

MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES SATANIN1-CPD-H8 Y SATANIN1-XA-XTEN-H8

Campo técnico de la invención

La presente invención hace parte del campo de procesos para la producción de péptidos antimicrobianos a través de sistemas bacterianos y puede ser utilizada en el sector farmacéutico o biomédico.

Antecedentes de la invención

Satanin 1 es un péptido antimicrobiano (AMP) de 37 aminoácidos de la familia de las cecropinas que fue identificado a partir del análisis del transcriptoma del cuerpo graso del escarabajo coprófago *Dichotomius satanas* (Harold, 1867), después de ser estimulado con un pool de microorganismos, incluyendo bacterias Gram positivas, Gram negativas y *Candida albicans* (G. A. T. Téllez et al., 2020). En ensayos *in vitro*, Satanin 1 ha demostrado tener actividad antimicrobiana contra microorganismos de relevancia clínica, como lo son bacterias Gram negativas (e.g *Klebsiella pneumoniae*) y Gram positivas (e.g *Staphylococcus aureus*) y hongos (*Candida parapsilosis*), entre otras actividades biológicas (resultados en proceso de publicación).

A pesar del potencial terapéutico de los AMPs, incluido Satanin 1, éstos presentan limitaciones técnicas para su obtención, debido a que, la tasa de biosíntesis de AMPs en sus sistemas naturales nativos es relativamente baja, y, además, una vez sintetizados, éstos son altamente susceptibles a la degradación proteolítica (Sinha & Shukla, 2019). De esta manera, el aislamiento *in situ* de los AMPs se convierte en un proceso tedioso de bajo rendimiento acompañado de insumos de alto costo y mucho tiempo (Parachin et al., 2012). Teniendo en cuenta estas limitaciones, y considerando la alta demanda de estas moléculas, puesto que, de éstas se requieren grandes cantidades para satisfacer las necesidades de investigación básica, así como de los ensayos clínicos (Y. Li, 2011b), se precisa de estrategias que permitan aumentar su disponibilidad, asegurando a su vez la maximización de su calidad, minimizando la mayor cantidad de tiempo y recursos monetarios (Sinha & Shukla, 2019). En respuesta a esto, actualmente se han usado al menos 3 estrategias principales

encaminadas a la obtención de AMPs: síntesis química en fase sólida; sistemas de expresión heteróloga; sistemas de expresión libres de células (da Cunha et al., 2017). En lo que respecta a la obtención de la cecropina Satanin 1, más allá del método tradicional de obtención mediante síntesis química, actualmente no se ha desarrollado un método que permita su producción.

Entre las estrategias anteriormente mencionadas, el uso de sistemas de expresión heteróloga basada en la tecnología del DNA recombinante, en comparación a otros métodos, como por ejemplo, el método tradicional de síntesis química, ha sido considerado uno de los enfoques más rentables para la obtención de grandes cantidades de AMPs debido a los menores tiempos y costos de producción (P. Li et al., 2012; Sampaio de Oliveira et al., 2020; Tay et al., 2011). Dentro de este enfoque, varios sistemas biológicos de expresión han sido empleados como bacterias, levaduras, células de mamíferos, cultivos celulares de insectos y plantas genéticamente modificadas (Sampaio de Oliveira et al., 2020).

A través del uso de sistemas bacterianos de expresión heteróloga se ha logrado la producción de más del 80% de los AMPs recombinantes (Y. Li & Chen, 2008). *Escherichia coli* es una de las plataformas de expresión heteróloga de péptidos antimicrobianos más empleadas, en donde las ventajas principales que podrían explicar su uso constante son: 1. Pueden crecer en medio de cultivos económicos; 2. Sus tiempos generacionales son relativamente cortos; 3. Son altamente eficientes para incorporar DNA foráneo y expresar proteínas heterólogas a una tasa alta; 4. Las condiciones de expresión son escalables para la producción masiva de AMPs; 5. Hay una amplia disponibilidad comercial de cepas, vectores de clonación y expresión, así como protocolos, que pueden ser ajustados a las diferentes necesidades de acuerdo con la naturaleza de los AMPs de interés a producir (Kaur et al., 2018; P. Li et al., 2012; Parachin et al., 2012; Rosano & Ceccarelli, 2014; Sørensen & Mortensen, 2005; Zerbs et al., 2014).

A pesar de sus numerosas ventajas, el sistema *E. coli* presenta varias consideraciones de fondo que podrían limitar su capacidad para producir péptidos antimicrobianos. En primer lugar, dadas las propiedades antibacterianas naturales del péptido en cuestión, este podría tener un efecto potencialmente citotóxico para las

células hospedadoras, pudiendo afectar el crecimiento celular durante el proceso de producción (Zorko & Jerala, 2010). Por otro lado, al considerar las propiedades estructurales de los péptidos antimicrobianos, tales como, sus tamaños relativamente pequeños junto con una alta cationicidad, los convierte en moléculas altamente susceptibles a la degradación proteolítica por parte de las proteasas endógenas de la célula hospedadora (Rosano & Ceccarelli, 2014). De esta manera, cualquier intento de producción de péptidos antimicrobianos empleando *E. coli* como sistema bacteriano de expresión heteróloga debe atender estas consideraciones, para así elegir una célula huésped de expresión que se ajuste a las propiedades del péptido antimicrobiano de interés a producir, y así garantizar una producción efectiva del mismo.

La adecuada elección de cepa como célula huésped de expresión es uno de los principales factores a considerar en el intento de atender las limitaciones previamente descritas. Entre las diversas cepas de *E. coli*, la cepa BL21 (DE3) figura entre las más populares para la expresión de AMPs recombinantes (Sinha & Shukla, 2019). Esta es una cepa con una constitución genética deficiente de proteasas específicas (Lon y OmpT), lo que permite en teoría reducir los niveles de degradación proteolítica, favoreciendo un mejor rendimiento de producción de la proteína recombinante de interés. Otra característica clave de esta cepa, es que en su genoma cromosomal existe una copia del gen que codifica la RNA polimerasa del fago T7, y de esta manera permite tener un sistema de control de la expresión inducible del gen clonado (e.g AMP) bajo el control del promotor T7 (Studier & Moffatt, 1986). Previamente, esta cepa ha sido empleada en diferentes invenciones para la producción exitosa de diversos AMPs recombinantes (e.g US008003348B2; EP2650304B1; US20060148029A1; WO2005019242; US007595173B2; EP1680503B1; WO2020169602; US20150230466A1; CN104448004A; RU2347811C1; US20160257724A1; CN103436538A) entre las que se encuentran algunas cecropinas (e. g CN102220364A; WO2005019242A8). A pesar de ser una cepa estándar no sólo para la producción de péptidos antimicrobianos recombinantes, sino para las proteínas recombinantes, en esta cepa se ha evidenciado la expresión basal de la proteína de interés en ausencia de los inductores de expresión, fenómeno que, en la producción de una proteína tóxica, puede afectar el crecimiento celular y por ende, el rendimiento general en la producción del péptido recombinante (Rosano &

Ceccarelli, 2014). Atendiendo a este fenómeno, se han desarrollado cepas derivadas de *E. coli* BL21 para la producción de proteínas tóxicas, y que han sido incorporadas en diferentes invenciones para la producción de AMPs recombinantes, tales como *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (e.g CN107827969A, US20110015118A1, US20180186843A1, US20150230466A1), *E. coli* BL21 (DE3) pLysE (e.g US20090311278A1) *E. coli* BL21 pRARE (US20180186843A1), *E. coli* BL21 C41(DE3) (US20150230466A1). *E. coli* BL21-AI (US7795382B2, US7678883B2, US20130164353A1). A pesar de que existe un amplio catálogo de cepas, no existe una cepa universal que garantice al 100% la producción exitosa de péptidos antimicrobianos recombinantes, ya que, cada AMP tiene propiedades biológicas y fisicoquímicas específicas, que a su vez pueden afectar diferencialmente en menor o en mayor medida a los sistemas bacterianos de expresión heteróloga, y en consecuencia, el rendimiento de producción. De esta manera, al momento de producir proteínas recombinantes, en este caso, péptidos antimicrobianos recombinantes, siempre deben ser consideradas sus propiedades biológicas y fisicoquímicas, para así, orientar la elección de cepas cuyas características genéticas, así como metabólicas, se ajusten a la molécula de interés, y de esta manera, aumentar las probabilidades de que el sistema de expresión heteróloga sea exitoso.

