contra las bacterias y los hongos. La actividad contra bacterias y/u hongos puede ser, por ejemplo, la supresión de la multiplicación o el crecimiento de dichos microbios o su destrucción.

En un ejemplo, el péptido o una variante del mismo presenta una actividad contra las bacterias gram positivas, en particular microorganismos de la familia *Staphylococcaceae*, en particular contra microorganismos de la especie *S. aureus*.

Los péptidos que comprenden esencialmente cualquiera de las SEQ ID NO: 10 a 15 (cadenas 104 a 109), las SEQ ID NO: 32, 34 a 36, 39 a 41 (cadenas 201, 203 a 205, 208 a 210) y las SEQ ID NO: 55 a 65 y 67 (cadenas 301 a 311 y 313) son particularmente activos contra *Staphylococcaceae*, en particular, *S. aureus*. *S. aureus* ha desarrollado resistencia a la mayoría de los antibióticos disponibles comercialmente. Los péptidos antimicrobianos tal como los describen los presentes inventores en el presente documento, son una clase prometedora de nuevos antibióticos, ya que no inducen resistencia en microorganismos.

En un ejemplo, el péptido presenta una actividad contra bacterias gram negativas, en particular contra *E. coli*. Los péptidos que comprenden esencialmente cualquiera de las SEQ ID NO: 10 a 15 (cadenas 104 a 109), las SEQ ID NO: 32, 34 a 36, 39 a 41 (cadenas 201, 203 a 206, 208 a 210) y las SEQ ID NO: 55 a 65 y 67 (cadenas 301 a 311 y 313) son particularmente activos contra *E. coli*.

En un ejemplo, el péptido presenta una actividad contra *Klebsiella*, en particular, *Klebsiella pneumoniae*. Los péptidos que comprenden esencialmente cualquiera de las SEQ ID NO: 10 a 15 (cadenas 104 a 109), las SEQ ID NO: 32, 34, 35, 39 a 41 (cadenas 201, 203, 204, 208 a 210) y las SEQ ID NO: 55, 58, 59, 61 a 65 y 67 (Cadenas 301, 304, 305, 307 a 311 a 311 y 313) son particularmente activos contra *Klebsiella*.

En un ejemplo, el péptido presenta una actividad contra *Pseudomonas*, en particular, *Pseudomonas aeruginosa*. Los péptidos que comprenden esencialmente cualquiera de las SEQ ID NO: 10 a 12 y 15 (cadenas 104 a 106, 109), las SEQ ID NO: 32, 34, 35 y 39 (Cadenas 201, 203, 204, 208) y las SEQ ID NO: 55 a 65 y 67 (cadenas 301 a 311 y 313), son particularmente activas contra *Pseudomonas*.

En un ejemplo, el péptido presenta una actividad contra *Aspergilli*, en particular, *A. flavus*. Los péptidos que comprenden esencialmente cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 11 o 15, las SEQ ID NO: 32 o 35 (Cadenas 104, 105 o 109), las SEQ ID NO: 32 o 35 (cadenas 201 o 204); las SEQ ID NO: 60, 61, 62 y 64 (cadenas 306, 307, 308 y 310) son particularmente activos contra *Aspergilli*.

En un ejemplo, el péptido presenta una actividad contra *Penicillium*, en particular, *P. chrysogenum*. Los péptidos que comprenden esencialmente cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 11 o 15, las SEQ ID NO: 32 o 35 (Cadenas 104, 105 o 109), las SEQ ID NO: 32 o 35 (cadenas 201 o 204); las SEQ ID NO: 60, 61, 62 y 64 (cadenas 306, 307, 308 y 310) son particularmente activos contra *Penicillium*.

- En un ejemplo, el péptido presenta una actividad contra cepas clínicas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *S. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *A. johnsonii*, *S. aureus*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. quillermondiae*. Los péptidos que comprenden esencialmente cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 11 o 15, las SEQ ID NO: 32 o 35 (Cadenas 104, 105 o 109), las SEQ ID NO: 32 o 35 (cadenas 201 o 204); las SEQ ID NO: 58, 60, 61, 62, 63, 64 y 65 (cadenas 304, 306, 307, 308, 309, 310 y 311).
- La cadena 104, la cadena 105, la cadena 109, la cadena 201, la cadena 204, la cadena 307, la cadena 308 y la cadena 310 son péptidos antimicrobianos de amplio espectro demostrables, activos contra bacterias gram positivas y negativas en un intervalo de 0,5 a 32 µg/ml y tiene pocos efectos secundarios para los humanos según lo probado por el ensayo de hemólisis.
- La presente divulgación también se refiere a una composición antimicrobiana que comprende un péptido o péptidos antimicrobianos descritos en el presente documento. En un ejemplo, dicha composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros ingredientes convencionales.
- El péptido con la SEQ ID NO: 4 (cadena 100), la SEQ ID NO: 5 (cadena 200), la SEQ ID NO: 6 (cadena 300) o una variante de las mismas que tiene al menos un 37 %, preferentemente, al menos el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, más preferentemente al menos el 80 % y lo más preferentemente al menos el 90 % de identidad con dicha secuencia o cualquier péptido de acuerdo con la presente divulgación para su uso en terapia, en particular, para su uso como agente antimicrobiano.
- La actividad antimicrobiana puede ser contra bacterias u hongos o bacterias y hongos. Las bacterias pueden ser bacterias Gram positivas o Gram negativas. En particular, el péptido tiene actividad contra microorganismos de los géneros *Staphylococcus* o *E. coli* o tanto *Staphylococcus* como *E. coli*. Se han tratado anteriormente diversas actividades antimicrobianas y propiedades hemolíticas de los péptidos.
- Un ejemplo adicional de la divulgación es el uso del péptido de acuerdo con la presente divulgación como medicamento, aditivo para piensos, conservante o tensioactivo.
- En un ejemplo, un péptido que tiene cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5 o 6 o una variante del mismo que tiene al menos un 37 %, preferentemente, al menos el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, más preferentemente al menos el 80 % y lo más preferentemente al menos el 90 % de identidad con dicha secuencia o cualquier péptido de acuerdo con la presente divulgación se usa como un medicamento, especialmente como medicamento contra los microbios contaminantes que incluyen *S. aureus* tratados anteriormente.
- La presente divulgación también se refiere a un uso del péptido (o péptidos) y se reivindican sus variantes descritas en el presente documento como un medicamento, aditivo para piensos, conservante o tensioactivo. Las toxinas producidas por diversos microorganismos contaminan los alimentos humanos y los piensos para animales, y estos péptidos utilizados como conservantes pueden reducir el crecimiento de los contaminantes. Las actividades y otras propiedades de los péptidos se han tratado anteriormente en relación con otros ejemplos.
- Los péptidos de la cadena 104, la cadena 105, la cadena 109, la cadena 201, la cadena 204, la cadena 307, la cadena 308 y la cadena 310 son péptidos antimicrobianos de amplio espectro demostrables, activos contra bacterias gram positivas y negativas en un intervalo de 0,5 a 32 µg/ml y tiene pocos efectos secundarios para los humanos según lo probado por el ensayo de hemólisis. Estos péptidos tienen un potencial para el tratamiento contra las infecciones por bacterias Gram negativas causadas por *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y la Gram positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).
- La presente divulgación también se refiere a un procedimiento para destruir o inhibir el crecimiento de microbios, que comprende la etapa de tratar dichos microbios con un péptido (o péptidos) o sus variantes descritas en el presente documento. En un ejemplo, el péptido o una variante del mismo presenta una actividad contra microorganismos, en particular contra bacterias Gram positivas y/o Gram negativas, en particular contra las familias *Staphylococcaceae* y *Enterobacteriaceae*, en particular contra microorganismos de la especie *S. aureus* y/o *E. coli*. En un ejemplo, el péptido o una variante del mismo presenta una actividad contra los hongos. En otro ejemplo adicional, el péptido o una variante del mismo presenta actividad contra hongos y bacterias. Las actividades y otras propiedades de los péptidos se han tratado anteriormente en relación con otros ejemplos.
- El catéter actúa como portador de bacterias a través de la unión a la superficie y luego a la luz de la uretra. La mayoría de los catéteres están hechos de caucho de silicona en la que los microbios se adhieren fácilmente para formar biopelículas y causar infecciones. Se han desarrollado varias estrategias para superar estos problemas mediante el uso de compuestos antibióticos tales como la rifampicina y la minociclina, o un recubrimiento de plata en las superficies del catéter. Sin embargo, el uso de antibióticos pone en riesgo el desarrollo de resistencia bacteriana y la eficacia antibiótica en las aplicaciones clínicas no se conoce bien. Se descubrió que los catéteres recubiertos de plata eran ineficaces en estudios *in vitro*.
- Las infecciones del tracto urinario asociadas a catéteres (ITUAC) se pueden prevenir mediante el uso de catéteres urinarios recubiertos con péptido antimicrobiano (PAM), que también evitan la propagación de la resistencia a los antibióticos.

También debe entenderse que el péptido (o los péptidos) o sus variantes de la presente divulgación se pueden usar con diversos usos que requieren actividad antimicrobiana.

Debe entenderse que la terminología empleada en el presente documento tiene fines descriptivos y no debe considerarse como limitante.

- 5 Las características de la divulgación descritas en el presente documento como ejemplos separados también se pueden proporcionar en combinación en un solo ejemplo. También varias características de la divulgación descrita en el presente documento en el contexto de un solo ejemplo, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada. Debería entenderse, que los ejemplos dados en la descripción anterior son solo para fines ilustrativos, y que son posibles diversos cambios y modificaciones dentro del ámbito de la divulgación.

- 10 A continuación se detallará una lista de las referencias citadas.

Los siguientes ejemplos no limitativos ilustran la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento total de ADN vegetal

- 15 Las hojas frescas y jóvenes de *Empetrum nigrum* L. se esterilizaron en superficie con etanol al 70% (v/v) durante 1 minuto y en hipoclorito de sodio (3,5 % en v/v) durante 5 minutos y se usaron para el aislamiento del ADN genómico (Pirttilä y col. 2001).

Ejemplo 2: Construcción de la biblioteca metagenómica y detección de actividad antibacteriana

- 20 El ADN vegetal aislado de *E. nigrum* se disolvió en agua estéril a una concentración de 0,1 µg µl⁻¹. El ADN se sometió luego a electroforesis en gel preparativa de campo pulsado en un sistema CHEF-DR11 (Bio-Rad). Las condiciones de electroforesis (intervalos de pulso y duraciones) fueron: N/S - 60 s y E/W - 60 s durante 6 h; N/S - 90 s y E/W - 90 s durante 6 h; N/S - 99 s y E/W - 99 s durante 6 h, respectivamente, con un voltaje de 6 V/cm, un ángulo fijo de 120 ° y usando un tampón Tris-borato-EDTA (TBE) a 0,15X. Durante la electroforesis, la temperatura se mantuvo a 10 °C. Después de la electroforesis, se cortó una tira de cada lado del gel y se tiñó con bromuro de etidio para visualizar el ADN. El ADN de alto peso molecular se extirpó de la parte restante no teñida del gel y se eluyó por electrodo durante 25 1 hora a 100 V en una bolsa de diálisis que contenía TBE a 0,5X. La amplificación por cebadores específicos para hongos y bacterias se realizó como anteriormente (Koskimäki y col. 2010, Tejesvi y col. 2010) para confirmar la separación del ADN microbiano. Para la clonación, el ADN de aproximadamente 25-30 kb se reparó en sus extremos para producir ADN fosforilado en 5' y se ligó al vector pCC1FOS[™] desfosforilado de extremos romos. La mezcla de ligadura se empaquetó en fagos lambda usando los extractos de empaquetamiento MaxPlax Lambda Packaging Extracts (Epicenter). La biblioteca empaquetada se transdujo a *E. coli* EPI-300, y los transformantes se seleccionaron en placas de agar LB suplementadas con cloranfenicol. La biblioteca empaquetada de fásmid se almacenó en criotubos como agrupaciones de clones que contenían aproximadamente 10³ clones por grupo hasta el cribado.

- 35 El cribado de la biblioteca de fásmid se realizó de la siguiente manera: los grupos de clones se descongelaron y se extendieron sobre placas de agar LB de 150 mm suplementadas con cloranfenicol para obtener ~ 1000 colonias por placa. Las placas de la biblioteca se incubaron durante la noche a 30 °C seguido de incubación a temperatura ambiente (TA) durante 3-5 días adicionales. Las placas se cubrieron con agar superior que contenía un crecimiento exponencial de *Staphylococcus aureus* y se incubaron durante la noche a 37 °C, seguido de una incubación adicional a temperatura ambiente durante 3-5 días. Las colonias con actividad antibacteriana se identificaron mediante una zona de inhibición de crecimiento de *S. aureus*. Dichas colonias se recogieron a través del agar superior y se separaron de la cepa de 40 ensayo sensible al cloranfenicol (*S. aureus*) haciendo estrías en placas con LB que contienen ampicilina y cloranfenicol. El análisis de restricción del clon de fásmid antibacteriano seleccionado se realizó por digestión con *Bam*HI y electroforesis.

Ejemplo 3: Cepas, plásmidos y condiciones de crecimiento

- 45 Los cultivos de *E. coli* resistente al fago EPI-300[™]-T1^R T1 se cultivaron a 37 °C en agar Luria-Bertani (LB) o en caldo LB + MgSO₄ 10 mM suplementado con los antibióticos apropiados. Las siguientes concentraciones de antibióticos se utilizaron para la cepa de *E. coli*: 12,5 µg ml⁻¹ de cloranfenicol y 100 µg ml⁻¹ de ampicilina. El plásmido pCCIFOS[™] (Epicentre, Madison, EE.UU.) que tiene dos orígenes de replicación, un origen de copia única (*ori2*) y un origen inducible de copia alta (*oriV*) se utilizó para construir la biblioteca metagenómica a partir de endófitos de *Empetrum nigrum* y para subclonar los genes que confieren dicha actividad antibacteriana. El vector pET11-c se usó para 50 expresar los genes responsables de la actividad antibacteriana en la cepa hospedadora de *E. coli* BL21 (DE3) gold.

Ejemplo 4: Subclonación y secuenciación del clon pFosS1A

El clon de fásmid antibacteriano seleccionado del ensayo de recubrimiento de agar se denominó pFosS1. El fásmid metagenómico se aisló usando el kit Plasmid Midiprep (Qiagen) y se sometió a digestión parcial con *Sau*3AI (0,1 U µl⁻¹ de ADN, 37 °C durante 15 min) y electroforesis para la selección del tamaño del ADN y la subclonación. Se extrajeron

fragmentos del gel de más de 1,5 kb, se repararon sus extremos y se ligaron en pCC1FOS[™] desfosforilado de extremos romos. La mezcla de ligadura se transformó en *E. coli* y los clones recombinantes se seleccionaron mediante el ensayo de recubrimiento de agar y se extendieron sobre placas LB suplementadas con cloranfenicol. Los subclones que muestran zonas claras de inhibición de *S. aureus* se analizaron por electroforesis en gel después de la digestión con *Bam*HI para seleccionar el subclon que alberga el inserto más pequeño de ~ 1,8 kb. Este subclon se denominó pFosS1A y se secuenciaron con los cebadores pCC1 directos y pCC1 inversos de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Analizador de ADN Abi 3730, kit Abi Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing, Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). El marco de lectura abierto contenido dentro del subclon pFosS1A fue nombrado *En-MAP1* y analizado por el programa BLAST de Genbank, así como SignalP y pfam.

Ejemplo 5. Construcción y cribado de la biblioteca metagenómica

La banda correspondiente al ADN endófito se separó del ADN genómico de *Empetrum nigrum*, que permaneció en los pocillos del gel de agarosa después de la electroforesis PFGE. La presencia de ADN endófito en la banda se confirmó mediante la amplificación de productos de PCR con cebadores específicos para hongos y bacterias. Se obtuvieron aproximadamente 8.000 clones metagenómicos de 20 µg de ADN. El cribado de la biblioteca metagenómica mediante el procedimiento de superposición de agar dio como resultado la identificación de un clon antibacteriano que presenta una zona de inhibición para *S. aureus*. Sin embargo, no se observó la inhibición del crecimiento del hospedador *E. coli*. El análisis de fragmentos de restricción reveló que el clon portaba un inserto de ADN de más de 30 kb de tamaño. Se generó una biblioteca secundaria a partir del clon antibacteriano para seleccionar subclones antibacterianos y caracterizar los genes individuales responsables de la actividad antibacteriana. El análisis de fragmentos de restricción de subclones antibacterianos identificó el inserto más pequeño de 1,8 kb en el subclon pFosS1A, que todavía presentaba inhibición del crecimiento de *S. aureus* en el ensayo de recubrimiento de agar (Fig. 1).

Ejemplo 6: Fraccionamiento y análisis del sobrenadante del clon

Las células de *E. coli* que portaban el subclon pFosS1A y el control (vector vacío) se cultivaron durante la noche a 37 °C en caldo LB que contenía cloranfenicol. Estos cultivos se usaron como inóculos para el procedimiento de amplificación del número de copias. Se añadió un volumen de estos cultivos a 10 volúmenes de LB fresco + cloranfenicol y se añadió 1/100 de solución de inducción CopyControl (Epicentre) a los medios para inducir clones a un número alto de copias. Después de agitar vigorosamente los cultivos a 37 °C durante 20 h, el sobrenadante se separó de las células bacterianas por centrifugación durante 20 minutos a 3040 x g a 4 °C. El sobrenadante se liofilizó con un liofilizador Heto PowerDry LL1500 (ThermoElectron, Mukarov, República Checa). Se pesó el caldo liofilizado y se disolvieron 50 mg en 2 ml de agua destilada. El material se mantuvo en ultrasonidos durante 20 minutos, se centrifugó durante 10 minutos, se filtró (GHP Bulk Acrodisc 13, Pall Life Sciences) y se fraccionó por cromatografía líquida de alta presión semi preparativa (HPLC). Las fracciones se probaron para determinar la actividad antibacteriana mediante el procedimiento estándar de placa de 96 pocillos utilizando *S. aureus* como la cepa de prueba. Los sobrenadantes del subclon pFosS1A y el control se analizaron para detectar moléculas pequeñas por Alliance 2690 HPLC (Waters, Milford, MA, EE. UU.) combinado con espectrometría de masa de tiempo de vuelo (TOFMS) Micromass LCT (Micromass, Altrincham, Reino Unido).