Más allá de la elección de la cepa de *E. coli*, diferentes invenciones que han desarrollado métodos para la producción de AMPs empleando sistemas bacterianos han atendido la susceptibilidad a la degradación proteolítica así como la actividad biológica contra las células huésped a partir del uso de etiquetas de fusión tales como SUMO (WO2008140582), GST (CN103467584), thioredoxin (RU0002580031), MBP (WO2019052588), purF (US6699689B1), entre otras, que han demostrado aumentar la solubilidad, evitar la degradación proteolítica, así como neutralizar la actividad biológica contra las células huésped, además de llegar a ser útiles durante la etapa de purificación y liberación del AMP recombinante. Por ejemplo, en US5206154A idearon un método para producir cecropinas empleando como etiqueta de fusión un polipéptido que permitió enmascarar el efecto bactericida de la cecropina; en US5593866A utilizaron como etiqueta de fusión un péptido aniónico que evitó la degradación del péptido por proteasas. En otros enfoques, como en US6946261B1 se han empleado polipéptidos insolubles como etiquetas de fusión que inducen la formación de cuerpos de inclusión, y que posteriormente son tratados para recuperar

el AMP en cuestión. Sin embargo, una de las grandes desventajas del uso de estas etiquetas de fusión es el costo asociado a éstas durante las etapas de liberación y purificación del AMP, debido a que, suelen requerirse reactivos y/o materiales adicionales, junto con pasos experimentales adicionales para tal fin (Y. Li, 2011a).

Un enfoque que atiende a estas limitaciones descritas en el empleo de etiquetas de fusión ha sido el uso de etiquetas de auto-escisión como las inteínas. Sin embargo, la funcionalidad de éstas sólo se limita a la etapa de recuperación del péptido mediante su mecanismo de auto-escisión y no se ha demostrado que contribuyan a disminuir la degradación proteolítica o la toxicidad contra la célula huésped (Wood & Camarero, 2014). Alternativamente, se ha descrito el uso de CPD identificado en *Vibrio cholerae* (Lupardus et al., 2008) como etiqueta de fusión para la producción de proteínas recombinantes. Éste podría aumentar la solubilidad, expresión y estabilidad de la proteína recombinante (Shen et al., 2009). A diferencia de las etiquetas de fusión empleadas en las patentes anteriormente mencionadas, CPD es autocatalítico, por lo que no requiere la participación de enzimas adicionales, sino que, la liberación de la proteína de interés se logra al incubar la proteína de interés en un período relativamente corto con el azúcar inositol hexa-kis-fosfato que induce el auto escindido y liberación de la proteína de interés en un sitio específico de CPD (motivo Leu-Gly-Ser), permitiendo así obtener en teoría al AMP puro (Shen et al., 2009). Previamente esta etiqueta de fusión ha sido empleada para la producción de diferentes proteínas recombinantes (Biancucci et al., 2017; Kwon et al., 2020; Shen et al., 2009), y en el caso de la producción específica de péptidos antimicrobianos, solamente ha sido empleado para la obtención de cathledicinas (Wright et al., 2012) y cecropinas (G. A. Téllez & Castaño-Osorio, 2014) únicamente con fines investigativos.

Aunque existe una amplia variedad de etiquetas de fusión empleadas para la producción recombinante de péptidos antimicrobianos, al igual que las cepas, no existe una etiqueta de fusión universal que garantice al 100% la neutralización de la actividad biológica de la proteína recombinante para disminuir su toxicidad hacia la célula huésped; que aumenta su solubilidad o que disminuya la susceptibilidad de degradación proteolítica del péptido en cuestión. La utilidad o no de una determinada etiqueta de fusión dependerá de la interacción entre sus propiedades estructurales y fisicoquímicas con las propiedades del péptido en cuestión.

Aparte de las limitaciones técnicas que deben ser atendidas al momento de producir AMPs empleando *E. coli* como sistema bacteriano de expresión heteróloga, existen dos problemas principales que han obstaculizado el desarrollo de AMPs con potencial aplicabilidad terapéutica como Satanin 1. El primero es que la selectividad de los AMPs por las bacterias es relativamente baja, y de esta manera, en ensayos *in vitro* se ha observado un cierto grado de toxicidad en células eucariotas, por lo que, los AMPs podrían desencadenar una toxicidad sistémica (Brunetti et al., 2016), y el segundo problema está relacionado con la vida media en suero que generalmente es corta debido a sus propiedades estructurales (Roscia et al., 2013).

El primer problema puede ser atendido al restringir o limitar la bioacumulación del AMP (Drayton et al., 2020). Previamente, el uso de polímeros sintéticos como vehículos para la entrega de AMPs han sido considerados como elementos potencialmente útiles para reducir la bioacumulación, entre los que se encuentran PLGA (Makadia & Siegel, 2011) y HGP (Wilms et al., 2010).

En relación al segundo problema, tradicionalmente el mejoramiento de la farmacocinética de los péptidos o drogas biológicas se ha realizado a través de la conjugación de éstos con polietilenglicol (PEG) lineal o de cadena ramificada, resultando en un aumento de la masa molecular, el radio hidrodinámico y la vida media en suero del fármaco (Strohl, 2015; ver WO2019129876A1). Sin embargo, este enfoque se ve limitado debido a que es costoso, y se requieren de pasos adicionales para conjugarlo con el fármaco biológico, seguido de un proceso de purificación del conjugado (Fee & Van Alstine, 2011). Alternativamente, se ha hecho el uso de fusión de proteínas que han sido capaces de prolongar la vida media circulatoria de los fármacos biológicos *in vivo*. A diferencia del uso de PEG, este enfoque ofrece ventajas principales como: 1. Reducir los costos asociados al tiempo y proceso de conjugación química y re-purificación de drogas biológicas PEGiladas. 2. El constructo entero puede obtenerse en una reacción de un solo recipiente en *E. coli* para muchos péptidos y proteínas pequeñas; 3. Sólo se requiere de una etapa de purificación; 4. Los péptidos, aunque en gran parte son resistentes a las proteasas extracelulares, se degradan lentamente mediante procesos naturales *in vivo*. Por ejemplo, las proteínas terapéuticas fusionadas con dominios de la Fc de la IgG (WO2010045193A1),

albúmina de suero humano (US5876969A), polipéptidos no estructurados como XTEN (US10870874B2) y PAS (WO2016130451A1), así como a polipéptidos altamente catiónicos (CTP fusion; US20160168588A1), han demostrado aumentar la vida circulatoria *in vivo* en comparación con las moléculas terapéuticas no fusionadas. El uso de la tecnología del DNA recombinante y las variaciones en ellas, como lo son el uso de proteínas de fusión, constituyen una alternativa económica para el aumento de la disponibilidad de los péptidos antimicrobianos, además de poder contribuir positivamente a su aplicabilidad terapéutica (e.g disminuir la toxicidad hacia células eucariotas y/o alargar su vida media en el suero humano). Sin embargo, a pesar del éxito de este enfoque para la producción de proteínas recombinantes así como péptidos antimicrobianos, y en especial, las cecropinas, no existe un proceso universal para la producción de estas biomoléculas. Cada una de las etapas dentro del proceso de producción, desde la elección de cepas, etiquetas de fusión, así como la purificación, requiere ser ajustado de manera específica para cada molécula en particular, ya que, cada una cuenta con propiedades físico-químicas y biológicas específicas. Incluso una vez diseñado el sistema de producción acorde con el péptido antimicrobiano de interés, es importante resaltar que, la expresión heteróloga por sí misma suele desencadenar situaciones estresantes para las células huésped, en donde las moléculas producidas no pueden lograr plegamiento adecuado y terminar agregado en cuerpos de inclusión, afectando así el rendimiento de la producción (Costa et al., 2014).

Teniendo en cuenta las consideraciones previamente expuestas, en el estado de la técnica persiste la dificultad para lograr la expresión heteróloga de péptidos antimicrobianos en células huésped.

Descripción breve de la invención

La presente invención resuelve este problema al proveer un método para la producción recombinante de un péptido de *Dichotomius satanas* con potencial actividad antimicrobiana, mediante la expresión de un ácido nucleico contenido en el plásmido pD454MR-Satanin1-Xa-Xten-H8 y pD454MR-Satanin1-CPD-H8, el cual contiene el inserto para producir las proteínas quiméricas Satanin1-Xa-Xten-H8 y Satanin1-CPD-H8 en una célula huésped de *Escherichia coli* BL21-AI, que

comprende los pasos de 1. inducción de la expresión con L-arabinosa e IPTG y 2. purificación del péptido mediante la técnica de cromatografía líquida con metal inmovilizado (IMAC) para obtener un constructo recombinante con actividad antimicrobiana.

Una ventaja del método propuesto es que considerando la eventual multifuncionalidad de las etiquetas de fusión, una forma en la que se podría reducir la bioacumulación sería haciendo uso de la etiqueta CPD como etiqueta de autodegradación. Esto se logra en el momento en el que Satanin 1 fusionado con CPD se expone al inositol-hexa-kis-fosfato, molécula que solo está presente al interior de las células eucariotas, activando la etiqueta catalítica (CPD: dominio cistein proteasa) que corta el péptido en distintos fragmentos inactivándolo, este evento por lo tanto, solo sucedería al interior de las células eucariotas, reduciendo su toxicidad. Previamente no se ha reportado el uso de CPD con este objetivo, por lo que esta invención es la primera en considerar este uso alternativo para controlar la actividad de una proteína-péptido con potencial terapéutico.

Adicionalmente, la invención puede ser utilizada para la obtención del péptido cecropina Satanin 1 purificado, y con ello, el desarrollo de tratamientos para enfermedades infecciosas, el desarrollo de dispositivos a nivel biomédico y farmacéutico.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Modelamiento estructural de las proteínas realizado con la herramienta bioinformática RaptorX (Källberg et al., 2012). Coloreado en rojo (péptido Satanin 1), en azul (CPD) y en verde (H8). A. Satanin1CPDH8 y B. Satanin1-Xa-Xten-H8.

Figura 2. Diseño de los plásmidos de expresión de las proteínas recombinantes Satanin1CPDH8 y Satanin1XtenH8.

Figura 3. Clonación de los plásmidos de expresión. Cajas de petri con medio Luria-Bertani (LB) con (100 µg/mL) y sin ampicilina en las dos bacterias (*E. coli* BL21DE3 y

E. coli BL21 AI) y plásmidos de expresión (Satanin1CPDH8 y Satanin1XtenH8) utilizados.

Figura 4. Expresión de las proteínas recombinantes Satanin1-CPD-H8 y Satanin1-Xa-Xten-H8. A) Cinética de crecimiento, en rojo (Satanin1-CPD-H8) y en azul (Satanin1-Xa-Xten-H8), B) ELISA de expresión de las proteínas y C) Curva de crecimiento de bacterias y curva de producción de la proteína.

Figura 5. Expresión de las proteínas antimicrobianas recombinantes. (A) ELISA de expresión Satanin1-Xa-Xten-H8 y Satanin1-CPD-H8 en *E. coli* BL21-DE3 con IPTG variable a 60 min post inducción. (B) ELISA de expresión de las proteínas antimicrobianas recombinantes en *E. coli* BL21-AI IPTG constante, L-Arabinosa variable. (C) ELISA de expresión de las proteínas antimicrobianas recombinantes en *E. coli* BL21-AI con IPTG y L-Arabinosa variables.

Figura 6. Purificación de la proteína recombinante Satanin1CPDH8 por cromatografía líquida de afinidad con metal inmovilizado. A) C) y E). Cromatogramas isocrático (A), Gradiente (C), isocrático en pasos (E). B) C). y F). Electroforesis de proteínas Tricina SDS PAGE. (FNR: fracción no retenida; FR fracción Retenida) la numeración de la fracción retenida corresponde al pico observado en la cromatografía.

Figura 7. Microdilución en placa de la proteína recombinante Satanin1-CPD-H8 purificada frente a *E. coli* 25922. CE: control de esterilidad de la proteína. CM: Control medio. CB: control de crecimiento de bacterias.

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe un proceso para la producción recombinante del péptido Satanin 1, bajo un constructo de ADN recombinante diseñado para producir el péptido Satanin 1 y que conserva su actividad antimicrobiana.

El péptido Satanin 1 es un péptido antimicrobiano de la familia de las cecropinas identificado a partir del análisis transcriptómico del cuerpo graso del escarabajo coprofago *Dichotomius satanas* (G. A. T. Téllez et al., 2020). Este péptido se

encuentra en la naturaleza con la secuencia de aminoácidos (SEC N°1):
RSKKWRKIEKRVKKIFEKTKEALPVIQGVATIVGAVGR

Esta secuencia corresponde al péptido maduro, y se la puede consultar a través del transcriptoma público de *Dichotomius satanas* en el Genbank bajo la secuencia con el código de acceso N° GHMA01330254. Este péptido se ha encontrado que tiene actividad antimicrobiana e inmunomoduladora, lo cual lo convierte en un candidato con potencial aplicación en la industria biomédica con enfoque humano o veterinario.

Una ventaja de la presente invención radica en la capacidad de producir el péptido Satanin 1 por métodos recombinantes, obtenido por medio de la fusión de este a proteínas como el dominio cistein proteasa de la toxina colérica (CPD) y el dominio XTEN, así como, el uso de una etiqueta de purificación de poli-histidinas. El uso de la etiqueta CPD como etiqueta de autodegradación, reduce la bioacumulación del péptido en las células. Esto se logra en el momento en el que Satanin 1 fusionado con CPD se expone al inositol presente en las células eucariotas. Esta etiqueta además podría contribuir a reducir los costos asociados al proceso de purificación, ya que, ésta es autocatalítica y requiere de menos pasos, tiempos y reactivos para la liberación del péptido puro.

Estos constructos fueron clonados en el plásmido pD454MR (ATUM biotechnology) el cual es un plásmido de expresión regulado por el promotor T7 e inducible por IPTG que cuenta como marcador de selección a una betalactamasa que le confiere a la bacteria resistencia a la ampicilina, el cual presenta un origen de replicación de alta copia pUC y un sitio de unión al ribosoma de intensidad media (**Figura 2**). A continuación se describen las fases metodológicas para obtención del producto de esta invención:

1. Clonación de los constructos

Los constructos pueden ser clonados en sistemas bacterianos de expresión heteróloga como *Escherichia coli* BL21, *Escherichia coli* BL21 AI, *Escherichia coli* BL21 rosetta, por técnicas conocidas en el campo técnico como la electroporación, choque térmico, y posteriormente ser seleccionadas a partir de marcadores de selección (e.g resistencia antibiótica) presentes en los plásmidos de expresión, esto

con el fin de aislar las colonias de bacterias eficientemente transformadas con los plásmidos de expresión que contengan los constructos genéticos para producir el péptido Satanin1.

2. Expresión de las proteínas recombinantes Satanin1-CPD-H8 y Satanin1-Xa-Xten-H8.

Independientemente de la elección de la célula huésped de expresión, éstas deben crecer en un medio selectivo con el fin de garantizar que contengan los plásmidos con los constructos a expresar. El compuesto selectivo a emplear dependerá del tipo de marcador de selección presente en los plásmidos de expresión (e.g resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol, etc). Cuando se emplean sistemas bacterianos de expresión heteróloga que dependen del inductor IPTG (e.g *E. coli* BL21-DE3, *E. coli* BL21- AI), la concentración final que se emplea suele oscilar entre 0,01 mM - 5 mM. Por otro lado, en sistemas en los que aparte del IPTG, se requiere L-arabinosa para llevar a cabo la expresión (e.g *E. coli* BL21-AI), ésta suele añadirse en una concentración entre 0,001 % a 1 % (w/v). La temperatura de incubación pre y post-inducción de los sistemas bacterianos de expresión heteróloga varía entre 15 °C - 37 °C. Finalmente, la inducción de la expresión de los constructos recombinantes suele llevarse a cabo cuando en su crecimiento alcanzan la mitad de la fase logarítmica (DO600 0,5 - 0,7), aunque también se puede inducir en etapa temprana o tardía de la fase logarítmica.

3. Purificación de los péptidos recombinantes Satanin1-CPD-H8 y Satanin1-Xa-Xten-H8

En relación con el proceso de purificación, las etiquetas de polyHis pueden interactuar de manera específica con metales inmovilizados en columna, permitiendo la retención, y posterior purificación de las proteínas recombinantes. El proceso de purificación de constructos recombinantes fusionados con polyHis suele llevarse a cabo a través de una cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC), que se fundamenta en la interacción entre las histidinas cargadas negativamente (o residuos de Ser, Cys, Glu, o Asp en caso de otras etiquetas de afinidad) junto con iones de metales de transición ya sea Ni^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , que se encuentran inmovilizados en una matriz con un agente quelante (e.g NTA, IDA, CM Asp, TED, etc).