Ejemplo 7. Análisis de secuencia del subclon antibacteriano

El inserto del subclon pFosS1A se secuenció por completo en ambas direcciones y contenía un marco de lectura abierto único de ~ 1650 pb. El supuesto sitio de unión al ribosoma y la secuencia promotora están presentes en la región aguas arriba -35/-10 del codón de iniciación. La secuencia de nucleótidos se sometió a análisis BLAST contra secuencias presentes en las bases de datos de Genbank, pero no se identificó similitud con ninguna secuencia conocida. Esto sugirió que el gen aislado codificaba una proteína de estructura nueva y, por lo tanto, la proteína se llamó proteína antibacteriana metagenómica 1 de *Empetrum nigrum* (*En-MAP1*). El análisis de la secuencia de aminoácidos deducida reveló que *En-MAP1* codifica una proteína de 549 aminoácidos (Fig. 2), que comparte la mayor similitud del 32 % con una proteína hipotética de *Pseudozyma hubeiensis* y sin similitud con ninguna proteína de función conocida. El análisis de SignalP indicó que la secuencia de aminoácidos de *En-MAP1* no tenía supuestas secuencias señal amino-terminal para secreción o translocación. Cuando se analizó la secuencia de aminoácidos deducida en busca de motivos conservados utilizando la base de datos de la familia de proteínas pfam, se identificaron tres motivos de repetición del pentatricopéptido en las posiciones 77 a 107, 126 a 153 y 392 a 420 aa (Fig. 2). Se predijo que *En-MAP1* era una proteína soluble que no tenía una región transmembrana analizada por TMpred y PSORT. Los restos 147-176 también consistieron en una región de hélice superenrollada predicha, lo cual es típico para las proteínas involucradas en las interacciones proteína-proteína, y una posible cremallera de leucina que comienza en el resto 490, analizado por PSORT.

Ejemplo 8: Expresión de proteínas en pET23(b)

El gen *En-MAP1* se amplificó usando cebadores con sitios de restricción Nde1 y Sal1 pFosS1F (CATATGAGACTAGTAGCTCATCCTGTTCTGATGC; SEQ ID NO: 2) y pFosS1R (GTCGACTTATTAACGAGATGACGTCCTCTGCTGTACG; SEQ ID NO: 3). Los productos de amplificación se clonaron en vectores pET23 (b), se transformaron en células competentes XL1, y la identidad del gen se confirmó por

secuenciación. Los estudios de expresión se realizaron utilizando las cepas de *E. coli* BL21 pLysS y BL21 pRARE como hospedadores. La proteína se expresó en ambas cepas como cuerpos de inclusión, que fueron aislados (van Lith y col. 2007). Los cuerpos de inclusión se suspendieron en clorhidrato de guanidina 5 M / tampón de fosfato de sodio 0,2 M (pH 7,0) y la proteína se replegó en la columna HisTrap (GE Healthcare Life Sciences) usando un intercambio de tampón lineal de guanidina 3 M / fosfato de sodio 0,2 M (pH 7,0) a fosfato de sodio 0,2 M (pH 7,0) durante 4 h en FPLC AKTA, y finalmente se eluyó con EDTA 50 mM / tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0). La secuencia de nucleótidos de *En-MAP1* se ha depositado en el GenBank con el número de referencia KC466596.

Ejemplo 9: Análisis de la actividad antibacteriana de la proteína

Tanto las proteínas plegadas como las desplegadas se analizaron para determinar la actividad antibacteriana contra *S. aureus* pipeteando 10 µg de proteína en el cultivo de *S. aureus* en una placa LB. La actividad también se probó en proteínas plegadas y desplegadas digeridas con tripsina en ácido acético al 0,01 % a concentraciones de 30 y 60 µg/ml.

Ejemplo 10: Predicción de péptidos antimicrobianos y síntesis de péptidos

La proteína En-MAP1 se digirió con tripsina por simulación informática (<http://au.expasy.org>) y se pronosticó que 12 péptidos (Met1-Met12) (<http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial>) son antimicrobianos mediante tres algoritmos diferentes (clasificador Support Vector Machine (SVM), Clasificador Random Forest y Clasificador de Análisis Discriminante) y por APD2 (http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php). Los péptidos sintetizados se encargaron de GenScript, EE.UU.

Ejemplo 11: Actividad antimicrobiana de péptidos sintetizados

El ensayo de difusión radial (EDR) se realizó según lo descrito por Andersen y col. (2010). Brevemente, se vertieron 30 ml de caldo 1/10 Muller-Hinton (MHB) suplementado con agarosa al 1 % y $5,0 \times 10^5$ UFC/ml de células de *S. aureus* o *E. coli* o *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* en un omnitray de un solo pocillo (Nunc) y se superpusieron con una placa TSP de 96 pocillos. Se probaron cien µg de cada péptido sintetizado. Los péptidos también se probaron contra *Fusarium oxysporum* y *Verticillium dahliae*, para lo cual se usó 1/3 de dextrosa agarosa de patata. Para probar el efecto sinérgico de los péptidos, cada péptido se mezcló en concentraciones equimolares. La Mezcla 1 (met1-12), Mezcla 2 (met3, 4 y 5), Mezcla 3 (met 8, 9 y 10), Mezcla 4 (met11, 12) y Mezcla 5 (8, 9, 10, 11, 12) se prepararon y se probaron contra *E. coli* y *S. aureus*. La gentamicina y la vancomicina se incluyeron como controles positivos para bacterias y la anfotericina B se usó como control para hongos.

Las concentraciones mínimas de inhibición (CMI) se determinaron contra *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Para los ensayos de CMI también se usaron *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *S. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *A. johnsonii* y *S. aureus*. Además, se usaron las cepas clínicas de levadura que incluyen *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. quilliermondiae*. La susceptibilidad de estos microorganismos a los péptidos en cadena se determinó usando un ensayo de dilución de micro caldo. Las colonias del microorganismo respectivo de las placas de agar Muller Hinton (MH) incubadas durante la noche se suspendieron en medio de caldo MH y la concentración final de microorganismo se ajustó a $5,0 \times 10^5$ ufc/ml. Se añadió una alícuota de 10 µl de cada péptido de cadena, o gentamicina, tetraciclina como antibióticos de referencia en diferentes concentraciones junto con 90 µl de suspensión bacteriana a placas de polipropileno de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C durante 20 a 24 horas. Las concentraciones de péptidos de cadena y antibióticos de referencia variaron de 0,125 a 128 µg/ml y las CMI se registraron como la concentración más baja sin crecimiento visual de bacterias. De forma similar, se probaron CMI antifúngicos en caldo de dextrosa de patata.

Ejemplo 12: Análisis de expresión del clon antibacteriano

El subclon que expresa pFosS1A se analizó por HPLC-MS para la posible producción de pequeñas moléculas antimicrobianas en el medio líquido y se comparó con el control (vector vacío). Los cromatogramas y los espectros de los picos para el clon antibacteriano y el control fueron idénticos. El medio se fraccionó y se probó la actividad antibacteriana contra *S. aureus*, pero no se detectó actividad. Esto sugirió que la actividad antibacteriana contra *S. aureus* no era de un metabolito generado por actividad de *En-MAP1*.

El gen *En-MAP1* se clonó después en el plásmido de expresión pET23 (b) para analizar si la actividad antibacteriana se debía a la propia proteína. La construcción resultante pET23(b)-FosS1A contenía el gen *En-MAP1* en marco. Cuando se transformó en la cepa de expresión de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS y BL21 (DE3) pRARE, se produjo una proteína de aproximadamente 63 kDa (masa predicha de 63,3 kDa) en los extractos celulares de cultivos inducidos, pero no en los cultivos no inducidos. La proteína resultante incluye la secuencia de aminoácidos MHHHHHHM antes del primer aminoácido de la secuencia de proteínas. La proteína se expresó en ambas cepas como cuerpos de inclusión y se purificaron y plegaron en una columna His-Trap, resultando en aproximadamente ~ 1 mg de proteína plegada pura. La proteína plegada se probó para la actividad antibacteriana contra *S. aureus* y no se observó actividad. Para probar si un fragmento más corto fue responsable de la actividad antibacteriana debido a sitios de inicio de traducción alternativos, se diseñaron y expresaron tres construcciones que codifican fragmentos más cortos de *En-MAP1*, pero no se observó actividad. Sin embargo, cuando la proteína de *En-MAP1* completamente plegada (SEQ ID

NO: 1) se digirió con tripsina, se observó actividad antibacteriana durante hasta dos horas después de la digestión (datos no mostrados). No se detectó actividad en la digestión de tripsina de la proteína desplegada. Esto sugirió que la actividad antimicrobiana fue resultado de la fragmentación de la proteína, produciendo un péptido, que contenía un sitio interno de escisión de tripsina que estaba protegido por la estructura plegada.

- 5 Para identificar aún más el péptido responsable de la actividad antimicrobiana, la proteína *En-MAP1* se digirió por simulación informática, y se sintetizaron los péptidos, que se predijo que serían antimicrobianos. Los sitios de escisión para varias enzimas de restricción, proteasas y compuestos químicos, tales como la ArgC proteinasa, Asp-N endopeptidasa (EC 3.4.24.33), quimotripsina-HS30 (EC 3.4.21.1), clostripaina, CNBr (EC 208-051-2), ácido fórmico, Lys-C, ácido iodosobenzoico, prolina endopeptidasa y tripsina se incluyeron en el análisis por simulación informática.
- 10 Las actividades antimicrobianas de los fragmentos de péptidos se predijeron utilizando cuatro algoritmos diferentes (clasificador Support Vector Machine (SVM), Clasificador Random Forest, Clasificador de análisis discriminante y APD2).

- 15 La mayoría de estos péptidos provenían de predicciones de digestión trípica, mientras que tres péptidos (mostrados como Met10, Met11 y Met12 en la Figura 3 y la Cadena 100 definidos por la SEQ ID NO: 4, Cadena 200 definida por la SEQ ID NO: 5 y Cadena 300 definida por la SEQ ID NO: 6, respectivamente en tablas (1, 2a, 2b, 2c, 3a, 3b y 3c) y el listado de secuencias) fueron resultado de digestiones de Asp-N-endopeptidasa16, quimotripsina-HS30 y CnBr, respectivamente. Ocho de estos péptidos contenían un sitio interno de escisión de tripsina.

Ejemplo 13: Sales, pH y estabilidad térmica

- 20 La estabilidad térmica se evaluó diluyendo péptidos a la concentración de 2 mg/ml en tampón PBS (pH 7,4) e incubando a diferentes temperaturas, tales como +4 °C, 25 °C (TA), 37 °C y 45 °C, los péptidos almacenados a -20 °C se usaron como control. Después de cada intervalo de tiempo, se tomaron 100 µl (2 mg/ml) de péptidos y se almacenaron a -20 °C para el ensayo de difusión radial para determinar la actividad antibacteriana (Figura 8). Los péptidos también se probaron diluyéndolos a diferentes valores de pH a partir de pH 4 a 9. El efecto del NaCl sobre la actividad antimicrobiana se probó añadiendo diferentes concentraciones (50, 100 y 200 mM) de NaCl al medio MH y
- 25 las concentraciones mínimas inhibitorias se probaron contra 4 cepas bacterianas ATCC.

Ejemplo 15: Adhesión bacteriana en catéteres de silicio recubiertos y no recubiertos.

- Los catéteres de silicio recubiertos (Cadena 105 o Cadena 201) y no recubiertos se cortaron en trozos de 0,5 cm y se colocaron en placas de 24 pocillos suspendidas con 1 ml de 5×10^5 UFC/ml de cultivo bacteriano (*E. coli* y *S. aureus*) en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las muestras se incubaron a 37 °C durante 6 h a 150 RPM. Después
- 30 de la incubación, cada pieza del catéter se enjuagó con 1 ml de PBS por 2 veces usando PBS nuevo. Las piezas del catéter se transfirieron a tubos Eppendorf y se añadieron 500 µl de PBS, se sometieron a ultrasonidos en baño de agua durante 2 minutos, se agitaron durante 5 segundos, se diluyeron en serie, y se determinaron las UFC.

Ejemplo 14: Preparación de células para microscopía electrónica de transmisión (MET)

- 35 *E. coli* y *S. aureus* se cultivaron hasta la fase exponencial media y se diluyeron en medio de caldo Muller Hinton (MHB) hasta una densidad celular de 0,1 tomando absorbancia a 600 nm y se incubaron a 37 °C durante 1 h con 10 µg/ml de péptidos de cadena. Después de la incubación, se añadió un volumen igual de glutaraldehído al 2 % en tampón fosfato 0,1 M y las células se sedimentaron mediante centrifugación a 5000 rpm durante 2 minutos, y el sedimento celular se fijó con glutaraldehído al 1 % en fosfato 0,1 M. Las células se fijaron posteriormente con tetróxido de osmio, se deshidrataron usando concentraciones crecientes de acetona o alcohol, y se embebieron en resina plástica (Epon).
- 40 Las secciones ultrafinas (70-80 nm) se tiñeron posteriormente con acetato de uranilo y citrato de plomo antes de la observación con MET. La microscopía se realizó con un MET Tecnai G2 Spirit 120 kV con cámaras Veleta y Quemesa CCD.

Tabla 1: Las variantes peptídicas generadas usando restos de triptófano, lisina y arginina en varios lugares y predichas por modelos estadísticos utilizando la base de datos CAMP (SVM, RF, ANN y DA).

SI.No	Nombre	Secuencia	valores de SVM ^a	valores de RF ^b	ANN ^c	valores de DA ^d	Índice alifático ^e	Índice de inestabilidad ^f	carga neta	Identidades	base de datos de CAMP ^g
4	Cadena 100	DCWSAMIRLHAKY NQV	0,156	0,4615	PAM	0,012	79	14,7	1	6/11 (54 %)	CAMPSQ4068
7	Cadena 101	KIRLHRKRLRK	0,976	0,725	PAM	0,995	106	48	7	6/11 (54 %)	CAMPSQ73
8	Cadena 102	KKRLHRKRLRK	0,997	0,6695	PAM	0,995	70	85	8	8/11 (72 %)	gi_33736048
9	Cadena 103	KLRLHAKRLRK	0,893	0,696	PAM	0,922	115	66	6	Sin éxito	nulo
10	Cadena 104	RKWRAMIRLHAKR LRK	0,989	0,7955	PAM	0,871	85	41	8	6/11 (54 %)	gi_74472293
11	Cadena 105	RKWRAMIRLHAK WLRK	0,997	0,8375	PAM	0,852	85	29	7	6/11 (54 %)	gi_67584689
12	Cadena 106	WIRLHWKRLRK	1	0,927	PAM	0,995	106	53	5	5/11 (45 %)	gi_59754113
13	Cadena 107	WWRLHAKKWLW	1	0,97	PAM	0,993	80	22,9	4	4/11 (36 %)	CAMPSQ4044
14	Cadena 108	WWRLHAKRKLW	1	0,936	PAM	0,994	80	52	4	6/11 (54 %)	CAMPSQ4044
15	Cadena 109	WWRLHAKWKWLW	1	0,9765	PAM	0,996	80	22	3	4/11 (36 %)	gi_59754171
16	Cadena 110	KLKRAMIRLHAKK RLK	0,916	0,8285	PAM	0,926	110	34	8	7/16 (44 %)	gi_75999248
17	Cadena 111	KLKRAMIRLHAKK WRW	0,996	0,869	PAM	0,816	85	54	7	Sin éxito	nulo
18	Cadena 112	RLKRAMIRLHAKK WRW	0,995	0,861	PAM	0,826	85	60	7	Sin éxito	nulo
19	Cadena 113	RWWRAMIRLHAK KWRW	1	0,8495	PAM	0,97	61	80	6	7/16 (44 %)	gi_59754035
20	Cadena 114	WWRLHAAKKIL	1	0,9625	PAM	0,991	124	19	3	5/11 (45 %)	CAMPSQ4137
21	Cadena 115	WWRLHAKKCKW	0,998	0,9205	PAM	0,97	45	30	4	4/11 (36 %)	CAMPSQ4044

(continuación)

Sl.No	Nombre	Secuencia	valores de SVM ^a	valores de RF ^b	ANN ^c	valores de DA ^d	Índice alifático ^e	Índice de inestabilidad ^f	carga neta	Identidades	base de datos de CAMP ^g
22	Cadena 116	WWRLHAKKKFW	1	0,954	PAM	0,995	45	9,09	4	4/11 (36 %)	CAMPSQ4044
23	Cadena 117	WWRLHAKKKIW	1	0,969	PAM	0,993	80	1,37	4	3/11 (27 %)	CAMPSQ4009
24	Cadena 118	WWRLHAKKKRW	1	0,9075	PAM	0,996	45	90	5	5/11 (45 %)	gi_3407608
25	Cadena 119	WWRLHAKKKWR	1	0,907	PAM	0,993	45	9	5	4/11 (35 %)	gi_59754211
26	Cadena 120	WWRLHAKKKWW	1	0,968	PAM	0,998	45	9,09	4	5/11 (45 %)	CAMPSQ4044
25	Cadena 121	WWRLHAKKLW	1	0,9585	PAM	0,995	115	7,4	3	4/11 (36 %)	CAMPSQ4044
28	Cadena 122	WWRLHAKKKRW	1	0,8155	PAM	0,997	44	120	5	5/11 (45 %)	gi_3407608
29	Cadena 123	WWRLHAKWRWR	1	0,928	PAM	0,998	44	61	4	6/11 (54 %)	gi_59754169
30	Cadena 124	WWRLHARKRWW	1	0,933	PAM	0,999	44	90	4	5/11 (45 %)	gi_3407608
31	Cadena 125	WWRLHAWKWR	1	0,936	PAM	0,998	44	61	4	7/11 (63 %)	gi_59754006
5	Cadena 200	NRIVQRTSSR	0,028	0,3175	NAMP	0,006	61	53	3	No se encontraron éxitos	nulo
32	Cadena 201	KWIVVWRWRFKR	1	0,977	PAM	0,96	61	69	5	6/11 (54 %)	gi_59754085
33	Cadena 202	RKIVKKRTFKR	0,988	0,6975	PAM	0,997	61	47	7	6/11 (54 %)	gi_33735965
34	Cadena 203	RRIVKLRFWFKR	1	0,8035	PAM	0,944	97	128	6	Sin éxito	nulo
35	Cadena 204	RRLIWRFRKWL	1	0,889	PAM	0,978	97	118	6	5/11 (45 %)	gi_59754033
36	Cadena 205	KRIVRWTRKR	0,995	0,72	PAM	0,956	61	112	7	4/11 (36 %)	gi_3407606
37	Cadena 206	KRIVRWWRKR	1	0,787	PAM	0,912	61	164	7	5/11 (45 %)	gi_59754033
38	Cadena 207	KRIVRWKLKR	0,999	0,8415	PAM	0,943	89	90	8	6/11 (54 %)	CAMPSQ3545
39	Cadena 208	WRILRWKLKR	1	0,9165	PAM	0,984	106	110	6	5/11 (45 %)	CAMPSQ3545
40	Cadena 209	WRIVRWKLKR	1	0,9055	PAM	0,971	97	67	6	6/11 (54 %)	CAMPSQ3545

(continuación)

Sl.No	Nombre	Secuencia	valores de SVM ^a	valores de RF ^b	ANN ^c	valores de DA ^d	Índice alifático ^e	Índice de inestabilidad ^f	carga neta	Identidades	base de datos de CAMP ^g
41	Cadena 210	WRIVQWRKLR	0,999	0,896	PAM	0,844	97	15	5	4/11 (36 %)	gi_59754101
42	Cadena 211	KRIVRRRTFKR	1	0,6455	PAM	0,999	61	162,35	7	6/11 (54 %)	gi_75999237
43	Cadena 212	KRWKRWRLFKR	1	0,803	PAM	0,95	35	106	7	5/11 (45 %)	gi_74472319
44	Cadena 213	NRIVLLRTFKR	0,752	0,6575	PAM	0,983	132	28	4	Sin éxito	nulo
45	Cadena 214	NRIVKKRTFKR	0,937	0,6525	PAM	0,983	132	28	4	6/11 (54 %)	CAMPSQ3535
46	Cadena 215	RKIVKRRTFKR	0,997	0,672	PAM	0,998	61	99	7	Sin éxito	nulo
47	Cadena 216	RKIVVWRTFKR	0,997	0,8025	PAM	0,963	61	20	5	4/11 (35 %)	gi_62788246
48	Cadena 217	RLIVRRRTFKR	0,999	0,678	PAM	0,998	97	132	6	Sin éxito	nulo
49	Cadena 218	RRIVRKKTFKR	0,997	0,652	PAM	0,968	61	80	7	6/11 (54 %)	gi_75999276
50	Cadena 219	RRIVWRTFKR	1	0,6675	PAM	0,977	61	132	6	4/11 (36 %)	CAMPSQ3545
51	Cadena 220	RWIVQRRRTFKR	1	0,679	PAM	0,986	61	184	6	Sin éxito	nulo
52	Cadena 221	RVIVRRRTFKR	0,999	0,6545	PAM	0,996	88	132	6	Sin éxito	nulo
53	Cadena 222	WKIVKKRTRRR	0,991	0,788	PAM	0,985	61	124	7	4/11 (36 %)	gi_74472305
54	Cadena 223	WRIVRRRTFKR	0,999	0,6965	PAM	0,989	62	132	6	4/11 (36 %)	gi_3407608
6	Cadena 300	YDKGGLFKKM	0,705	0,2515	PAM	0,11	35	31	2	Sin éxito	nulo
55	Cadena 301	IKRFRFLFKKL	0,989	0,9255	PAM	0,999	141	10	5	5/11 (45 %)	gi_115794206
56	Cadena 302	ILKRWVWLFKKL	1	0,9715	PAM	0,996	141	91	4	5/11 (45 %)	gi_59754119
57	Cadena 303	IWKRFRLFKKR	1	0,883	PAM	0,976	71	55	6	5/11 (45 %)	gi_115794207
58	Cadena 304	IWKRFRLFKKW	1	0,955	PAM	0,98	71	25	5	5/11 (45 %)	CAMPSQ754
59	Cadena 305	RLKWFVLRKLR	0,999	0,95	PAM	0,947	106	14,7	5	4/11 (36 %)	gi_59754121
60	Cadena 306	RLKRWRLFRKR	1	0,6875	PAM	0,917	70	134	7	6/11 (54 %)	gi_62788246
61	Cadena 307	RLKWFVLRFRKR	0,999	0,8795	PAM	0,946	106	60,7	6	5/11 (45 %)	gi_59754067

(continuación)

Si.No	Nombre	Secuencia	valores de SVM ^a	valores de RF ^b	ANN ^c	valores de DA ^d	Índice alifático ^e	Índice de inestabilidad ^f	carga neta	Identidades	base de datos de CAMP ^g
62	Cadena 308	RLKWLLFRKR	0,992	0,8335	PAM	0,94	106	31	5	5/11 (45 %)	gi_27291218
63	Cadena 309	WRKWFWLFKKR	1	0,9455	PAM	0,995	35,4	36,2	5	6/11 (54 %)	CAMPSQ354
64	Cadena 310	KRKWRWLFKKL	0,999	0,8745	PAM	0,944	70	28	5	6/11 (54 %)	CAMPSQ461
65	Cadena 311	KLKWFWLFKKR	0,999	0,954	PAM	0,91	70	21	5	4/11 (36 %)	gi_10064836
66	Cadena 312	KLKFKLFKKR	0,999	0,819	PAM	0,96	70	-11,5	7	8/11 (72 %)	gi_115794212
67	Cadena 313	RLKRFRLFRRK	0,999	0,722	PAM	0,994	65	56	8	5/12 (42 %)	gi_115794207
68	Cadena 314	KRKRFRLFKKR	1	0,6525	PAM	0,998	35	84	8	6/11 (54 %)	gi_115794207
69	Cadena 315	RLKRFRLFKKL	0,997	0,7565	PAM	0,982	106	9,6	6	5/11 (45 %)	gi_115794207
70	Cadena 316	RRKRFRLFKKM	0,985	0,5865	PAM	0,998	35	106	7	7/11 (63 %)	CAMPSQ114
71	Cadena 317	RRKRFRLFRRK	1	0,639	PAM	0,998	36	142	8	7/11 (63 %)	gi_112062720
72	Cadena 318	RWKRFRLFKKR	1	0,7545	PAM	0,952	35	106	7	5/11 (45 %)	gi_115794208
73	Cadena 319	RWKRFRLFKKW	1	0,8795	PAM	0,954	35	77	6	5/11 (45 %)	gi_115794208
74	Cadena 320	WKKGFGLFKKM	0,998	0,713	PAM	0,967	35	17	4	6/11 (54 %)	CAMPSQ3086
75	Cadena 321	WKKRFRLFKKL	1	0,878	PAM	0,905	70	17	6	6/11 (54 %)	CAMPSQ3086
76	Cadena 322	WLRRFRLFRR	1	0,769	PAM	0,986	106	141	5	6/11 (54 %)	gi_62788246
77	Cadena 323	RLKRFLLFRKRL	0,996	0,687	PAM	0,988	130	56	6	7/12 (58 %)	CAMPSQ2349
78	Cadena 324	KRKWFWLFKKL	0,999	0,8745	PAM	0,944	70	28	5	6/11 (54 %)	CAMPSQ461
76	Cadena 325	KLKRFRLFKKR	0,998	0,712	PAM	0,977	70	39	7	6/11 (54 %)	gi_115794210

a, SVM: support vector machines; b, RF: random forest; c, ANN: redes neuronales artificiales; d, DA: análisis discriminante; e, Índice alifático: positivamente correlacionado con la termoestabilidad; f, Índice de inestabilidad: < 40 se considera estable; g: Base de datos CAMP - <http://www.camp.bicnirrh.res.in>

La actividad antimicrobiana de los doce péptidos (Met1-Met12) se probó contra *S. aureus*, *E. coli*, y *Verticillium dahliae*. La detección inicial se realizó mediante el ensayo de difusión radial para confirmar la actividad antimicrobiana. Los péptidos Met1, Met3, Met4, Met5, Met10, Met11 y Met12 fueron activos contra *E. coli* (Fig. 3) y Met3, Met10 y Met11 presentaron actividad contra *S. aureus*, cada uno a la concentración de 100 µg/pocillo. El efecto sinérgico de los péptidos también se probó mezclando concentraciones equimolares de péptidos, pero no se observaron diferencias significativas en la actividad. Se observó actividad antifúngica moderada para Met8 contra *Verticillium dahliae* (datos no mostrados). Se realizaron ensayos de concentración inhibitoria mínima (CMI) para todas las muestras contra *E. coli* y *S. aureus*. Met11 fue activo a la concentración de 95 µM y el resto de los péptidos tenía una CMI de > 190 µM. Se predijo que todos los péptidos tenían una estructura alfa helicoidal, excepto Met12.

Mediante el uso de técnicas de diseño racional, Los presentes inventores han diseñado variantes de péptidos incorporando o reemplazando varios aminoácidos en los péptidos originales. Por lo tanto, los presentes inventores han diseñado y modificado la Cadena 100, Cadena 200 y Cadena 300 con triptófano (W), arginina (R) y lisina (K) en varias posiciones para mejorar la actividad antimicrobiana (Figuras 4a-c y 5a-c). En algunos péptidos también han usado otros aminoácidos como la leucina (L), Cisteína (C), Isoleucina (I), Fenilalanina (F) y Alanina (A). Para la síntesis, se seleccionaron 32 variantes y 3 péptidos originales en función de los diversos parámetros, tales como la carga positiva, el índice alifático e índice de inestabilidad. Las variantes de péptidos se probaron usando un ensayo de difusión radial contra *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (Figuras 6a-c). La zona de inhibición osciló entre 10-18 mm para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, 6-18 mm y 8-18 mm para *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, respectivamente (Tabla 2). Para la gentamicina estaba entre 22-24 mm. Se probó la actividad antifúngica en busca de péptidos antibacterianos prometedores (Cadenas 104, 105, 109, 201, 204, 306, 307, 308, 310) contra *Aspergillus flavus* (DSM 1959) y *Penicillium chrysogenum* (DSM 1075). Todos estos péptidos tienen actividad a una concentración de 20 µg, se usó anfotericina B como control positivo a 20 µg (Figura 7).

Las concentraciones mínimas de inhibición (CMI) se probaron mediante el procedimiento de dilución de microcaldo y las cadenas 104, 105 y 109 inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) entre 1-8 µg/ml respectivamente (Tablas 3a, 3b y 3c). Las actividades membranolíticas de los péptidos se probaron midiendo la liberación de hemoglobina de los eritrocitos de sangre fresca donados por voluntarios. Los niveles de hemoglobina se determinaron espectrométricamente tomando la DO a 540 nm siguiendo el protocolo de Schmidtchen y col., 2011. La hemólisis previa osciló entre 0,1 y 9 %, lo que indica que la mayoría de estos péptidos no tienen ningún efecto sobre el hospedador a una concentración de 128 µg/ml (Tabla 3).

Doce péptidos, la cadena 104, la cadena 105, la cadena 109, la cadena 201, la cadena 204, la cadena 304, la cadena 306, la cadena 307, la cadena 308, la cadena 309, la cadena 310 y la cadena 311 resultaron ser muy activos contra las cuatro cepas ATCC y, por lo tanto, se sintetizaron como aminoácidos en forma de D y se probaron contra cepas clínicas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *S. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *A. johnsonii* y *S. aureus*. Las cepas clínicas de levaduras que incluyen *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. quilliermondiae* también se probaron con los 12 péptidos de cadena. La concentración inhibitoria mínima (CMI) varió entre estos péptidos y se presentan en las Tablas 4a, 4b, 4c y 5a, 5b, 5c. Los péptidos de Cadena 105, 201 y 308 son antimicrobianos de amplio espectro con CMI entre 0,5-32 µg/ml contra todas las bacterias y levaduras analizadas, excepto *Serratia marcescens* y *Proteus mirabilis*, contra la cual las CMI estaban entre 64-128 µg/ml. La cadena peptídica 306 tiene una actividad de espectro estrecho contra *E. coli* a 1 µg/ml y para el resto de las cepas bacterianas a > 32 µg/ml (Figura 10c).

Los péptidos de la cadena 104, la cadena 105, la cadena 201, la cadena 308, la cadena 310 se probaron contra cepas sensibles a antibióticos de *S. aureus* RN4220 y cepas resistentes a la meticilina de *S. aureus* COL (MRSA). Los péptidos de cadena que comprenden aminoácidos en forma L o D se probaron contra estas bacterias, y se descubrió que los péptidos en forma D tienen una mejor actividad en comparación con la forma L (Tabla 6). Se probó la actividad sinérgica de los péptidos de cadena junto con Ertapenem (4 ng/ml) para saber si influirá en la actividad contra las cepas de MRSA. Se descubrió que todos los péptidos de cadena tenían actividad antibacteriana contra cepas de MRSA con CMI en el intervalo de 0,03 a 4 µg/ml. La cadena 310 tiene la mejor actividad antibacteriana contra las cepas de MRSA con una CMI de 0,06 y 0,03 µg/ml junto con Ertapenem (4 µg/ml) para ambas formas de péptidos L y D (Tabla 6).

Muchos péptidos antimicrobianos (PAM) tienen actividad antimicrobiana de amplio espectro contra cepas clínicas de bacterias y hongos. Los péptidos antimicrobianos forman estructuras secundarias por interacciones electrostáticas con membranas bacterianas por un paso sensible a la sal. Por lo tanto, las altas concentraciones de sal en los fluidos del cuerpo humano pueden desactivar muchos PAM y es esencial desarrollar PAM tolerantes a la sal para aplicaciones en la atención médica. Sin embargo, es bien sabido que la condición fisiológica, el pH, la temperatura y las altas concentraciones de sal influirán en la actividad de estos péptidos. Los presentes inventores han evaluado el pH, la sal y la termoestabilidad de las cadenas 104, 105, 201, 204, 306 y 308 y han descubierto que estos péptidos no se ven obstaculizados por el pH o la temperatura, incluso hasta 45 °C durante más de 14 días (Figuras 8 y 9). Sin embargo, hay un aumento de 2 veces en los valores de CMI de las cadenas 104, 105, 201, 204, 306 y 308 al usar una concentración de NaCl 200 mM.

Se necesitaban estudios de microscopía electrónica para conocer el mecanismo de acción de los PAM en las células tras el tratamiento con 5X de CMI en la superficie celular, así como las alteraciones intracelulares. Los PAM suelen causar múltiples tensiones en las membranas celulares, incluso a bajas concentraciones. La *E. coli* tiene una estructura celular compleja con membrana citoplasmática (7 nm), capa de peptidoglucano (7-8 nm) y una membrana externa (10-15 nm). La resistencia a los antibióticos de *E. coli* se debe a la presencia de peptidoglucano interno junto con la membrana externa. Tras la incubación con péptidos en cadena (105, 201, 308), casi todas las células de *E. coli* habían perdido su integridad estructural en forma de bastón y la acumulación de estructuras granulares, estructura similar a una burbuja que sobresalía de la superficie celular y se observaron distorsiones en las células (Fig. 11). La interacción de los péptidos de cadena con la bicapa lipídica de *S. aureus* se puede ver con una expansión del área de la membrana. Los presentes inventores también observaron la propagación de la membrana citoplasmática y los mesosomas esféricos como membranas bicapa intracelular y estructuras similares a los mesosomas formadas dentro de las células.

Las infecciones asociadas a los catéteres fueron iniciadas por la adherencia de las células bacterianas planctónicas a la superficie del biomaterial por colonización y formación de biopelículas. Los catéteres inmovilizados con la Cadena 201 o la Cadena 105 presentaron una excelente actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus*. Se observó una reducción de más del 70 % y del 30 % de las células vivas de *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente (Fig.12).

Tabla 2a. Actividad antibacteriana de variantes peptídicas por procedimiento de difusión radial. La zona de inhibición se proporciona en milímetros para los respectivos patógenos bacterianos.

Péptidos	Zona de inhibición (mm)*			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Cadena 200	-	-	-	-
Cadena 201	16	15	15	14
Cadena 202	-	-	-	-
Cadena 203	16	8	5	10
Cadena 204	18	15	18	15
Cadena 205	6	5	-	-
Cadena 206	14	10	-	-
Cadena 207	-	-	-	-
Cadena 208	15	12	10	12
Cadena 209	14	11	-	8
Cadena 210	13	10	-	6
Gentamicina	22	24	24	22
Concentración de prueba: Gentamicina - 5 µg; Péptidos - 50 µg				
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031) y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)				
* Valores de diámetro incluyendo los pocillos.				

Tabla 2b. Actividad antibacteriana de variantes peptídicas por procedimiento de difusión radial. La zona de inhibición se proporciona en milímetros para los respectivos patógenos bacterianos.

Péptidos	Zona de inhibición (mm)*			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Cadena 200	-	-	-	-
Cadena 201	16	15	15	14
Cadena 202	-	-	-	-
Cadena 203	16	8	5	10
Cadena 204	18	15	18	15
Cadena 205	6	5	-	-
Cadena 206	14	10	-	-

Péptidos	(continuación) Zona de inhibición (mm)*			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Cadena 207	-	-	-	-
Cadena 208	15	12	10	12
Cadena 209	14	11	-	8
Cadena 210	13	10	-	6
Gentamicina	22	24	24	22

Concentración de prueba: Gentamicina - 5 µg; Péptidos - 50 µg
Escherichia coli (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)
 * Valores de diámetro incluyendo los pocillos.