En el proceso de purificación, con el fin de promover la unión de la proteína recombinante con la columna se requiere de un *buffer* de unión cuya composición permita establecer las condiciones adecuadas para mediar la interacción, y evitar la unión no deseada de posibles contaminantes a la columna. Este *buffer* por lo general se compone de *buffer* fosfato o acetato, una sal que impida la interacción iónica con la matriz sólida (cloruro de sodio (0,3 M - 1 M) e imidazol (0,1 mM a 40 mM) en un rango de pH (pH 7 - 8). El imidazol es un ligando que durante el proceso de unión se emplea a bajas concentraciones (e.g 20 mM - 40 mM) para permitir su unión a la columna, evitando así la unión no deseada de otras proteínas a la columna.

Posteriormente, al momento de purificar la proteína acoplada a la columna, se emplea un *buffer* de elución que cambia las condiciones del medio de tal forma que se revierta la interacción entre la proteína recombinante y la columna, permitiendo la recuperación de ésta. Existen tres enfoques principales para llevar a cabo la elución:

1. Cambiando las condiciones del buffer (e.g pH);
2. Cambios extremos de pH (e.g pH 4,5 - 5,3) o empleando altas concentraciones de agentes caotrópicos (e.g urea) ;
3. A través de elución competitiva al añadir una sustancia que compite por la unión al metal (e.g imidazol) (0,1 M a 0,5 M).

El proceso de la invención permite obtener el péptido recombinante purificado de SEC N° 4 o SEC N°5. Teniendo en cuenta que este péptido presenta una proteína de fusión que le permite una degradación controlada entonces resulta óptimo para la inclusión en composiciones farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen el péptido recombinante de SEC N°4, SEC N°5, o una forma modificada donde el péptido no incluye la cola de polihistidina, o mezclas de éstos. Así como los excipientes farmacéuticos aceptables conocidos en el estado del arte.

Dependiendo del tipo de aplicación farmacéutica, y de acuerdo con las formulaciones farmacológicas, los péptidos recombinantes de esta patente pueden ser formulados para ser administrados de manera tópica empleando excipientes como monoestearato de glicerol, cetil fosfato de potasio, polietilenglicol polisorbato 80,

vaselina blanca, óxido de zinc, propilparabeno sódico, lanolina, fosfatidilcolina. Su administración oral mediante cápsulas puede contener excipientes como polietilenglicol, goma laca, gelatina, propilenglicol. alguna formulación oftalmológica puede reunir excipientes como ácido cítrico monohidrato, citrato de sodio, cloruro de litio, feniletil alcohol, alcohol etílico desnaturalizado 95%, polisorbato 80, agua estéril, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico. Su administración intravenosa puede reunir excipientes tales como ácido fosfórico, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, betadex, agua estéril además de otros compuestos aceptados en las distintas farmacopeas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Constructos sintéticos y clonación

La secuencia madura del péptido Satanin 1 fue utilizada junto con las secuencias de las etiquetas CPD o Xten, así como de la etiqueta de poli histidinas H8.

Satanin 1 (SEC N°1): MRSKKWRKIEKRVKKIFEKTKEALPVIQGVATIVGAVGR

CPD (SEC N°2):

LADGKILHNQNVNSWGPITVPTTDGGETRFDGQIIVQMENDPVVAKAAANLAGKH
AESSVVVQLDSDGNYRVVYGDPSKLDGKLRWQLVGHGRDHSETNNTRL SGYSAD
ELAVKLAKFQQSFNQAENINNKP DHISIVGCSLVSDDKQKGFGHQFINAMDANGLR
VDVSVRSSELAVDEAGRKHTKDANGDWVQKAENNKVSLSWDAQG

Xten (SEC N°3):

GGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESP GPGSTSES
PSGTAP

Poli histidinas H8: HHHHHHHH

Sitio de reconocimiento del factor Xa: IEGR

El diseño de los constructos tuvo en cuenta que el dominio N-terminal del péptido Satanin 1 es el principal responsable de la actividad antimicrobiana, por lo tanto, se buscó que estuviera libre en el constructo. Se usaron las etiquetas CPD y XTEN para buscar la mayor estabilidad del péptido y la etiqueta de polihistidinas para la purificación del constructo recombinante. El constructo proteico modeló su estructura terciaria obteniendo los siguientes modelos de las proteínas (Figura 1), y se

sintetizaron dentro de los constructos genéticos del plásmido pDR454 (ATUM) (Figura 2).

Así las cosas, el polipéptido recombinante de interés tiene dos formas a saber:

- a) Satanin 1 (SEC N°1) - CPD (SEC N°2) - H8, que corresponde a la SEC N°4
- b) Satanin 1 (SEC N°1) – Xa-Xten (SEC N°3) - H8, que corresponde a la SEC N°5

Los plásmidos fueron clonados por competencia con cloruro de magnesio y choque térmico en las cepas *E. coli* TOP10, *E. coli* BL21 DE3 y *E. coli* BL21 AI (Figura 3). Las cepas recombinantes resultantes fueron crecidas en medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y se congelaron en 15% de glicerol a -80 °C.

Ejemplo 2. Producción recombinante

Las bacterias transformadas de la cepa *E. coli* BL21-DE3 fueron crecidas en medio LB millers suplementado con ampicilina (100 µg/mL) toda la noche a 37 °C y 250 rpm en un inóculo de aproximadamente 1 mL, a partir de los bancos de células congelados previamente. El inóculo se adicionó en una relación 1:100 en 5 mL de medio fresco y se dejaron en agitación a 350 rpm hasta fase media logarítmica (Abs en plato de 96 pozos de OD de 0,1 a A570 nm) y se adiciono IPTG a 0,5 mM o 1 mM a los tiempos 236/634/996 minutos, posterior a la inducción se tomaron 200 µL del cultivo, se midió la OD a 570 nm y se realizó ELISA indirecto con un anticuerpo monoclonal contra la etiqueta de polihistidinas (sigma H1029-.2ML).

Se logró evidenciar la expresión de las proteínas recombinantes Satanin1-CPD-H8 y Satanin1-Xa-Xten-H8 desde las 4 horas post inducción a ambas concentraciones de IPTG (0,5 mM y 1 mM) y en tiempos inferiores a 4 horas y concentraciones de IPTG menores a 0,5mM (0,5; 0,1 y 0,02 mM).

Se evidencio que la bacteria *E. coli* BL21 DE3 Satanin1-CPD-H8 y Satanin1-Xa-Xten-H8 tuvo un efecto dependiente de la concentración de IPTG sobre el crecimiento celular durante las primeras 4 horas post inducción con un mayor efecto de la proteína Satanin1XtenH8. La expresión de las proteínas recombinantes se evidenció desde el primer tiempo (74 min) para todas las condiciones (Figura 4).

Adicionalmente, se indujo la expresión de los constructos en las bacterias transformadas *E. coli* BL21 DE3, y BL21 AI transfectadas con los plásmidos con la secuencia SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9 (Plasmido_Constructo_Satanin1_Xa_Xten_H8_pD454MR, Plasmido_constructo_Satanin1_CPD_H8_pD454MR) a concentraciones de IPTG desde 0,01 mM hasta 20mM, y 60 minutos de tiempo post inducción para evaluar la expresión de las proteínas por medio de un ELISA indirecto (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) específico para detectar la cola de polihistidinas (H8) de los constructos recombinantes.

Se encontró que, para *E. coli* BL21-DE3 se evidencia la expresión de ambos constructos siendo más eficiente la expresión para la proteína recombinante Satanin1-Xa-Xten-H8 a 0,1 mM de IPTG y evidenciando expresión hasta 12 mM. Para Satanin1-CPD-H8 se evidenció la expresión de la proteína desde 0,1 mM hasta 20mM. Para *E. coli* BL21-AI se evidencia la expresión de ambos constructos siendo más eficiente la expresión para la proteína recombinante Satanin1-Xa-Xten-H8 a 0,1 mM y 0,01 % de L-Arabinosa y un mayor pico a la relación de 4 mM de IPTG y 0,1% de L-Arabinosa (Figura 5)

Ejemplo 3. Purificación de la proteína recombinante con Satanin 1 y evaluación de actividad.

La purificación de la proteína Satanin1-CPD-H8 se realizó por cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC) en columna hitrap níquel sefarosa HP de 1 mL en equipo de AKTa encontrando retención de la proteína de interés en la columna. En un gradiente continuo de elución se encontró que la proteína de interés se eluye desde aproximadamente 30 % de buffer de elución hasta 75 %. Se realizó optimización del proceso de purificación de la proteína con cromatografía en gradiente isocrático de 3 puntos con rangos de 30, 75 y 100% de buffer B encontrando mayor cantidad de proteína de interés en el pico a 75% (Figura 6). Se tomó la proteína recombinante y se evaluó su actividad frente a *E. coli* ATCC 25922 encontrando actividad antimicrobiana con una MIC de 25 µg/mL (Figura 7).

Referencias bibliográficas

Ahmad, I., Nawaz, N., Darwesh, N. M., ur Rahman, S., Mustafa, M. Z., Khan, S. B., & Patching, S. G. (2018). Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 144, 12-18.

<https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.11.005>

- Azari, M., Asad, S., & Mehrnia, M. R. (2020). Heterologous production of porcine derived antimicrobial peptide PR-39 in *Escherichia coli* using SUMO and intein fusion systems. *Protein Expression and Purification*, 169, 105568. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105568>
- Biancucci, M., Dolores, J. S., Wong, J., Grimshaw, S., Anderson, W. F., Satchell, K. J. F., & Kwon, K. (2017). New ligation independent cloning vectors for expression of recombinant proteins with a self-cleaving CPD/6xHis-tag. *BMC Biotechnology*, 17(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0323-4>
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). [16] Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods in enzymology*, 326, 245-254.
- Brunetti, J., Falciani, C., Roscia, G., Pollini, S., Bindi, S., Scali, S., Arrieta, U. C., Gómez-Vallejo, V., Quercini, L., Ibba, E., Prato, M., Rossolini, G. M., Llop, J., Bracci, L., & Pini, A. (2016). In vitro and in vivo efficacy, toxicity, bio-distribution and resistance selection of a novel antibacterial drug candidate. *Scientific Reports*, 6(1), 26077. <https://doi.org/10.1038/srep26077>
- Cheung, R. C. F., Wong, J. H., & Ng, T. B. (2012). Immobilized metal ion affinity chromatography: A review on its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(6), 1411-1420. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4507-0>
- Costa, S., Almeida, A., Castro, A., & Domingues, L. (2014). Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: The novel Fh8 system. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00063>
- da Cunha, N. B., Cobacho, N. B., Viana, J. F. C., Lima, L. A., Sampaio, K. B. O., Dohms, S. S. M., Ferreira, A. C. R., de la Fuente-Núñez, C., Costa, F. F., Franco, O. L., & Dias, S. C. (2017). The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. *Drug Discovery Today*, 22(2), 234-248. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.10.017>
- Donovan, R. S., Robinson, C. W., & Glick, B. R. (1996). Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology*, 16(3), 145-154. <https://doi.org/10.1007/BF01569997>
- Drayton, M., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K. (2020). Towards Robust Delivery of Antimicrobial Peptides to Combat Bacterial Resistance. *Molecules*, 25(13), 3048. <https://doi.org/10.3390/molecules25133048>
- Fee, C. J., & Van Alstine, J. M. (2011). Purification of PEGylated Proteins. En J.-C. Janson (Ed.), *Methods of Biochemical Analysis* (pp. 339-362). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470939932.ch14>
- Gaberc-Porekar, V., & Menart, V. (2001). Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49(1), 335-360. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00207-X](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00207-X)
- Ingham, A. B., & Moore, R. J. (2007). Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 47(1), 1. <https://doi.org/10.1042/BA20060207>

- Källberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H., & Xu, J. (2012) Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols* 7, 1511–1522.
- Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 803-822. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>
- Kimple, M. E., Brill, A. L., & Pasker, R. L. (2013). Overview of Affinity Tags for Protein Purification. *Current Protocols in Protein Science*, 73(1). <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0909s73>
- Kwon, K., Biancucci, M., Woida, P. J., & Satchell, K. J. F. (2020). Direct Cloning Method for Expression of Recombinant Proteins with an Inositol Hexakisphosphate Inducible Self-Cleaving Tag. En G. J. Miller (Ed.), *Inositol Phosphates* (Vol. 2091, pp. 163-179). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0167-9_15
- Li, P., Li, X., Saravanan, R., Li, C. M., & Leong, S. S. J. (2012). Antimicrobial macromolecules: Synthesis methods and future applications. *RSC Advances*, 2(10), 4031. <https://doi.org/10.1039/c2ra01297a>
- Li, Y. (2011a). Self-cleaving fusion tags for recombinant protein production. *Biotechnology Letters*, 33(5), 869-881. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0533-8>
- Li, Y. (2011b). Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A review. *Protein Expression and Purification*, 80(2), 260-267. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.08.001>
- Li, Y., & Chen, Z. (2008). RAPD: A database of recombinantly-produced antimicrobial peptides. *FEMS Microbiology Letters*, 289(2), 126-129. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01357.x>
- Lupardus, P. J., Shen, A., Bogoy, M., & Garcia, K. C. (2008). Small Molecule-Induced Allosteric Activation of the *Vibrio cholerae* RTX Cysteine Protease Domain. *Science*, 322(5899), 265-268. <https://doi.org/10.1126/science.1162403>
- Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 3(3), 1377-1397. <https://doi.org/10.3390/polym3031377>
- Montfort-Gardeazabal, J. M., Balderas-Renteria, I., Casillas-Vega, N. G., & Zarate, X. (2021). Expression and purification of the antimicrobial peptide Bin1b in *Escherichia coli* tagged with the fusion proteins CusF3H+ and SmbP. *Protein Expression and Purification*, 178, 105784. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105784>
- Parachin, N. S., Mulder, K. C., Viana, A. A. B., Dias, S. C., & Franco, O. L. (2012). Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. *Peptides*, 38(2), 446-456. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.09.020>
- Podust, V. N., Balan, S., Sim, B.-C., Coyle, M. P., Ernst, U., Peters, R. T., & Schellenberger, V. (2016). Extension of in vivo half-life of biologically active molecules by XTEN protein polymers. *Journal of Controlled Release*, 240, 52-66. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.038>
- Porath, J. (1992). Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification*, 3(4), 263-281. [https://doi.org/10.1016/1046-5928\(92\)90001-D](https://doi.org/10.1016/1046-5928(92)90001-D)

- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Roscia, G., Falciani, C., Bracci, L., & Pini, A. (2013). The Development of Antimicrobial Peptides as New Antibacterial Drugs. *Current Protein & Peptide Science*, 14(8), 641-649.
<https://doi.org/10.2174/138920371408131227155308>
- Sampaio de Oliveira, K. B., Leite, M. L., Rodrigues, G. R., Duque, H. M., da Costa, R. A., Cunha, V. A., de Loiola Costa, L. S., da Cunha, N. B., Franco, O. L., & Dias, S. C. (2020). Strategies for recombinant production of antimicrobial peptides with pharmacological potential. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 13(4), 367-390.
<https://doi.org/10.1080/17512433.2020.1764347>
- San-Miguel, T., Pérez-Bermúdez, P., & Gavidia, I. (2013). Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. *SpringerPlus*, 2(1), 89. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-89>
- Shen, A., Lupardus, P. J., Morell, M., Ponder, E. L., Sadaghiani, A. M., Garcia, K. C., & Bogoy, M. (2009). Simplified, Enhanced Protein Purification Using an Inducible, Autoprocessing Enzyme Tag. *PLOS ONE*, 4(12), e8119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008119>
- Sinha, R., & Shukla, P. (2019). Antimicrobial Peptides: Recent Insights on Biotechnological Interventions and Future Perspectives. *Protein & Peptide Letters*, 26(2), 79-87.
<https://doi.org/10.2174/0929866525666181026160852>
- Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115(2), 113-128.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.08.004>
- Spadiut, O., Posch, G., Ludwig, R., Haltrich, D., & Peterbauer, C. K. (2010). Evaluation of different expression systems for the heterologous expression of pyranose 2-oxidase from *Trametes multicolor* in *E. coli*. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-14>
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2017). The production of heterologous proteins. In *Principles of Fermentation Technology* (pp. 725-775). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099953-1.00012-0>
- Strohl, W. R. (2015). Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters. *BioDrugs*, 29(4), 215-239. <https://doi.org/10.1007/s40259-015-0133-6>
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113-130.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Sulkowski, E. (1985). Purification of proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology*, 3(1), 1-7.
[https://doi.org/10.1016/0167-7799\(85\)90068-X](https://doi.org/10.1016/0167-7799(85)90068-X)
- Tay, D. K. S., Rajagopalan, G., Li, X., Chen, Y., Lua, L. H. L., & Leong, S. S. J. (2011). A new bioproduction route for a novel antimicrobial peptide. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(3), 572-581. <https://doi.org/10.1002/bit.22970>
- Téllez, G. A., & Castaño-Osorio, J. C. (2014). Expression and purification of an active cecropin-like