Tabla 2c. Actividad antibacteriana de variantes peptídicas por procedimiento de difusión radial. La zona de inhibición se proporciona en milímetros para los respectivos patógenos bacterianos.

Péptidos	Zona de inhibición (mm)*			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Cadena 300	-	-	-	-
Cadena 301	12	10	5	10
Cadena 302	12	12	10	-
Cadena 303	12	10	4	-
Cadena 304	14	16	16	11
Cadena 305	15	12	15	11
Cadena 306	12	8	9	-
Cadena 307	19	20	20	17
Cadena 308	19	20	20	18
Cadena 309	11	10	10	11
Cadena 310	17	15	20	16
Cadena 311	13	14	18	13
Cadena 312	-	-	-	-
Cadena 313	8	7	14	-
Gentamicina	22	24	24	22

Concentración de prueba: Gentamicina - 5 µg; Péptidos - 50 µg
Escherichia coli (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)
 * Valores de diámetro incluyendo los pocillos.

Tabla 3a. Concentración inhibitoria mínima de diferentes variantes de péptidos probadas contra 4 patógenos bacterianos. La actividad hemolítica de los péptidos se probó a 128 µg/ml y se presenta el porcentaje de hemólisis.

Concentración inhibitoria mínima (µg/ml)					% de hemólisis*
	Escherichia coli (ATCC 25922)	Staphylococcus aureus (ATCC 25923)	Klebsiella pneumoniae (ATCC 10031)	Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)	
Cadena 100	> 128	> 128	> 128	> 128	0,4
Cadena 101	> 128	> 128	> 128	> 128	4,1
Cadena 102	> 128	> 128	> 128	> 128	5,0
Cadena 103	> 128	> 128	> 128	> 128	0,7
Cadena 104	8	32	16	0,25	0,5
Cadena 105	2	2	1	2	0,2
Cadena 106	> 128	> 128	> 128	64	0,9
Cadena 107	64	> 128	> 128	> 128	0,1
Cadena 108	> 128	> 128	> 128	> 128	0,5
Cadena 109	8	8	8	16	3,8
Gentamicina	1	0,25	0,25	0,25	-
Tetraciclina e	8	2	2	32	-
Probado a 128 µg/ml					

5 **Tabla 3b.** Concentración inhibitoria mínima de diferentes variantes de péptidos probadas contra 4 patógenos bacterianos. La actividad hemolítica de los péptidos se probó a 128 µg/ml y se presenta el porcentaje de hemólisis.

Concentración inhibitoria mínima (µg/ml)					% de hemólisis*
	Escherichia coli (ATCC 25922)	Staphylococcus aureus (ATCC 25923)	Klebsiella pneumoniae (ATCC 10031)	Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)	
Cadena 200	> 128	> 128	> 128	> 128	0,62
Cadena 201	2	4	8	8	0,56
Cadena 202	> 128	> 128	> 128	1	0,56
Cadena 203	32	> 128	> 128	> 128	0,46
Cadena 204	2	16	32	4	0,55
Cadena 205	64	> 128	> 128	> 128	0,60
Cadena 206	16	> 128	> 128	> 128	0,29
Cadena 207	> 128	> 128	> 128	> 128	0,33
Cadena 208	32	> 128	> 128	32	2,01
Cadena 209	64	> 128	> 128	> 128	9,01
Cadena 210	> 128	> 128	> 128	> 128	8,61
Gentamicina	1	0,25	0,25	0,25	-
tetraciclina	8	2	2	32	-
*Probado a 128 µg/ml					

Tabla 3c. Concentración inhibitoria mínima de diferentes variantes de péptidos probadas contra 4 patógenos bacterianos. La actividad hemolítica de los péptidos se probó a 128 µg/ml y se presenta el porcentaje de hemólisis.

	Concentración inhibitoria mínima (µg/ml)				% de hemólisis*
	Escherichia coli (ATCC 25922)	Staphylococcus aureus (ATCC 25923)	Klebsiella pneumoniae (ATCC 10031)	Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)	
Cadena 300	> 128	> 128	> 128	> 128	6,81
Cadena 301	64	> 128	> 128	64	0,24
Cadena 302	> 128	128	> 128	16	0,44
Cadena 303	64	> 128	> 128	> 128	0,22
Cadena 304	16	32	64	8	0,34
Cadena 305	128	64	64	16	0,43
Cadena 306	8	2	> 128	64	0,04
Cadena 307	8	4	16	1	0,22
Cadena 308	1	4	4	2	0,32
Cadena 309	32	32	64	8	0,09
Cadena 310	4	8	16	1	3,69
Cadena 311	16	32	32	8	1,18
Cadena 312	> 128	> 128	> 128	> 128	4,87
Cadena 313	32	> 128	> 128	64	5,40
Gentamicina	1	0,25	0,25	0,25	-
tetraciclina	8	2	2	32	-

*Probado a 128 µg/ml

5

Tabla 4a: Concentración inhibitoria mínima de variantes peptídicas determinada por el procedimiento de microdilución.

Bacterias*	Cepas	Cadena 104	Cadena 105	Cadena 109
<i>Escherichia coli</i>				
	1	4	1	16
	2	4	4	4
	3	4	1	4
	4	4	1	4
	5	4	2	4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				
	1	8	4	16
	2	4	2	8
	3	8	4	8
	4	16	4	16
	5	4	2	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
	1	4	4	16
	2	2	4	16
	3	4	4	16
	4	2	4	16
	5	1	4	8

(continuación)

Bacterias*	Cepas	Cadena 104	Cadena 105	Cadena 109
<i>Serratia marcescens</i>	1	> 128	128	> 128
	2	> 128	128	> 128
	3	> 128	128	> 128
	4	> 128	128	> 128
	5	128	128	64
<i>Proteus mirabilis</i>	1	> 128	> 128	> 128
	2	32	32	64
	3	128	64	64
	4	> 128	> 128	> 128
	5	> 128	> 128	> 128
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	4	2	4
	2	4	2	8
	3	8	2	8
	4	4	2	8
	5	2	1	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	4	2	2
	2	2	2	4
	3	4	2	2
	4	2	2	2
	5	4	2	2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	4	4	16
	2	2	2	8
	3	1	2	2
	4	4	4	8
	5	1	2	8
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	16	4	-
	2	8	4	-
	3	8	4	-
	4	4	2	-
	5	8	4	-
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1	8	4	-

* Los valores de CMI se determinan mediante el procedimiento de microdilución utilizando el caldo de Muller-Hinton ajustado en cationes en presencia del 0,02 % de BSA y del 0,2 % de ácido acético.

Tabla 4b: Concentración inhibitoria mínima de variantes peptídicas determinada por el procedimiento de microdilución.

Bacterias*	Cepas	Cadena 201	Cadena 204
<i>Escherichia coli</i>	1	16	8
	2	1	1
	3	1	1
	4	1	1
	5	1	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	2	8
	2	2	4
	3	4	16
	4	4	4
	5	2	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	4	4
	2	4	16
	3	4	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	2	8
	5	2	4
<i>Serratia marcescens</i>	1	64	> 128
	2	64	> 128
	3	64	128
	4	64	> 128
	5	128	> 128
<i>Proteus mirabilis</i>	1	> 128	> 128
	2	32	32
	3	64	64
	4	> 128	> 128
	5	> 128	> 128
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1	4
	2	2	8
	3	2	4
	4	2	8
	5	1	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	1
	2	1	2
	3	1	2
	4	1	1
	5	1	1

(continuación)			
Bacterias*	Cepas	Cadena 201	Cadena 204
<i>Streptococcus pneumoniae</i>			
	1	8	4
	2	4	4
	3	2	4
	4	4	4
	5	4	4
<i>Acinetobacter baumannii</i>			
	1	4	4
	2	4	4
	3	4	4
	4	4	4
	5	4	4
<i>Acinetobacter johnsonii</i>			
* Los valores de CMI se determinan mediante el procedimiento de microdilución utilizando el caldo de Muller-Hinton ajustado en cationes en presencia del 0,02 % de BSA y del 0,2 % de ácido acético.			

Tabla 4c: Concentración inhibitoria mínima de variantes peptídicas determinada por el procedimiento de microdilución.

Bacterias*	Cepas	Cadena 304	Cadena 306	Cadena 307	Cadena 308	Cadena 309	Cadena 310	Cadena 311	Gentamicina
<i>Escherichia coli</i>									
	1	1	1	4	1	0,5	4	2	0,5
	2	16	2	4	0,5	32	32	2	0,5
	3	16	2	4	1	16	16	1	1
	4	32	2	2	1	32	16	0,5	1
	5	32	2	4	1	16	16	1	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>									
	1	> 128	128	8	4	128	64	8	2
	2	> 128	> 128	8	4	32	64	8	0,25
	3	> 128	> 128	16	4	> 128	128	4	2
	4	> 128	64	16	4	32	64	8	2
	5	64	64	4	4	128	32	4	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>									
	1	32	128	16	8	16	8	16	1
	2	64	> 128	16	8	32	16	8	0,5
	3	64	128	16	4	16	16	16	0,5
	4	64	> 128	8	4	32	8	8	0,5
	5	16	128	8	4	8	4	4	0,25
<i>Serratia marcescens</i>									
	1	> 128	> 128	> 128	128	> 128	> 128	> 128	1
	2	> 128	> 128	> 128	128	> 128	> 128	> 128	2
	3	> 128	> 128	128	64	> 128	> 128	> 128	1
	4	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	1
	5	> 128	> 128	> 128	128	> 128	> 128	> 128	1
<i>Proteus mirabilis</i>									
	1	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	2
	2	> 128	> 128	128	32	> 128	> 128	128	2
	3	> 128	> 128	128	128	> 128	> 128	128	> 128
	4	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	8
	5	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128

(continuación)

Bacterias*	Cepas	Cadena 304	Cadena 306	Cadena 307	Cadena 308	Cadena 309	Cadena 310	Cadena 311	Gentamicina
<i>Enterobacter cloacae</i>									
	1	64	64	4	2	> 128	128	4	0,25
	2	64	64	8	2	128	64	4	0,25
	3	128	32	4	2	64	16	4	0,25
	4	128	16	4	2	64	8	4	0,25
	5	32	16	4	2	32	16	2	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i>									
	1	32	16	2	1	8	8	1	0,5
	2	32	32	2	2	16	16	1	0,5
	3	16	32	2	1	8	8	1	0,5
	4	16	16	2	2	8	8	1	0,5
	5	16	8	2	2	8	4	1	0,5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>									
	1	128	64	4	8	64	128	16	2
	2	128	64	4	4	64	128	8	2
	3	128	64	4	8	64	128	16	2
	4	128	128	2	2	64	128	4	2
	5	64	64	2	4	64	64	8	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>									
	1	-	16	-	4	-	-	-	0,5
	2	-	32	-	4	-	-	-	0,25
	3	-	16	-	4	-	-	-	0,5
	4	-	16	-	2	-	-	-	0,5
	5	-	8	-	2	-	-	-	0,25
<i>Acinetobacter johnsonii</i>									
	1	-	16	-	4	-	-	-	0,25

* Los valores de CMI se determinan mediante el procedimiento de microdilución utilizando el caldo de Muller-Hinton ajustado en cationes en presencia del 0,02 % de BSA y del 0,2 % de ácido acético.

Tabla 5a: Concentración mínima inhibitoria de variantes peptídicas probadas contra cepas clínicas de levadura

Hongos	Cepas	Cadena 104D	Cadena 105D	Cadena 109D
<i>Candida albicans</i>	1	8	32	128
	2	8	16	128
	3	8	32	128
	4	8	32	128
	5	8	32	128
<i>C. glabrata</i>	1	8	16	128
	2	8	16	128
	3	8	8	16
	4	16	32	64
<i>C. parapsilosis</i>	1	4	8	128
	2	4	8	128
	3	4	8	128
	4	2	4	8
<i>C. quilliermondiae</i>	1	4	8	128

Tabla 5b: Concentración mínima inhibitoria de variantes peptídicas probadas contra cepas clínicas de levadura

Hongos	Cepas	Cadena 201D	Cadena 204D
<i>Candida albicans</i>	1	16	8
	2	8	8
	3	8	8
	4	16	8
	5	8	8
<i>C. glabrata</i>	1	8	4
	2	8	8
	3	8	32
	4	64	32
<i>C. parapsilosis</i>	1	8	4
	2	8	4
	3	8	8
	4	8	8
<i>C. quilliermondiae</i>	1	8	4

Tabla 5c Concentración mínima inhibitoria de variantes peptídicas probadas contra cepas clínicas de levadura

Hongos	Cepas	Cadena 304D	Cadena 306D	Cadena 307D	Cadena 308D	Cadena 309D	Cadena 310D	Cadena 311D	Anfotericina B
<i>Candida albicans</i>	1	16	16	16	16	32	16	8	2
	2	16	8	16	16	32	16	8	0,5
	3	16	8	16	16	16	16	8	2
	4	16	16	16	16	16	16	16	2
	5	32	16	16	16	32	16	16	2
<i>C. glabrata</i>	1	16	8	8	16	32	16	16	4
	2	16	8	16	16	64	16	16	4
	3	8	16	8	16	4	128	8	2
	4	64	32	16	16	128	128	64	4
<i>C. parapsilosis</i>	1	64	8	16	8	64	64	16	2
	2	64	16	8	8	64	64	8	2
	3	32	16	8	8	32	64	8	2
	4	16	4	8	4	16	16	8	2
<i>C. quillemondiae</i>	1	16	4	4	4	8	8	4	2

Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de variantes peptídicas contra cepas sensibles y resistentes a antibióticos de *S. aureus* y actividad sinérgica con Ertapenem.

Compuesto	<i>S. aureus</i> RN4220	<i>S. aureus</i> COL (MRSA)	<i>S. aureus</i> COL + 4 µg/ml de Ertapenem
104	> 64 µg/ml	> 64 µg/ml	0,25 µg/ml
104 D	64 µg/ml	32 µg/ml	4 µg/ml
105	> 64 µg/ml	> 64 µg/ml	0,5 µg/ml
105 D	16 µg/ml	8 µg/ml	2 µg/ml
201	64 µg/ml	64 µg/ml	0,5 µg/ml
201 D	2 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml
308	> 64 µg/ml	> 64 µg/ml	0,5 µg/ml
308 D	4 µg/ml	4 µg/ml	1 µg/ml
310	> 64 µg/ml	> 64 µg/ml	0,06 µg/ml
310 D	> 64 µg/ml	> 64 µg/ml	<0,03 µg/ml

* D - D-Aminoácidos.

REFERENCIAS

- 5 Andersen A.S., Sandvang D., Schnorr K.M., Kruse T., Neve S., Joergensen B., Karlsmark T., and Krogfelt K.A. (2010) A novel approach to the antimicrobial activity of maggot debridement therapy. *J Antimicrob Chemother* 65, 1646-1654.
- Pirttilä, A.M., Kämäräinen, T., Hirsikorpi, M., Jaakola, L., and Hohtola, A. (2001). DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants. *Plant molecular biology report* 19, a-f.
- 10 Schmidtchen, A., Rigstad, L., Kasetty, G., Mizuno, H., Rutlands M.W. and Malsten, M. (2011) Membrane selectivity by W-tagging of antimicrobial peptides. *Biochem Biophys Acta* 1808, 1081-1091.
- Van Lith, M., Karala, A.R., Bown, D., Gatehouse, J.A., Ruddock, L.W., Saunders, P.T., and Benham, A.M. (2007). A developmentally regulated chaperone complex for the endoplasmic reticulum of male haploid germ cells. *Mol. Biol. Cell* 18, 2795-2804.
- 15 Wang, G.S., Li, X., and Wang, Z. (2009) APD2: The updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res.* 37, D933-D937.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> University of Oulu
- <120> Nuevos péptidos antimicrobianos, sus variantes y usos
- <130> BP209297
- 20 <160> 79
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 549
- <212> PRT
- 25 <213> *Empetrum nigrum*
- <400> 1