- recombinant protein against multidrug resistance *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 100, 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.05.004>
- Téllez, G. A. T., Osorio-Méndez, J. F., Arias, D. C. H., Toro S, L. J., Castrillón, J. F., Rojas-Montoya, M., & Osorio, J. C. C. (2020). *Identification of new insect Host Defense Peptides (HDP) from Dung Beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) transcriptomes* [Preprint]. *Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1101/2020.06.15.152363>
- Wilms, D., Stiriba, S.-E., & Frey, H. (2010). Hyperbranched Polyglycerols: From the Controlled Synthesis of Biocompatible Polyether Polyols to Multipurpose Applications. *Accounts of Chemical Research*, 43(1), 129-141. <https://doi.org/10.1021/ar900158p>
- Wood, D. W., & Camarero, J. A. (2014). Intein Applications: From Protein Purification and Labeling to Metabolic Control Methods. *Journal of Biological Chemistry*, 289(21), 14512-14519. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.552653>
- Wright, O., Yoshimi, T., & Tunnacliffe, A. (2012). Recombinant production of cathelicidin-derived antimicrobial peptides in *Escherichia coli* using an inducible autocleaving enzyme tag. *New Biotechnology*, 29(3), 352-358. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.11.001>
- Zerbs, S., Giuliani, S., & Collart, F. (2014). Small-Scale Expression of Proteins in *E. coli*. En *Methods in Enzymology* (Vol. 536, pp. 117-131). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420070-8.00011-8>
- Zhang, Y., Shang, X., Lai, S., Zhang, G., Liang, Y., & Wen, T. (2012). Development and Application of an Arabinose-Inducible Expression System by Facilitating Inducer Uptake in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5831-5838. <https://doi.org/10.1128/AEM.01147-12>
- Zorko, M., & Jerala, R. (2010). Production of Recombinant Antimicrobial Peptides in Bacteria. En A. Giuliani & A. C. Rinaldi (Eds.), *Antimicrobial Peptides* (Vol. 618, pp. 61-76). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-594-1_5

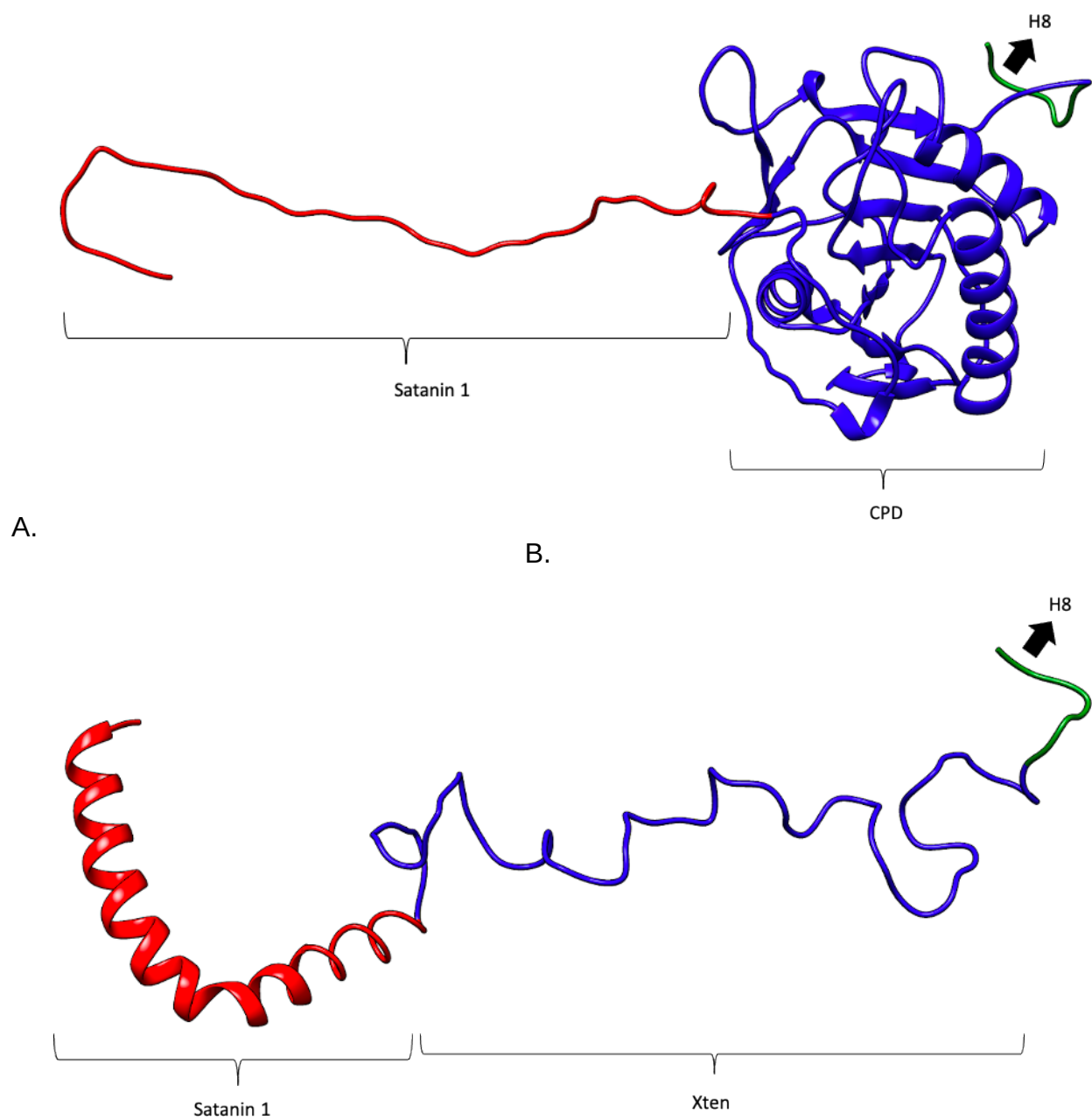
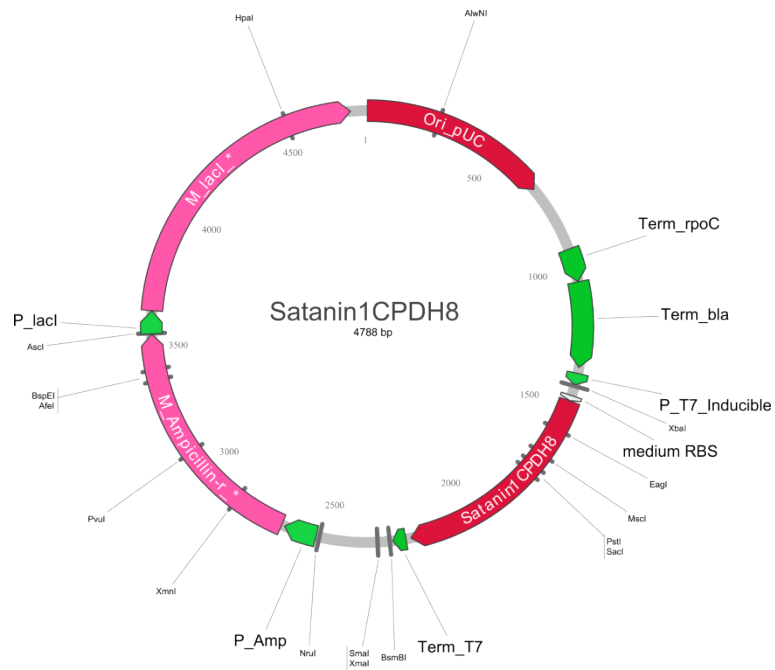


Figura 1

A)



B)

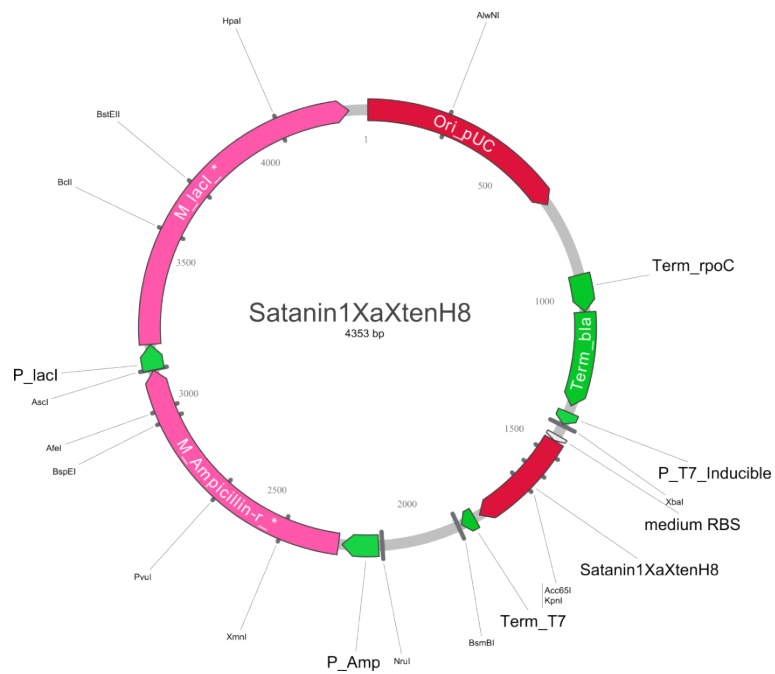


Figura 2

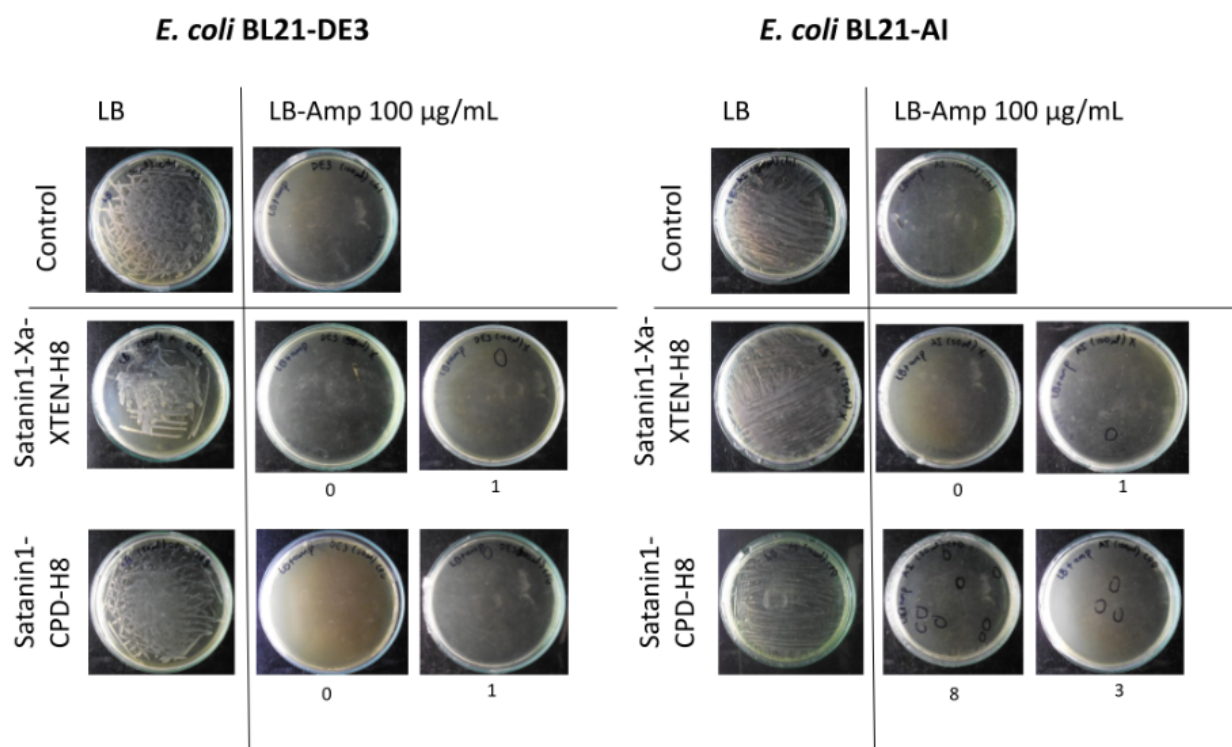
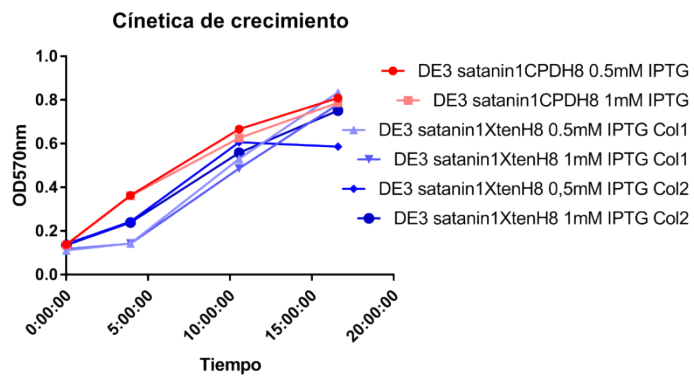
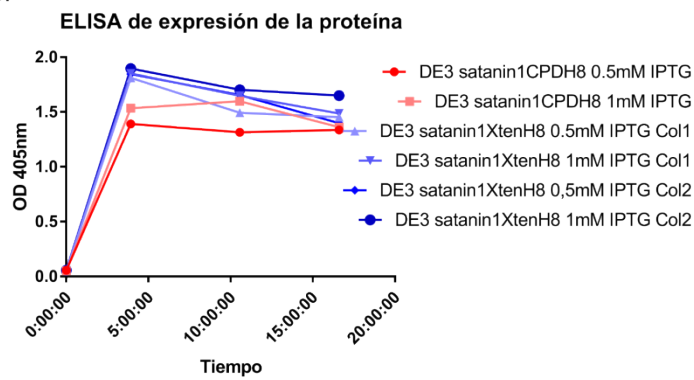


Figura 3

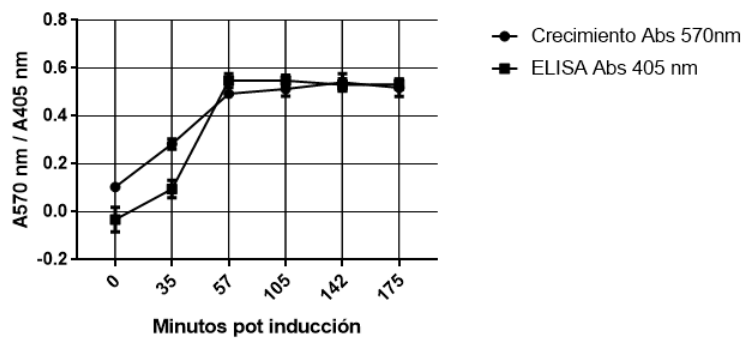
A.



B.



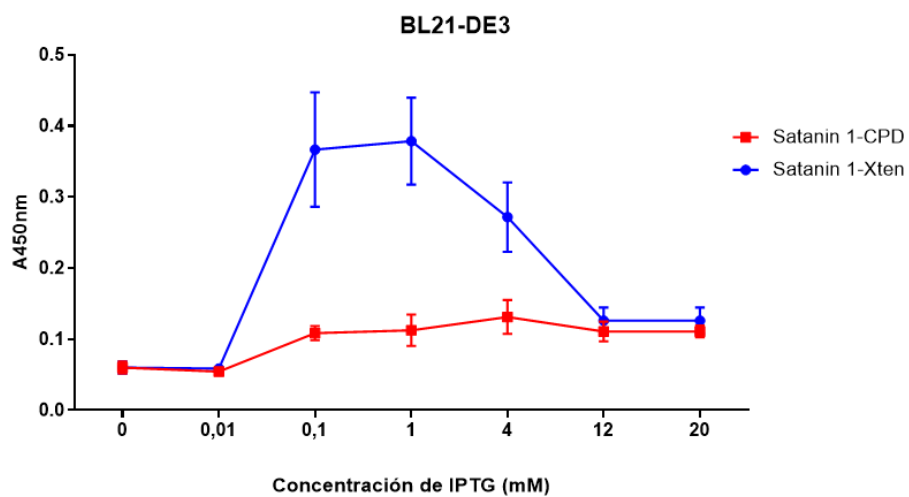
Crecimiento de bacterias y ELISA producción proteína



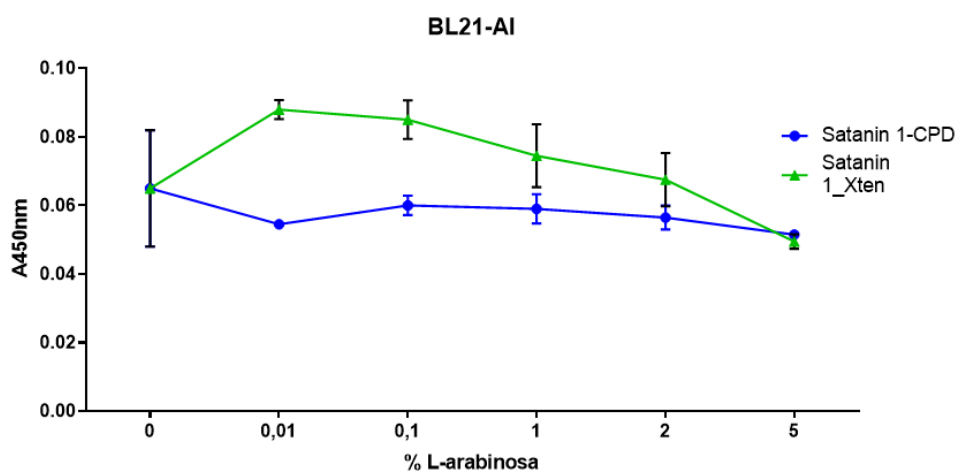
C)

Figura 4

A.