ES 2 808 780 T3

Met Arg Leu Val Ala His Pro Val Pro Asp Ala Pro Leu Tyr Ala Leu
1 5 10 15

Met Ile Lys Ala Cys Ser Met Gly Ile Pro Gln Pro Asn Asp Asn Leu
20 25 30

Trp Lys Pro Arg Asn Pro Leu Leu Ala Lys Glu Glu Lys Thr Ser Lys
35 40 45

Arg Gly Arg Thr Ala Pro Asp Thr Glu Arg Ala Leu Asp Leu Phe Arg
50 55 60

Glu Met Thr Leu Arg Tyr Asn Ile Arg Pro Thr Ala Glu Val Tyr Thr
65 70 75 80

Ala Ile Ile Ala Ala Cys Val Lys Arg Asp Asp Met Tyr Asp Lys Gly
85 90 95

Phe Gly Leu Phe Lys Lys Met Val Glu Leu Glu Arg Asn Arg Met Ser
100 105 110

Ser Glu Gly His Asp Ser Thr Ser Phe Ala Pro Thr Arg Ala Thr Tyr
115 120 125

Asn Ala Leu Leu Arg Gly Cys Ala Arg Asn Lys Asp Leu Leu Arg Ala
130 135 140

Arg Trp Ile Leu Ala Glu Met Leu Arg Thr Ala Gln Ala Lys Trp Gln
145 150 155 160

Glu Phe Met Glu Lys Ser Lys Lys Gly Glu Glu Gly Val Gln Glu Trp
165 170 175

ES 2 808 780 T3

Glu	Leu	Leu	Glu	Val	Glu	Glu	Met	Arg	Pro	Asp	Thr	Asn	Thr	Met	Ala	180	185	190
Phe	Leu	Phe	Tyr	Thr	Tyr	Ala	Ser	His	Thr	Thr	Ser	Ser	Lys	Ala	Val	195	200	205
Pro	Glu	Thr	Glu	Gly	Lys	Lys	Glu	Leu	Glu	Gly	Lys	Ala	Glu	Glu	Arg	210	215	220
Ala	Ser	Glu	Val	Thr	Ser	Val	Ser	Pro	Val	Ser	Glu	Pro	Pro	Glu	Pro	225	230	235
Met	Asp	Glu	Ser	Lys	Leu	Val	Tyr	Ser	Leu	Pro	Thr	Ser	Ser	Gln	Ala	245	250	255
Ile	Leu	Arg	Glu	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Asp	Arg	Ile	Lys	Ser	Asp	Gln	260	265	270
Gly	Gln	Gln	Ser	Asn	Leu	Leu	Ser	Ser	Val	Gln	Ile	Asn	Ser	Lys	Leu	275	280	285
Leu	Asn	Ser	Tyr	Ile	Ala	Val	Leu	Ser	Ala	His	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	290	295	300
Val	Val	Glu	Arg	Ile	Ser	Glu	Val	Val	Val	Gly	Thr	Lys	Glu	Asn	Pro	305	310	315
Lys	Ser	Leu	Phe	Glu	Glu	Thr	Gly	Thr	Ser	Val	Asn	Gly	Tyr	Thr	Cys	325	330	335
Phe	Thr	Val	Ile	Asp	Ala	Cys	Gly	Met	Met	Glu	His	Ser	Pro	Asp	Thr	340	345	350
Tyr	His	Leu	Ala	Cys	Glu	Met	Trp	Gln	Arg	Trp	Leu	Ser	Leu	Val	Glu	355	360	365
Asn	Ala	Thr	Phe	His	Arg	Glu	Asn	Pro	Leu	Lys	Ala	Lys	Glu	Ile	Gly	370	375	380
Leu	Asp	Ser	Arg	Thr	Ile	Ser	Asp	Cys	Trp	Ser	Ala	Met	Ile	Arg	Leu	385	390	395
His	Ala	Lys	Tyr	Asn	Gln	Val	Asp	Glu	Ala	Met	Lys	Leu	Val	His	Glu	405	410	415
Phe	Ala	Arg	Leu	Tyr	Pro	Pro	Ala	Ser	Leu	Phe	Asn	Ser	Leu	Thr	Phe	420	425	430

ES 2 808 780 T3

Glu Pro Ser Ser Thr Ser Ser Ser Ser Leu Ser Pro Arg Lys Gly Val
435 440 445

Gln Glu Ile Ser Pro Leu Phe Ser Ser Thr Ser Leu Thr His Ser Ile
450 455 460

Arg Gly Arg Asp Ile Ser Arg Ile Gln Asn Thr Met Ser Gln Asp Pro
465 470 475 480

Thr Leu Gln Phe Arg Ala Val Gln Ile Leu His Leu Arg Leu Val Glu
485 490 495

Leu Glu Thr Arg Pro Lys Asp Leu Ala Tyr Leu Ser Trp Leu Leu Lys
500 505 510

Ser Tyr Glu His Gln Leu Gln Pro Lys Arg Pro Lys Ser Leu Gln Gly
515 520 525

Asp Leu Phe Thr Ser Arg Gln Ala Ala Tyr Asn Arg Ile Val Gln Gln
530 535 540

Arg Thr Ser Ser Arg
545

<210> 2
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> cebador

<400> 2
catatgagac tagtagctca tcctgttcct gatgc 35

10

<210> 3
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> cebador

<400> 3
gtcgacttat taacgagatg acgtcctctg ctgtacg 37

20

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> péptido

<400> 4

	Asp	Cys	Trp	Ser	Ala	Met	Ile	Arg	Leu	His	Ala	Lys	Tyr	Asn	Gln	Val
	1						5					10				15
	<210>	5														
	<211>	11														
	<212>	PRT														
5	<213>	Secuencia artificial														
	<220>															
	<223>	péptido														
	<400>	5														
				Asn	Arg	Ile	Val	Gln	Gln	Arg	Thr	Ser	Ser	Arg		
				1				5					10			
10	<210>	6														
	<211>	11														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia artificial														
	<220>															
15	<223>	péptido														
	<400>	6														
				Tyr	Asp	Lys	Gly	Phe	Gly	Leu	Phe	Lys	Lys	Met		
				1				5					10			
	<210>	7														
	<211>	11														
20	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia artificial														
	<220>															
	<223>	péptido (101)														
	<400>	7														
				Lys	Ile	Arg	Leu	His	Arg	Lys	Arg	Leu	Arg	Lys		
				1				5					10			
25	<210>	8														
	<211>	11														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia artificial														
	<220>															
30	<223>	péptido (102)														
	<400>	8														
				Lys	Lys	Arg	Leu	His	Arg	Lys	Arg	Leu	Arg	Lys		
				1				5					10			
	<210>	9														
35	<211>	11														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia artificial														
	<220>															
	<223>	Péptido (103)														
40	<400>	9														
				Lys	Leu	Arg	Leu	His	Ala	Lys	Arg	Leu	Arg	Lys		
				1				5					10			

<210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> péptido (104)
 <400> 10
 Arg Lys Trp Arg Ala Met Ile Arg Leu His Ala Lys Arg Leu Arg Lys
 1 5 10 15
 <210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Péptido (105)
 <400> 11
 Arg Lys Trp Arg Ala Met Ile Arg Leu His Ala Lys Trp Leu Arg Lys
 1 5 10 15
 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> péptido (106)
 <400> 12
 Trp Ile Arg Leu His Trp Lys Arg Leu Arg Lys
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> péptido (107)
 <400> 13
 Trp Trp Arg Leu His Ala Lys Lys Lys Leu Trp
 1 5 10
 <210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> péptido (108)
 <400> 14
 Trp Trp Arg Leu His Ala Lys Arg Lys Leu Trp
 1 5 10
 <210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 40

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido (109)

<400> 15

Trp Trp Arg Leu His Ala Lys Trp Lys Leu Trp
1 5 10

5

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> péptido (110)

<400> 16

Lys Leu Lys Arg Ala Met Ile Arg Leu His Ala Lys Lys Arg Leu Lys
1 5 10 15

15

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido (111)

20

<400> 17

Lys Leu Lys Arg Ala Met Ile Arg Leu His Ala Lys Lys Trp Arg Trp
1 5 10 15

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido (112)

<400> 18

Arg Leu Lys Arg Ala Met Ile Arg Leu His Ala Lys Lys Trp Arg Trp
1 5 10 15

30

<210> 19

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> péptido (113)

<400> 19

Arg Trp Trp Arg Ala Met Ile Arg Leu His Ala Lys Lys Trp Arg Trp
1 5 10 15

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

40

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido (114)

<400> 20

ES 2 808 780 T3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Trp	Trp	Arg	Leu	His	Ala	Ala	Lys	Lys	Ile	Leu	
	1				5					10		
5	<210>	21										
	<211>	11										
	<212>	PRT										
	<213>	Secuencia artificial										
	<220>											
	<223>	péptido (115)										
	<400>	21										
10			Trp	Trp	Arg	Leu	His	Ala	Lys	Lys	Lys	Cys
			1			5						10
	<210>	22										
	<211>	11										
	<212>	PRT										
	<213>	Secuencia artificial										
	<220>											
15	<223>	péptido (116)										
	<400>	22										
20			Trp	Trp	Arg	Leu	His	Ala	Lys	Lys	Lys	Phe
			1			5						10
	<210>	23										
	<211>	11										
	<212>	PRT										
	<213>	Secuencia artificial										
	<220>											
	<223>	péptido (117)										
	<400>	23										
25			Trp	Trp	Arg	Leu	His	Ala	Lys	Lys	Lys	Ile
			1			5						10
	<210>	24										
	<211>	11										
	<212>	PRT										
	<213>	Secuencia artificial										
	<220>											
30	<223>	péptido (118)										
	<400>	24										
35			Trp	Trp	Arg	Leu	His	Ala	Lys	Lys	Lys	Arg
			1			5						10
	<210>	25										
	<211>	11										
	<212>	PRT										
	<213>	Secuencia artificial										
	<220>											
	<223>	péptido (119)										
40	<400>	25										
			Trp	Trp	Arg	Leu	His	Ala	Lys	Lys	Lys	Trp
			1			5						10
	<210>	2										

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> péptido (120)
 <400> 26

 Trp Trp Arg Leu His Ala Lys Lys Lys Trp Trp
 1 5 10

 <210> 27
 <211> 11
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> péptido (121)
 <400> 27

 Trp Trp Arg Leu His Ala Lys Leu Lys Leu Trp
 1 5 10

 15 <210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> péptido (122)
 <400> 28

 Trp Trp Arg Leu His Ala Lys Arg Lys Arg Trp
 1 5 10

 25 <210> 29
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> péptido (123)
 30 <400> 29

 Trp Trp Arg Leu His Ala Lys Trp Arg Trp Arg
 1 5 10

 <210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> péptido (124)
 <400> 30

 Trp Trp Arg Leu His Ala Arg Lys Arg Trp Trp
 1 5 10

 40 <210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido (125)
 <400> 31

Trp Trp Arg Leu His Ala Trp Lys Trp Arg Arg
 1 5 10

5 <210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> péptido (201)
 <400> 32

Lys Trp Ile Val Trp Arg Trp Arg Phe Lys Arg
 1 5 10

15 <210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido (202)
 <400> 33

Asn Arg Ile Val Gln Gln Arg Thr Ser Ser Arg
 1 5 10

20 <210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> péptido (203)
 <400> 34

Arg Arg Ile Val Lys Leu Arg Trp Phe Lys Arg
 1 5 10

30 <210> 35
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido (204)
 35 <400> 35

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

<210> 36
 <211> 11
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido (205)

<400> 36

Lys Arg Ile Val Arg Trp Arg Thr Arg Lys Arg
1 5 10

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido (206)

<400> 37

Lys Arg Ile Val Arg Trp Arg Trp Arg Lys Arg
1 5 10

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido (207)

<400> 38

Lys Arg Ile Val Arg Trp Arg Lys Leu Lys Arg Lys
1 5 10

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido (208)

<400> 39

Trp Arg Ile Leu Arg Trp Arg Lys Leu Lys Arg
1 5 10

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido (209)

<400> 40

Trp Arg Ile Val Arg Trp Arg Lys Leu Lys Arg
1 5 10

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido (210)

<400> 41

ES 2 808 780 T3

		Trp	Arg	Ile	Val	Gln	Trp	Arg	Lys	Leu	Lys	Arg
		1				5					10	
	<210>	42										
	<211>	11										
	<212>	PRT										
5	<213>	Secuencia artificial										
	<220>											
	<223>	péptido (211)										
	<400>	42										
		Lys	Arg	Ile	Val	Arg	Arg	Arg	Thr	Phe	Lys	Arg
		1				5					10	
10	<210>	43										
	<211>	11										
	<212>	PRT										
	<213>	Secuencia artificial										
	<220>											
15	<223>	péptido (212)										
	<400>	43										
		Lys	Arg	Trp	Arg	Lys	Trp	Arg	Leu	Phe	Lys	Arg
		1				5					10	
20	<210>	44										
	<211>	11										
	<212>	PRT										
	<213>	Secuencia artificial										
	<220>											
	<223>	Cadena (213)										
	<400>	44										
		Asn	Arg	Ile	Val	Leu	Leu	Arg	Thr	Phe	Lys	Arg
		1				5					10	
25	<210>	45										
	<211>	11										
	<212>	PRT										
	<213>	Secuencia artificial										
	<220>											
30	<223>	péptido (214)										
	<400>	45										
		Asn	Arg	Ile	Val	Lys	Lys	Arg	Thr	Phe	Lys	Arg
		1				5					10	
35	<210>	46										
	<211>	11										
	<212>	PRT										
	<213>	Secuencia artificial										
	<220>											
	<223>	péptido (215)										
40	<400>	46										

ES 2 808 780 T3

		Arg Lys Ile Val Lys Arg Arg Thr Phe Lys Arg
		1 5 10
5	<210> 47	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> péptido (216)	
	<400> 47	
10		Arg Lys Ile Val Trp Trp Arg Thr Phe Lys Arg
		1 5 10
	<210> 48	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> péptido (217)	
	<400> 48	
20		Arg Leu Ile Val Arg Arg Arg Thr Phe Lys Arg
		1 5 10
	<210> 49	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> péptido (218)	
	<400> 49	
25		Arg Arg Ile Val Arg Lys Lys Thr Phe Lys Arg
		1 5 10
	<210> 50	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> péptido (219)	
	<400> 50	
35		Arg Arg Ile Val Trp Arg Arg Thr Phe Lys Arg
		1 5 10
	<210> 51	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> péptido (220)	
40	<400> 51	

ES 2 808 780 T3

		Arg Trp Ile Val Gln Arg Arg Thr Phe Lys Arg
		1 5 10
5	<210> 52 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> péptido (221) <400> 52	
10		Arg Val Ile Val Arg Arg Arg Thr Phe Lys Arg
		1 5 10
15	<210> 53 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> péptido (222) <400> 53	
20		Trp Lys Ile Val Lys Lys Arg Thr Arg Arg Arg
		1 5 10
25	<210> 54 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> péptido (223) <400> 54	
30		Trp Arg Ile Val Arg Arg Arg Thr Phe Lys Arg
		1 5 10
35	<210> 55 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> péptido (301) <400> 55	
40		Ile Ile Lys Arg Phe Arg Leu Phe Lys Lys Leu
		1 5 10
	<210> 56 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> péptido (302) <400> 56	

		Ile	Leu	Lys	Arg	Trp	Trp	Leu	Phe	Lys	Lys	Leu
		1				5					10	
5		<210> 57 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> péptido (303) <400> 57										
10		Ile	Trp	Lys	Arg	Phe	Arg	Leu	Phe	Lys	Lys	Arg
		1				5					10	
15		<210> 58 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> péptido (304) <400> 58										
20		Ile	Trp	Lys	Arg	Phe	Arg	Leu	Phe	Lys	Lys	Trp
		1				5					10	
25		<210> 59 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> péptido (305) <400> 59										
30		Arg	Leu	Lys	Trp	Phe	Trp	Leu	Arg	Lys	Leu	Lys
		1				5					10	
35		<210> 60 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> péptido (306) <400> 60										
40		Arg	Leu	Lys	Arg	Trp	Arg	Leu	Phe	Arg	Lys	Arg
		1				5					10	
40		<210> 61 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> péptido (307) <400> 61										

		Arg Leu Lys Trp Phe Trp Leu Phe Arg Lys Arg
		1 5 10
5		<210> 62 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> péptido (308) <400> 62
10		Arg Leu Lys Trp Phe Leu Leu Phe Arg Lys Arg
		1 5 10
15		<210> 63 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> péptido (309) <400> 63
20		Trp Arg Lys Trp Phe Trp Leu Phe Lys Lys Arg
		1 5 10
		<210> 64 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> péptido (310) <400> 64
25		Lys Arg Lys Trp Arg Trp Leu Phe Lys Lys Leu
		1 5 10
30		<210> 65 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> péptido (311) <400> 65
35		Lys Leu Lys Trp Phe Trp Leu Phe Lys Lys Arg
		1 5 10
40		<210> 66 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> péptido (312) <400> 66

		Lys	Leu	Lys	Lys	Phe	Lys	Leu	Phe	Lys	Lys	Arg	
		1				5					10		
	<210> 67												
	<211> 12												
	<212> PRT												
5	<213> Secuencia artificial												
	<220>												
	<223> péptido (313)												
	<400> 67												
		Arg	Leu	Lys	Arg	Phe	Arg	Leu	Phe	Arg	Lys	Arg	Lys
		1				5					10		
10	<210> 68												
	<211> 11												
	<212> PRT												
	<213> Secuencia artificial												
	<220>												
15	<223> péptido (314)												
	<400> 68												
		Lys	Arg	Lys	Arg	Phe	Arg	Leu	Phe	Lys	Lys	Arg	
		1				5					10		
	<210> 69												
	<211> 11												
20	<212> PRT												
	<213> Secuencia artificial												
	<220>												
	<223> péptido (315)												
	<400> 69												
		Arg	Leu	Lys	Arg	Phe	Arg	Leu	Phe	Lys	Lys	Leu	
		1				5					10		
25	<210> 70												
	<211> 11												
	<212> PRT												
	<213> Secuencia artificial												
	<220>												
30	<223> péptido (316)												
	<400> 70												
		Arg	Arg	Lys	Arg	Phe	Arg	Leu	Phe	Lys	Lys	Met	
		1				5					10		
	<210> 71												
	<211> 11												
35	<212> PRT												
	<213> Secuencia artificial												
	<220>												
	<223> péptido (317)												
40	<400> 71												
		Arg	Arg	Lys	Arg	Phe	Arg	Leu	Phe	Arg	Arg	Lys	
		1				5					10		

<210> 72
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> péptido (318)
 <400> 72
 Arg Trp Lys Arg Phe Arg Leu Phe Lys Lys Arg
 1 5 10
 <210> 73
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> péptido (319)
 <400> 73
 Arg Trp Lys Arg Phe Arg Leu Phe Lys Lys Trp
 1 5 10
 <210> 74
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> péptido (320)
 <400> 74
 Trp Lys Lys Gly Phe Gly Leu Phe Lys Lys Met
 1 5 10
 <210> 75
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> péptido (321)
 <400> 75
 Trp Lys Lys Arg Phe Arg Leu Phe Lys Lys Leu
 1 5 10
 <210> 76
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> péptido (322)
 <400> 76
 Trp Leu Arg Arg Phe Arg Leu Phe Arg Arg Leu
 1 5 10
 <210> 77
 <211> 12
 <212> PRT
 40

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido (323)

<400> 77

5

Arg Leu Lys Arg Phe Leu Leu Phe Arg Lys Arg Leu
1 5 10

<210> 78

 $\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> péptido (324)

<400> 78

Lys Arg Lys Trp Phe Trp Leu Phe Lys Lys Leu
1 5 10

15

<210> 79

 $\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido (325)

20

<400> 79

Lys Leu Lys Arg Phe Arg Leu Phe Lys Lys Arg
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un péptido antimicrobiano que comprende la SEQ ID NO: 10, 11, 13 o 15.
2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una actividad contra hongos o levaduras.
3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una actividad contra bacterias.
- 5 4. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en terapia, en particular, para su uso como agente antimicrobiano.
5. Un procedimiento *in vitro* de destrucción o inhibición del crecimiento de microbios, que comprende una etapa de tratar dichos microbios con un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 10 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el péptido presenta una actividad contra bacterias u hongos o tanto bacterias como hongos.
7. Un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso como un medicamento.
8. Uso del péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, como aditivo para piensos, conservante o tensioactivo.