B.



C.

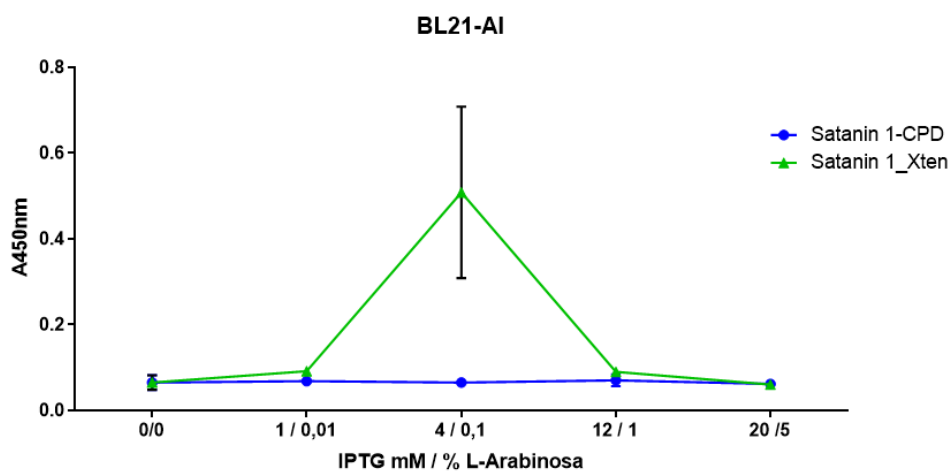
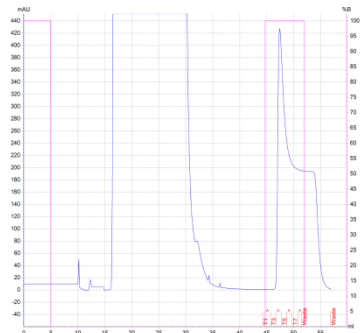
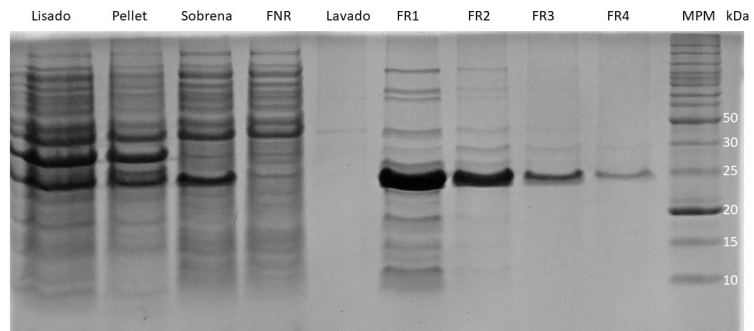


Figura 5

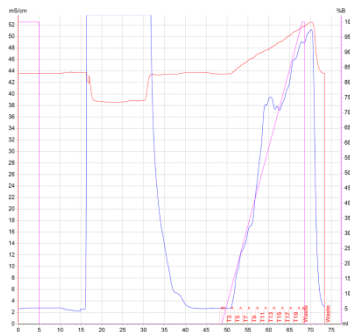
A)



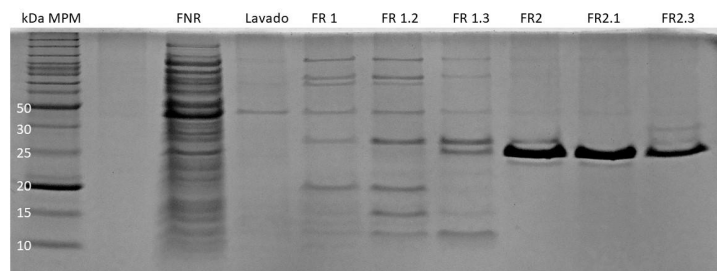
B)



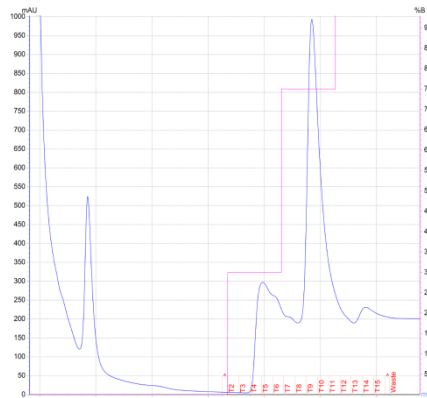
C)



D)



E)



F)

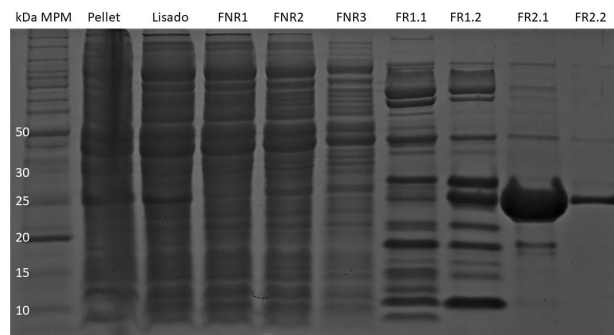


Figura 6

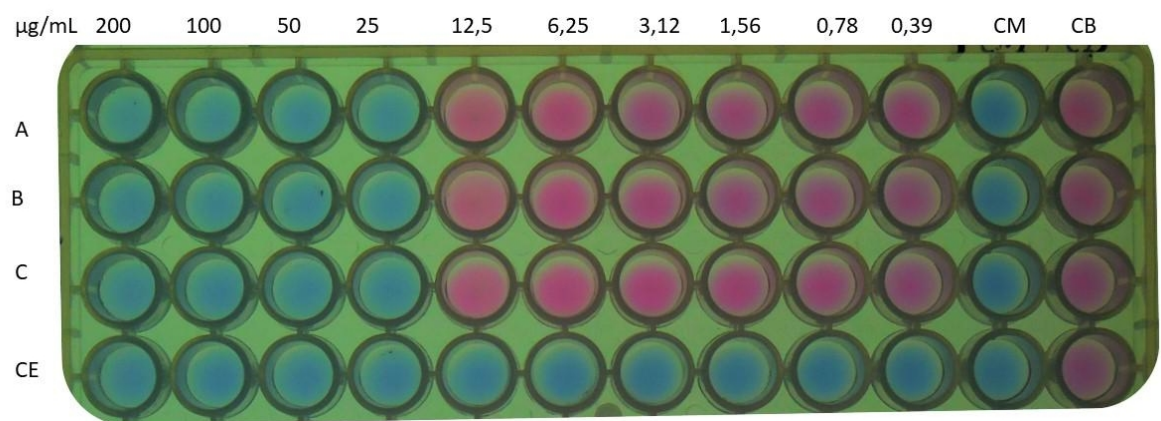


Figura 7

RESUMEN

La presente invención suministra un método para la producción de los péptidos Satanin1-CPD-H8 y Satanin1-Xa-Xten-H8 a través de un sistema de expresión heteróloga que incluye un plásmido modificado y la expresión del péptido mediante el uso de IPTG y L-arabinosa, así como purificación de éste por cromatografía líquida, que permite obtener una proteína con actividad antimicrobiana y que tiene potencial uso a nivel farmacéutico y biomédico en el desarrollo de estrategias terapéuticas frente a enfermedades infecciosas. La invención también suministra el péptido recombinante de Satanin 1 fusionado con CPD o Xten, lo que le permite tener una forma de degradación controlada al interior de la célula eucariótica. Se provee también la composición farmacéutica que contiene este péptido recombinante.