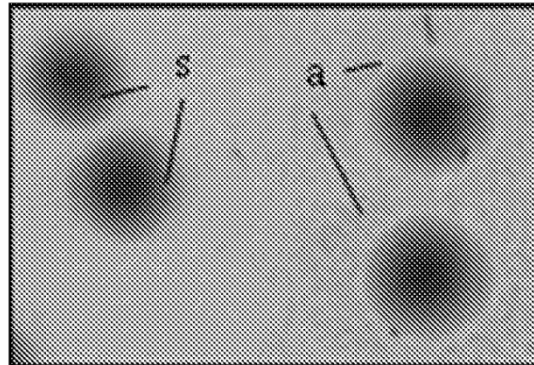


Fig. 1

MRLVAHPVPDAPLYALMIKACSMGIPOPNLNLWKPRNPLLAKEEKTSKR
GRTAPDTERALDLFREMTLRYNIRPTAEVYTALIAACVKRDDMYDKGFG
LFKMVELERNRMSSEGHDSTSFAPTRATYNALLRGCARNKDILLRARWI
LAEMLRTAQAKWQEFMEKSKKGEQVQEWELLEVEEMRPDTNTMAFLFY
TYASHTTSSKAVPETEGKKELEGKAEERASEVTSVSPVSEPPEPMDISK
LVYSLPTSSQAILREVTSLLDRIKSDQGOQSNLLSSVQINSKLLNSYIA
VLSAHCRRSSQVVERISEVVVGTKENPKSLFEETGTSVNGYTCFTVIDAC
GMMEHSPDTYHLACEMWQRWLSLVENATFHRENPLKAKEIGLDSRTISD
CWSAMIRLHAKYNQVDEAMKLVHEFARLYPPASLFNSLTFEPSSSTSSSS
LSPRKGVQEISPLFSSTSLTHSIRGRDISRIQNTMSQDPTLQFRAVQIL
HLRLVELETRPKDLAYLSWLLKSYEHQLQPKRPKSLQGDLFSTRQAAYN
RIVQQRTSSR

Fig. 2

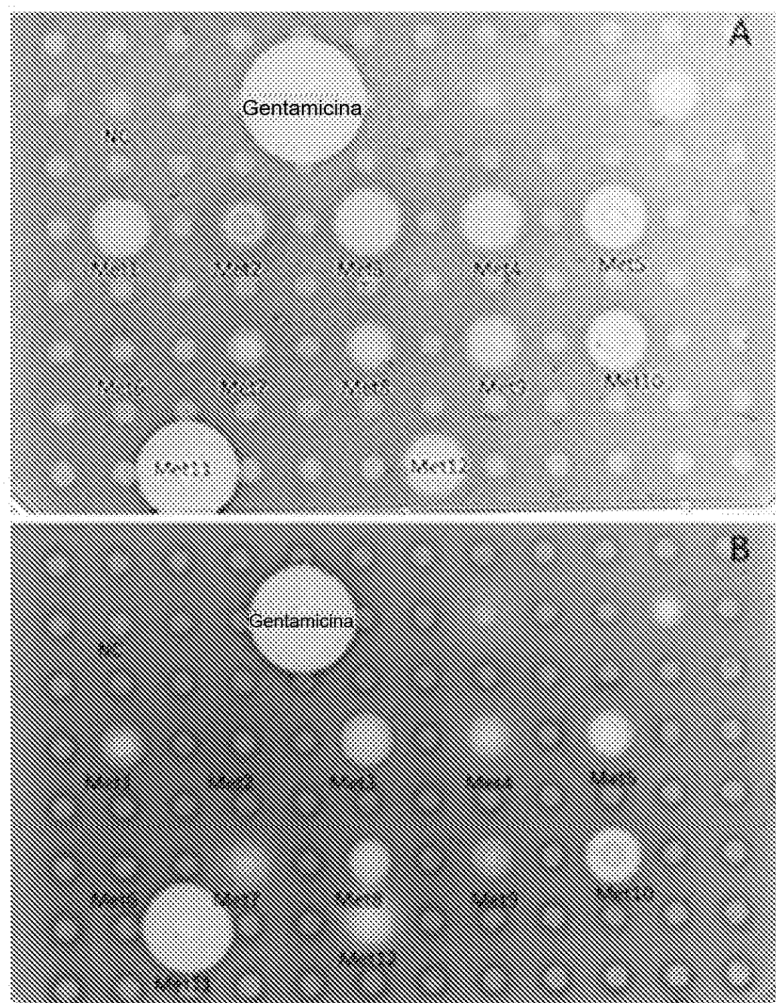


Fig. 3

Cadena100	DCWSAMIRLHAKYNQV
Cadena101	-----KIRLHRKRLRK
Cadena102	-----KKRLHRKRLRK
Cadena103	-----KLRLHAKRLRK
Cadena104	RKWRAMIRLHAKRLRK
Cadena105	RKWRAMIRLHAKWLRK
Cadena106	-----WIRLHWKRLRK
Cadena107	-----WWRLHAKKKLW
Cadena108	-----WWRLHAKRKLW
Cadena109	-----WWRLHAKWKLW
Cadena110	KLKRAMIRLHAKKRLK
Cadena111	KLKRAMIRLHAKKWRW
Cadena112	RLKRAMIRLHAKKWRW
Cadena113	RWWRAMIRLHAKKWRW
Cadena114	-----WWRLHAAKKTIL
Cadena115	-----WWRLHAKKKCW
Cadena116	-----WWRLHAKKKFW
Cadena117	-----WWRLHAKKKIW
Cadena118	-----WWRLHAKKKRW
Cadena119	-----WWRLHAKKKWR
Cadena120	-----WWRLHAKKKWW
Cadena121	-----WWRLHAKLKLW
Cadena122	-----WWRLHAKRKRW
Cadena123	-----WWRLHAKWRWR
Cadena124	-----WWRLHAKRWW
Cadena125	-----WWRLHAKWRR

Fig. 4a

Cadena201	KWIVWRW-RFKR-
Cadena212	KRWRKWR-LFKR-
Cadena204	RRLIWRRFKWLR-
Cadena200	NRIVQQR-TSSR-
Cadena203	RRIVKLR-WFKR-
Cadena218	RRIVRKK-TFKR-
Cadena222	WKIVKKR-TRRR-
Cadena205	KRIVRWR-TRKR-
Cadena206	KRIVRWR-WRKR-
Cadena208	WRILRWR-KLKR-
Cadena207	KRIVRWR-KLKR-
Cadena210	WRIVQWR-KLKR-
Cadena209	WRIVRWR-KLKR-
Cadena211	KRIVRRR-TFKR-
Cadena223	WRIVRRR-TFKR-
Cadena219	RRIVWRR-TFKR-
Cadena220	RWIVQRR-TFKR-
Cadena217	RLIVRRR-TFKR-
Cadena221	RVIVRRR-TFKR-
Cadena213	NRIVLLR-TFKR-
Cadena214	NRIVKKR-TFKR-
Cadena202	RKIVKKR-TFKR-
Cadena215	RKIVKRR-TFKR-
Cadena216	RKIVVWR-TFKR-

Fig. 4b

Cadena300	YDKGFGLFKK-M
Cadena301	IIKRFRLF-KL
Cadena302	ILKRWWLFKK-L
Cadena303	IWKRFRLF-KR
Cadena304	IWKRFRLF-KW
Cadena305	RLKFWLRL-K
Cadena306	RLKRWLRF-KR
Cadena307	RLKFWLFR-KR
Cadena308	RLKWFLFR-KR
Cadena309	WRKFWLFF-KR
Cadena310	KRKWRWLFKK-L
Cadena311	KLKFWLFFKK-R
Cadena312	KLKKFKLF-KR
Cadena313	RLKRFRLFRRKK
Cadena314	KRKRFRLF-KR
Cadena315	RLKRFRLF-KL
Cadena316	RRKRFRLF-KM
Cadena317	RRKRFRLF-RK
Cadena318	RWKRFRLF-KR
Cadena319	RWKRFRLF-KW
Cadena320	WKKGFGLFKK-M
Cadena321	WKKRFRLF-KL
Cadena322	WLRRFRLF-RL
Cadena323	RLKRFLFRKR
Cadena324	KRKFWLFFKK-L
Cadena325	KLKRFRLF-KR

Fig. 4c

Cadena100	DCWSAMIRLHAKYNQV
Cadena101	-----KIRLHRKRLRK
Cadena102	-----KKRLHRKRLRK
Cadena103	-----KLRLHAKRLRK
Cadena104	RKWRAMIRLHAKRLRK
Cadena105	RKWRAMIRLHAKWLRLK
Cadena106	-----WIRLHWKRLRK
Cadena107	-----WWRLHAKKKLW
Cadena108	-----WWRLHAKRKLW
Cadena109	-----WWRLHAKWKLW

*** *

Fig. 5a

Cadena 200	NRIVQQR-T-SS-R
Cadena 201	KWIVWRWR-FK-R
Cadena 202	RKIVKKRT-FK-R
Cadena 203	RRIVKLRW-FK-R
Cadena 204	RRLIWRRFKWL-R
Cadena 205	KRIVRWRT-RK-R
Cadena 206	KRIVRWWR-RK-R
Cadena 207	KRIVRWKR-LKRK
Cadena 208	WRILRWKR-LK-R
Cadena 209	WRIVRWKR-LK-R
Cadena 210	WRIVQWRK-LK-R

Fig. 5b

Cadena 300	YDKGFGLFK-KM
Cadena 301	IIKRFRLF-KL
Cadena 302	ILKRWWLF-KL
Cadena 303	IWKRFRLF-KR
Cadena 304	IWKRFRLF-KW
Cadena 305	RLKFWLKR-LK
Cadena 306	RLKRWRLF-KR
Cadena 307	RLKFWLFR-KR
Cadena 308	RLKWFLFR-KR
Cadena 309	WRKFWLFK-KR
Cadena 310	KRKWRWLF-KL
Cadena 311	KLKFWLFK-KR
Cadena 312	KLKKFKLF-KR
Cadena 313	RLKRFRLF-KRK

* * ;

Fig. 5c

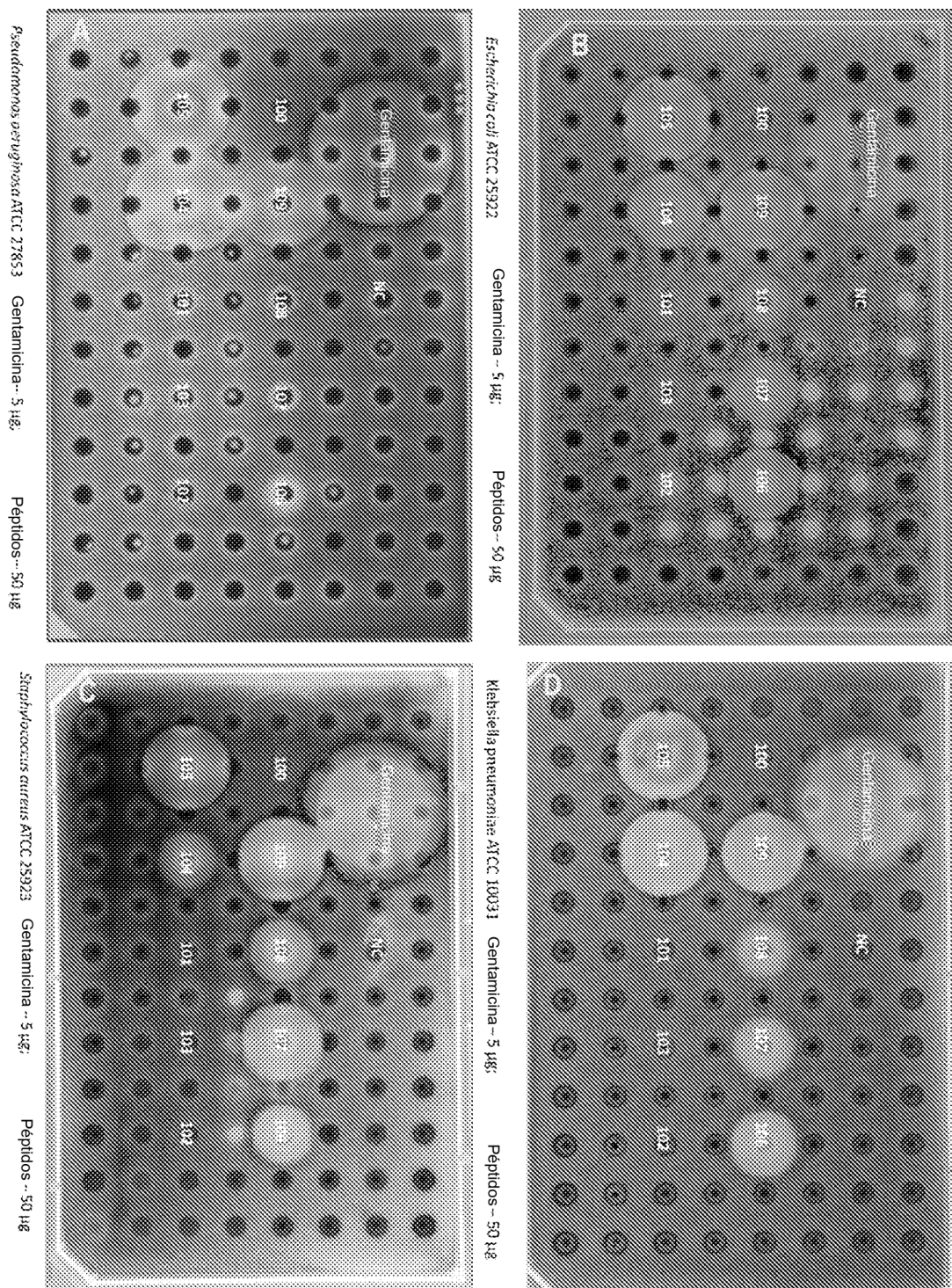


Fig. 6a

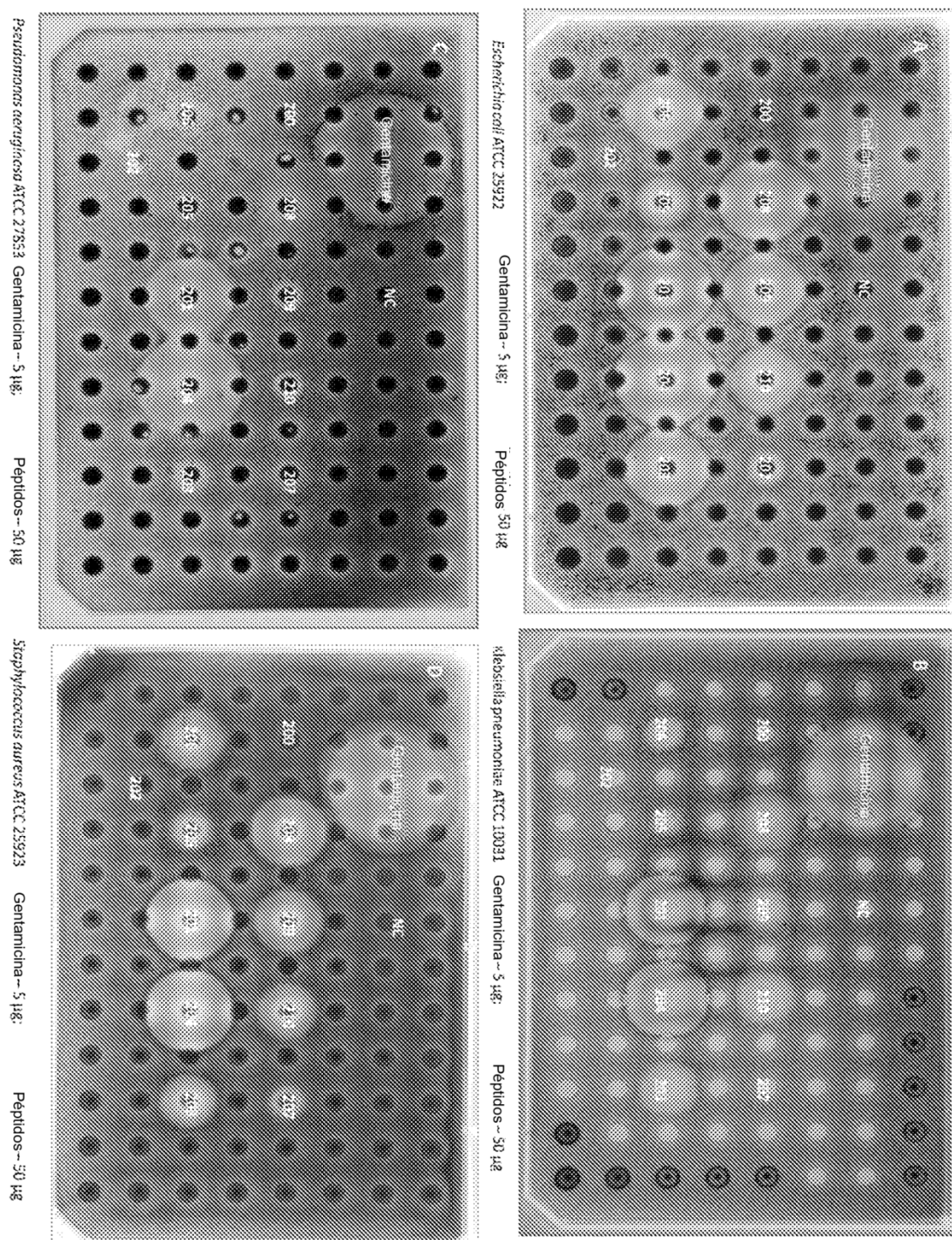


Fig. 6b

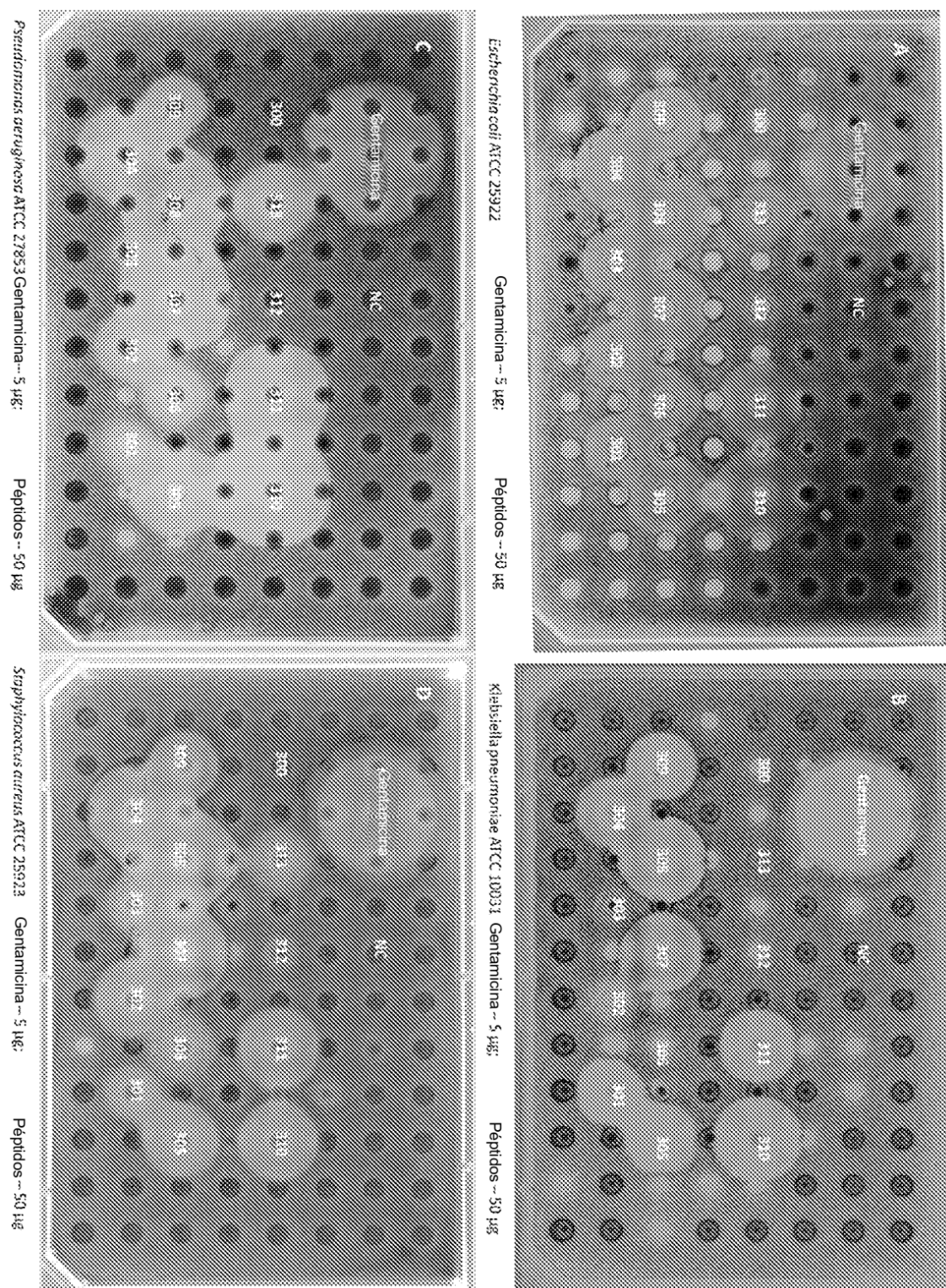
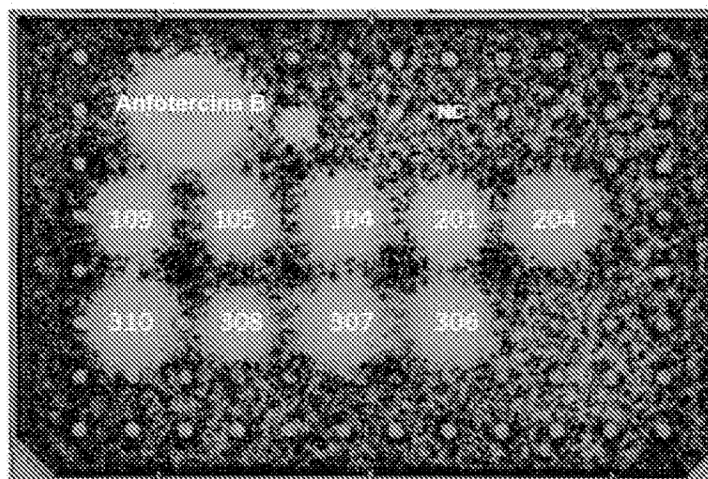


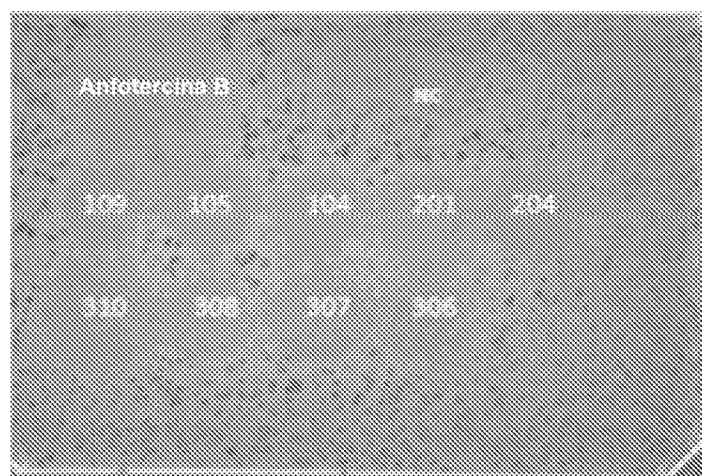
Fig. 6c



Aspergillus flavus DSM 1959

Péptidos: 20 µg; Anfotericina B 20 µg

Fig. 7a



Penicillium chrysogenum DSM 1075

Péptidos: 20 µg; Anfotericina B 20 µg

Fig. 7b

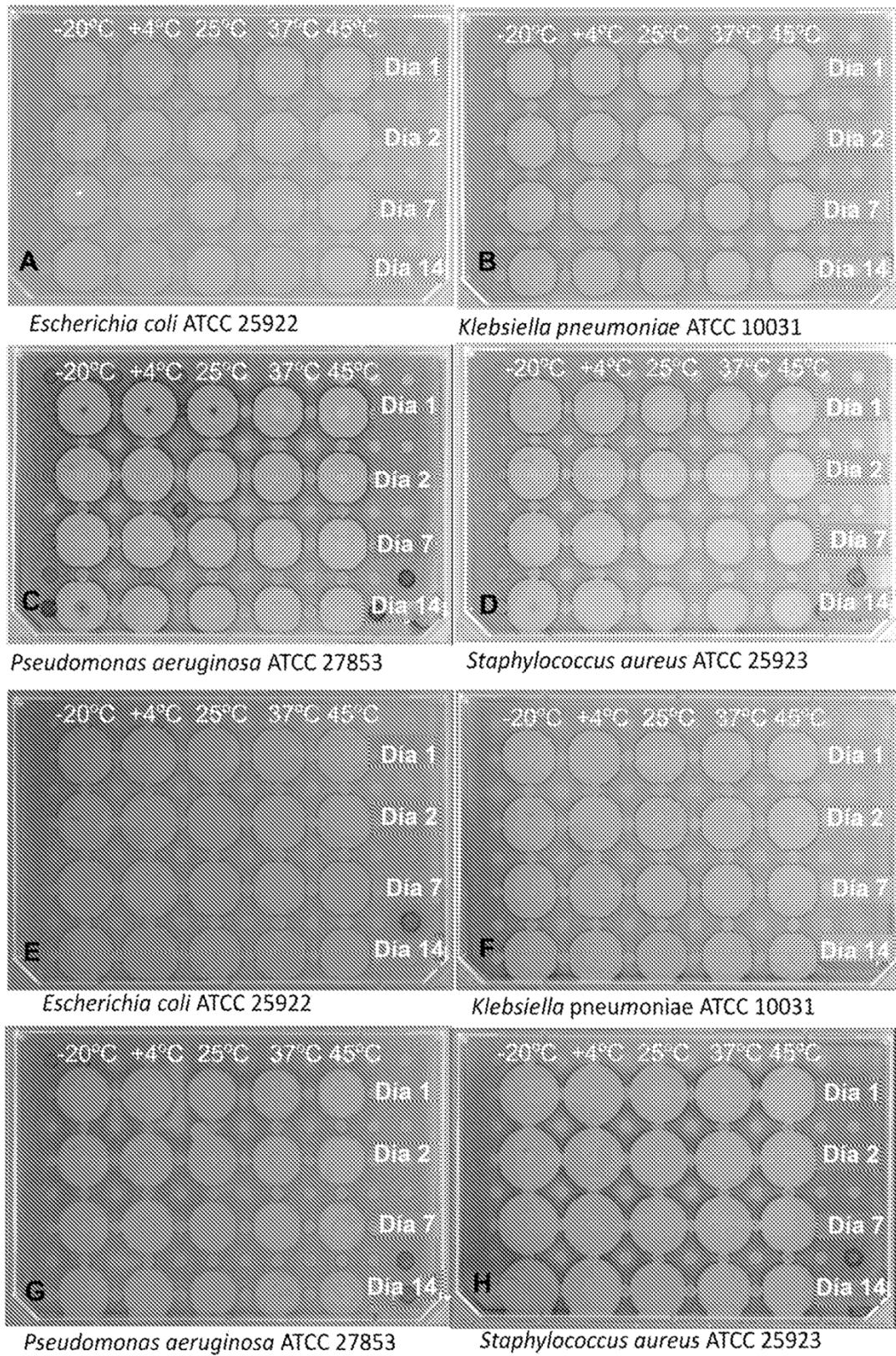


Fig. 8a

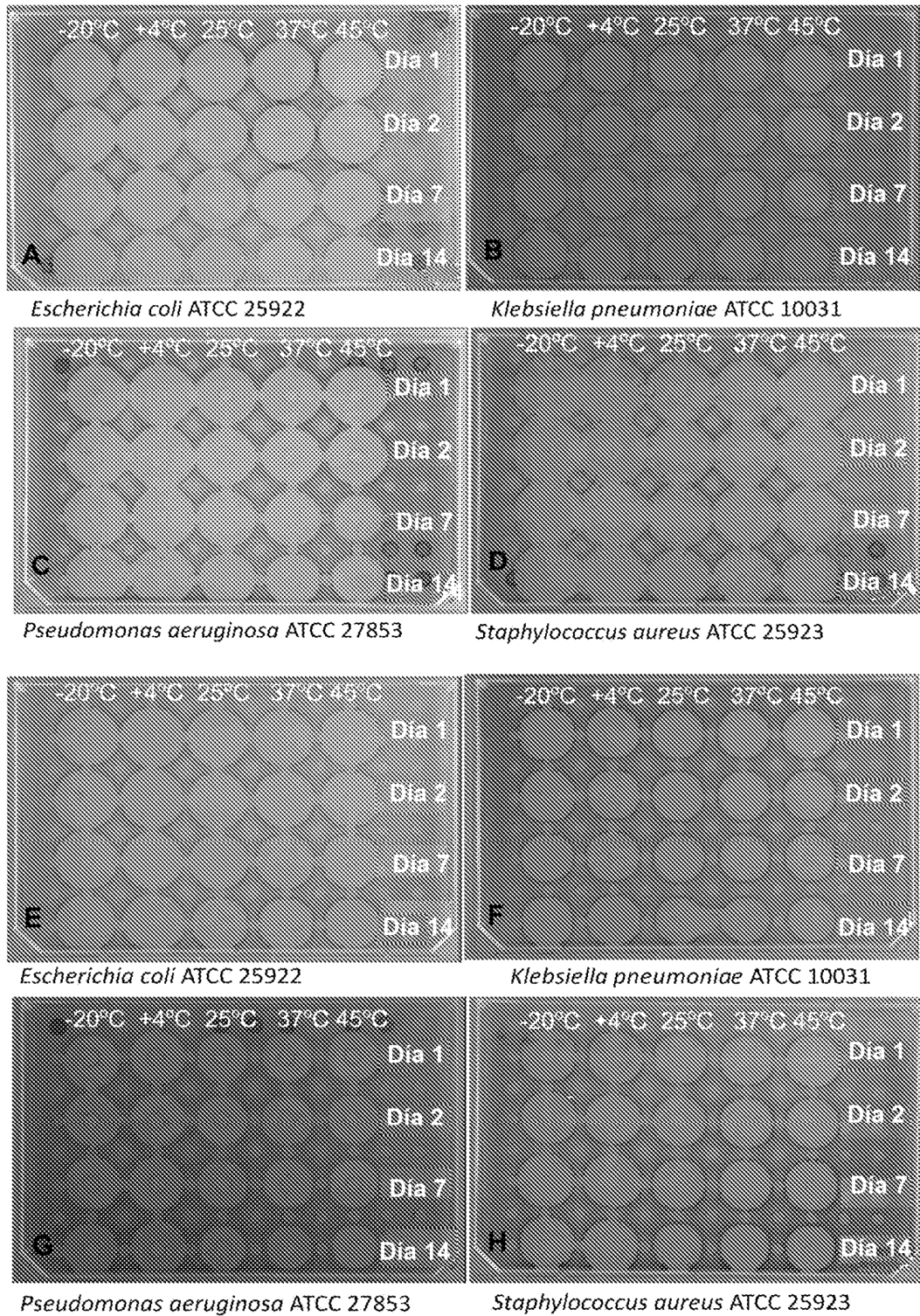


Fig. 8b

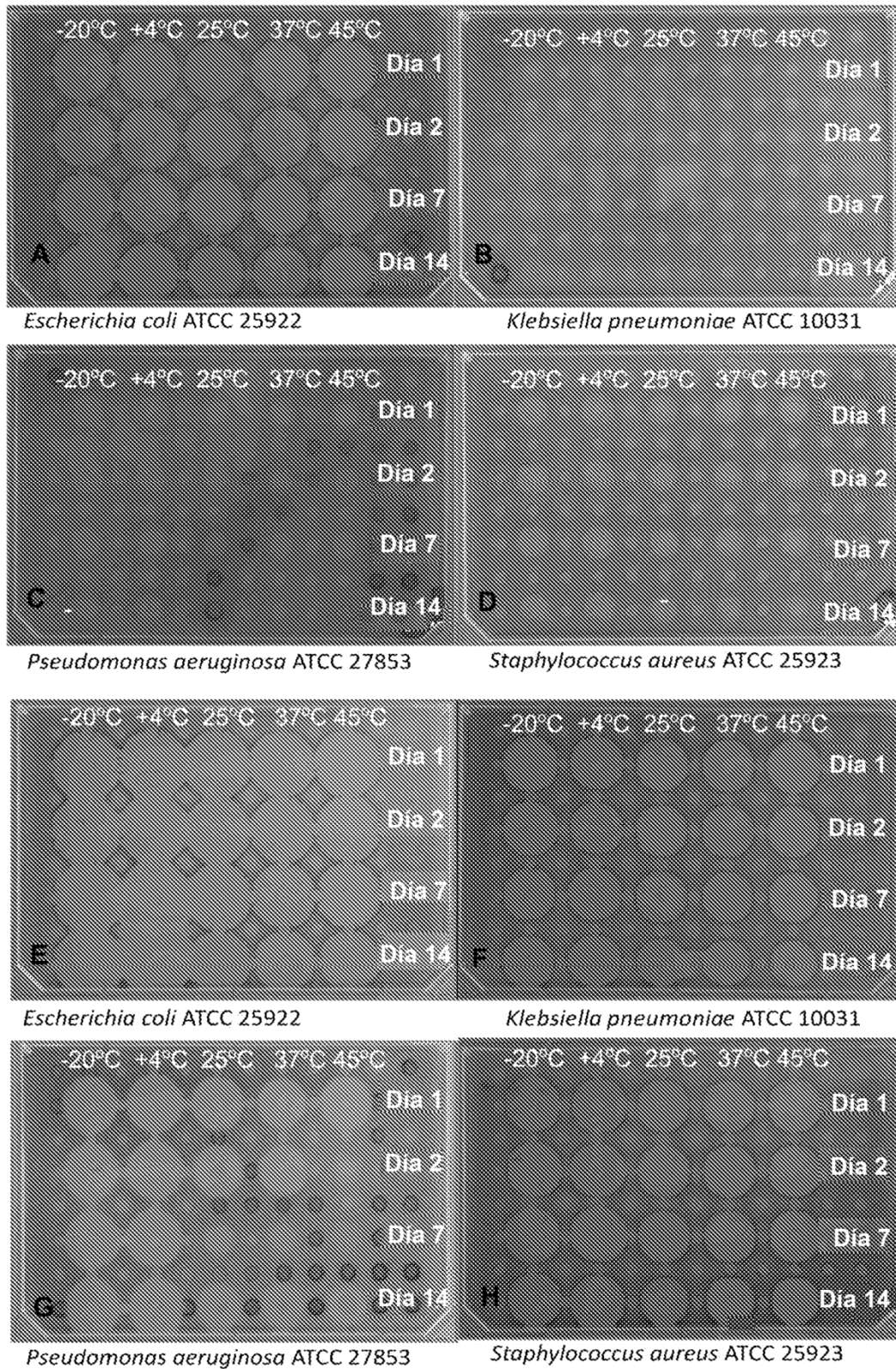


Fig. 8c

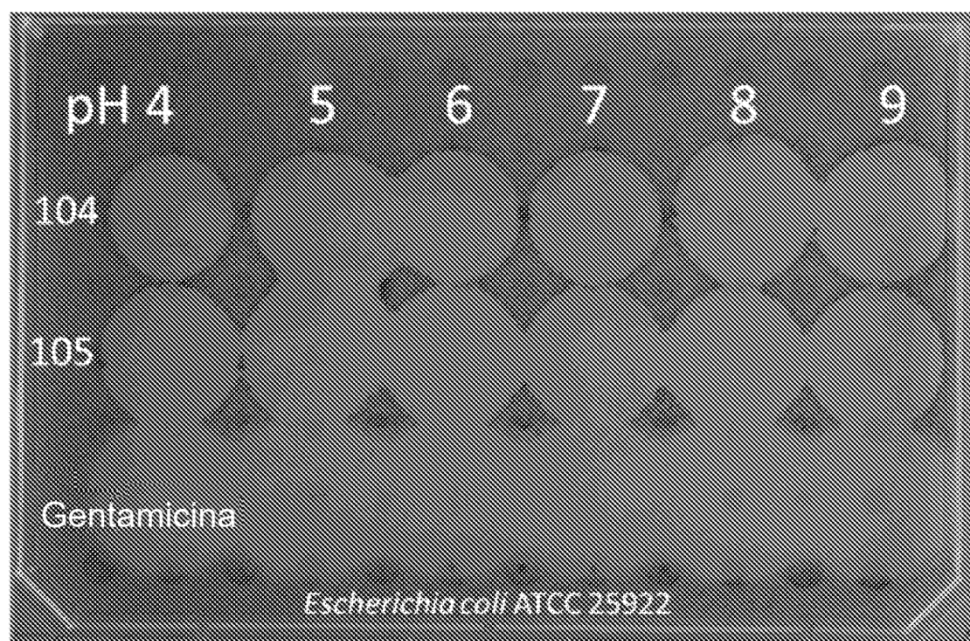


Fig. 9a

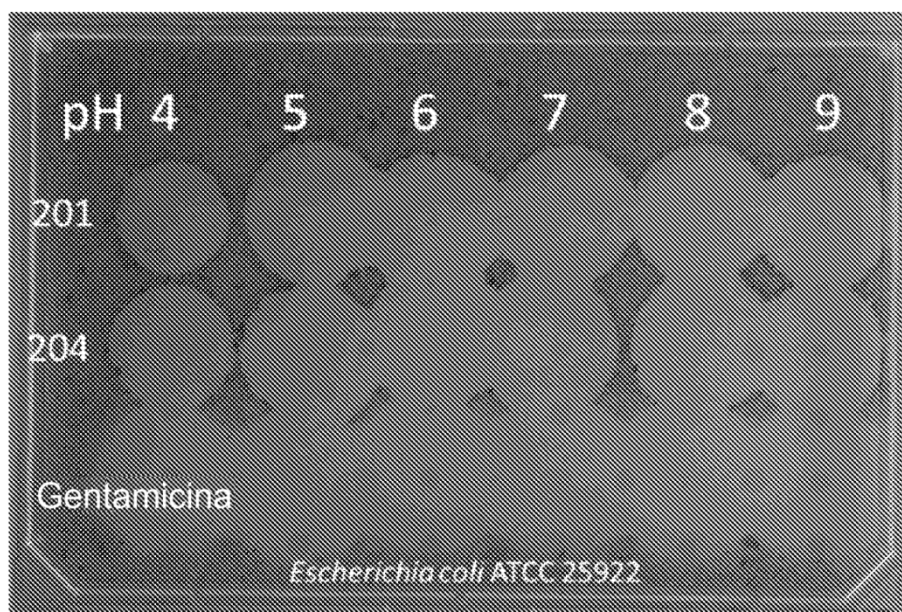


Fig. 9b

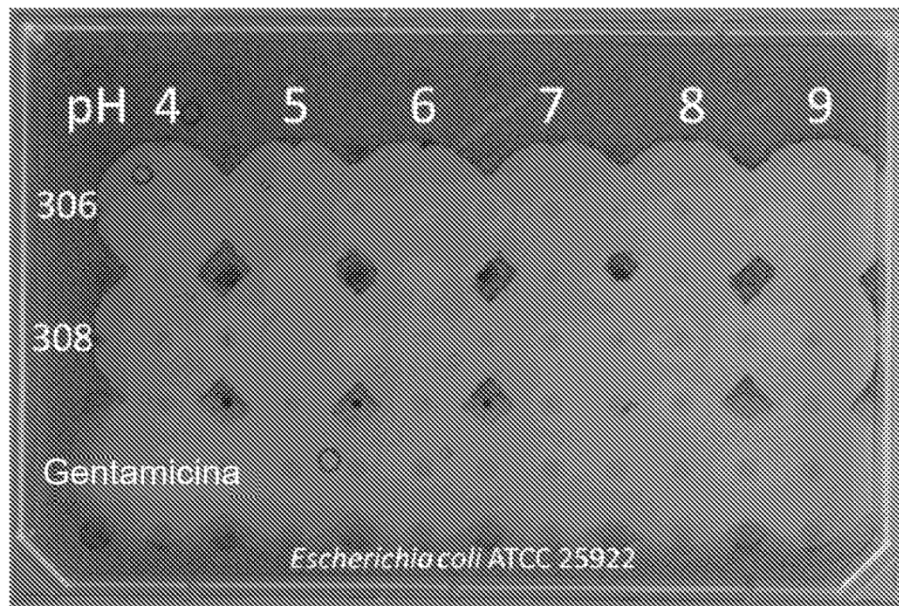


Fig. 9c

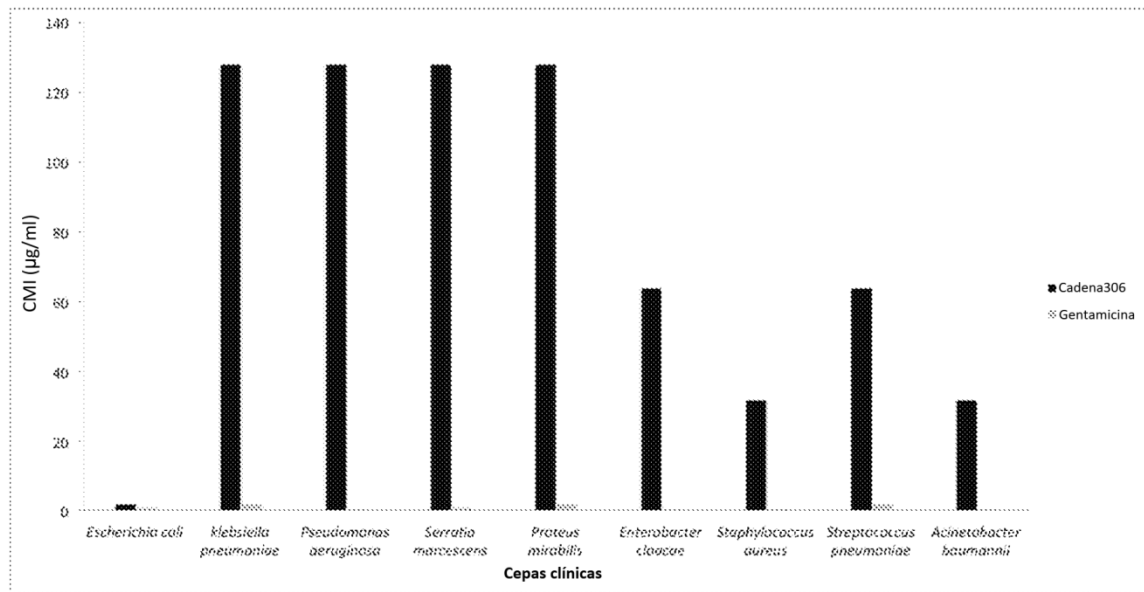


Fig. 10c

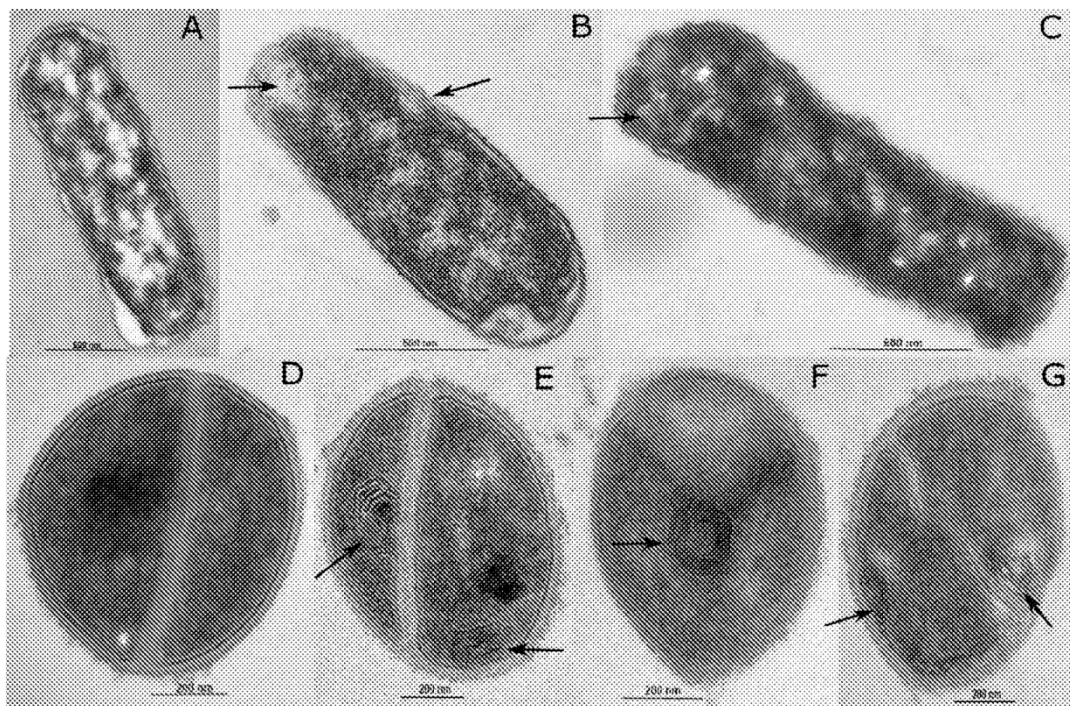


Fig. 11a

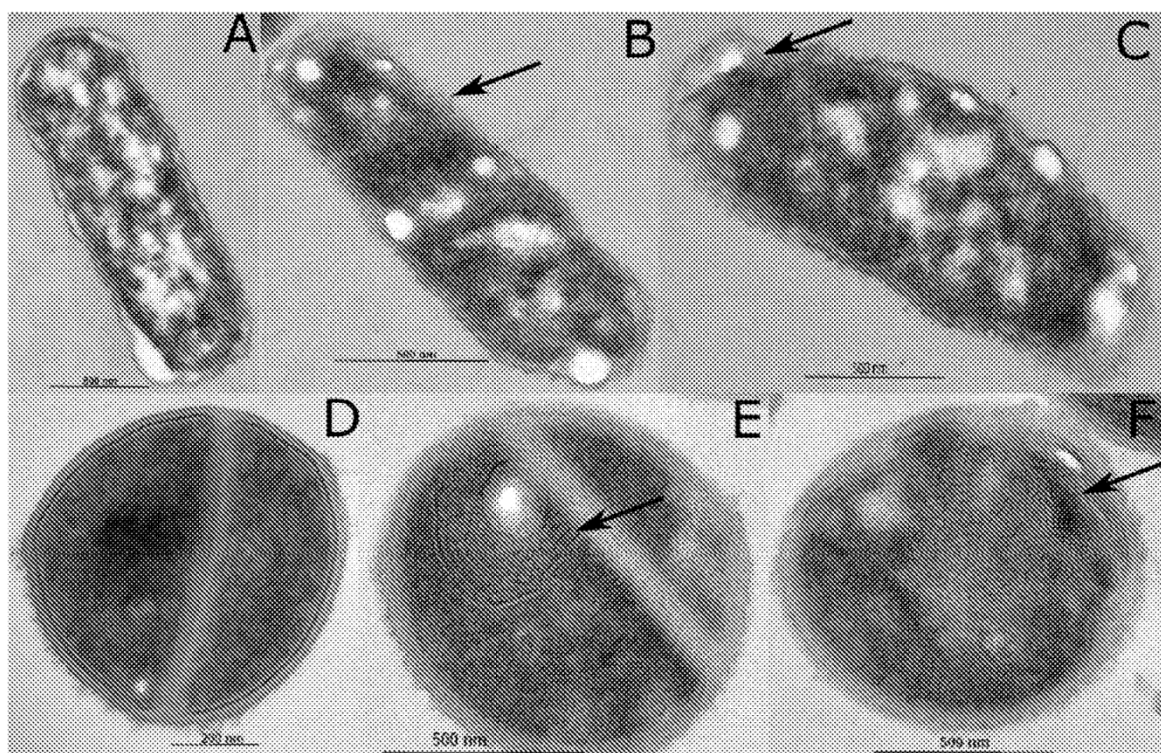


Fig. 11b

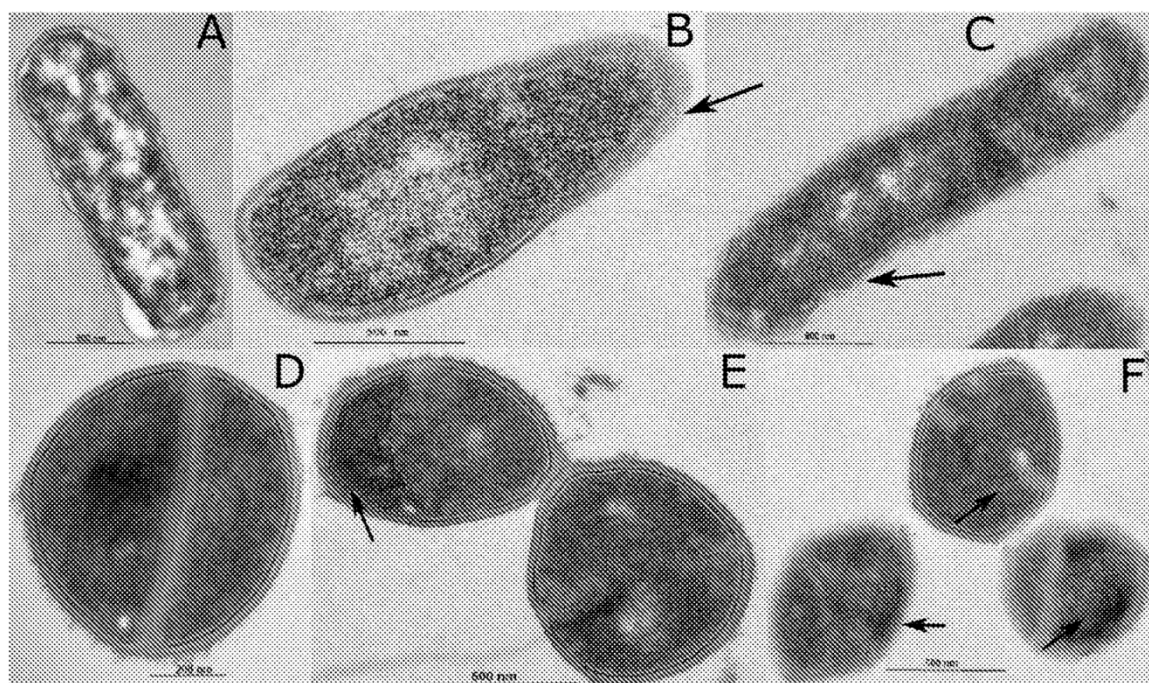


Fig.11c

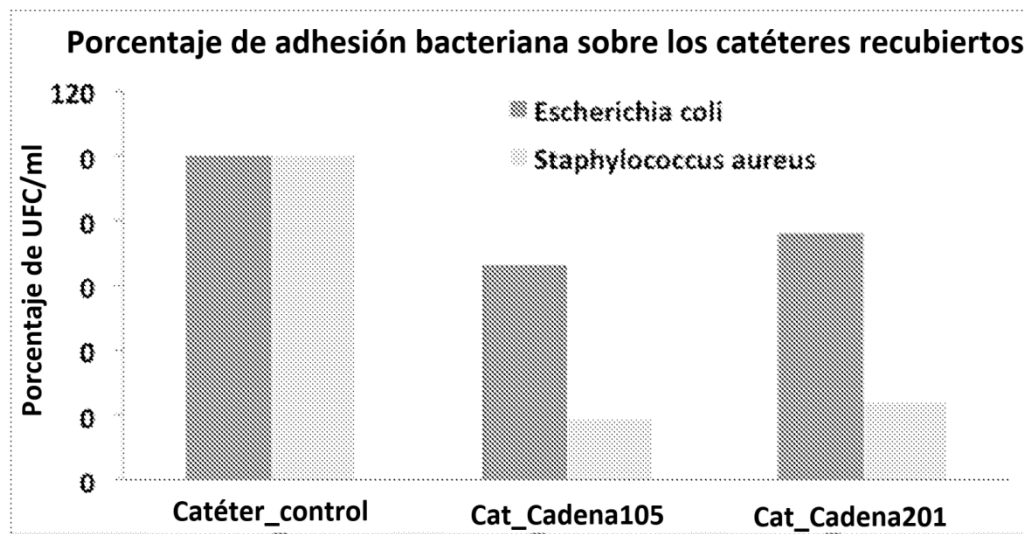


Fig. 12