

PÉPTIDO CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

CAMPO DE LA INVENCION

La invención pertenece al campo técnico de los péptidos antimicrobianos, más particularmente péptidos derivados de plantas naturales, que exhiben actividad antimicrobiana frente a diversas cepas bacterianas y fúngicas. En particular, la presente invención se relaciona con un péptido natural, recombinante o sintético derivado de la proteína vicilina de la planta del cacao. La invención se relaciona además con el uso del péptido para el tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas en plantas, animales y seres humanos.

ANTECEDENTES

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema importante al que se enfrentan las industrias alimentaria y agrícola, las profesiones médicas y veterinarias y otras. El potencial de transferencia de bacterias potencialmente letales resistentes a los antibióticos de un animal comestible destinado al consumo humano es motivo de particular preocupación.

Los métodos actuales para controlar el desarrollo y la propagación de bacterias resistentes a los antibióticos incluyen cambios en el uso de antibióticos y patrones de uso de diferentes antibióticos, mayor vigilancia y regulación gubernamental y desarrollo continuo de antibióticos nuevos y mejorados. Sin embargo, la capacidad de la mayoría de las bacterias para adaptarse al uso de antibióticos y adquirir resistencia a los antibióticos existentes y nuevos a menudo supera estas medidas convencionales y requiere el desarrollo continuo de medios alternativos para el control de la resistencia a los antibióticos en las bacterias.

Los péptidos antimicrobianos (AMPs por sus siglas en inglés) son un grupo diverso de compuestos naturales presentes en animales, plantas, insectos y microorganismos. Estos péptidos son responsables de la defensa frente a (otros) microorganismos y, como tales, pueden utilizarse como una alternativa

a los conservantes químicos. Sin embargo, su uso en el tratamiento de infestaciones microbianas de plantas, humanos y/o animales está limitado hasta la fecha por su escasa disponibilidad en la naturaleza y el alto costo de producción, baja estabilidad y formulación compleja en el producto terapéutico adecuado. Por lo tanto, el uso de péptidos antimicrobianos en la protección de cultivos, así como para aplicaciones terapéuticas en medicina humana y veterinaria, aún es limitado.

Las proteínas antimicrobianas exhiben una variedad de estructuras tridimensionales, que determinarán en gran parte su actividad y estabilidad. La estabilidad de una determinada proteína es típicamente un parámetro crítico para aplicaciones clínicas y/o industriales.

El interés inicial en las moléculas derivadas de plantas que son AMPs fue seguido por el aislamiento de la purotionina, el primer AMP derivado de plantas. Caley et al., en *Appl. Microbiol.*, 1972, 23(5) 998-1000, informaron que la purotionina, la proteína de bajo peso molecular de la harina de trigo y cebada, es un AMP eficaz frente a una serie de bacterias fitopatógenas como *Pseudomonas solanacearum*, *Xanthomonas phaseoli*, *X. campestris*, *Erwinia amylovora* y cinco cepas de *Corynebacterium*. Desde entonces, se descubrieron varios grupos importantes de AMPs, incluyendo las tioninas (tipos I-V), las defensinas, los ciclótidos, las proteínas similares a la albúmina 2S y las proteínas de transferencia de lípidos.

Las vicilinas vegetales son una clase común de proteína de almacenamiento de semillas de plantas. Se ha demostrado que algunas vicilinas se procesan para producir péptidos de defensa de las plantas. Los péptidos antimicrobianos mejor caracterizados producidos a partir de una vicilina son los de *Macadamia integrifolia*. Los granos de nuez de *Macadamia* contienen una proteína vicilina de 666 aa que incluye una región altamente hidrófila de 212 aa próxima a una secuencia señal N-terminal.

El documento WO1998027805 describe una familia de péptidos de tipo vicilina con propiedades antimicrobianas. Las proteínas prototipo son de origen natural y están aisladas de *Macadamia integrifolia*, así como de algunas otras especies, incluyendo *Theobroma cacao*. En particular, dos secuencias marcadas como TcAMP1 de 47 aminoácidos (proteína antimicrobiana 1 de *Theobroma cacao*) y TcAMP2 de 60 aminoácidos (proteína antimicrobiana 2 de *Theobroma cacao*) se derivaron de una secuencia de gen de proteína de almacenamiento de semilla de vicilina de cacao que codifica 566 aminoácidos (aa), y se expresaron de forma recombinante en *Escherichia coli*. Sin embargo, los péptidos recombinantes aislados y las composiciones preparadas a partir de ellos presentaron propiedades antimicrobianas efectivas en dosis altas (5-20 µg/ml).

Marcus et al., Plant. Mol. Biol Rep (2008) 26, 75-87 investigaron tres secuencias de péptidos de *Macadamia integrifolia* y dos de *Theobroma cacao* identificadas en la región hidrófila proximal a N de la proteína de la semilla de vicilina. La actividad antimicrobiana del péptido se predijo en función de la presencia de los motivos característicos C-X-X-X-C-(10–12)-C-X-X-X-C en las regiones hidrófilas proximales al extremo N. Las versiones marcadas con His de los péptidos putativos se expresaron en *Escherichia coli*. Se demostró que los péptidos recombinantes obtenidos tenían actividad antimicrobiana *in vitro* frente a seis cepas de patógenos vegetales, pero la dosis efectiva fue muy alta.

Ecuador es el productor más importante de cacao de sabor fino, lo que representa aproximadamente el 50 % de la producción mundial. El tipo de cacao de sabor fino producido en Ecuador pertenece predominantemente a la variedad Nacional (a veces también llamada Nacional o Arriba). Además del cacao Nacional, intensamente aromático y tradicional, desde los años 60 se cultiva en Ecuador un clon de cacao, el CCN-51. A diferencia del Nacional, el CCN-51 se considera un tipo de cacao a granel debido a su aroma más débil. Sin embargo, tiene una mayor tolerancia a las condiciones climáticas cambiantes, es resistente a diferentes patógenos y da rendimientos más altos que otros tipos de cacao. En consecuencia, el híbrido CCN-51 es muy popular

para el cultivo por parte de los agricultores ecuatorianos. El documento US 2004/0172683 describe varios polipéptidos de la semilla del grano de cacao responsables del sabor del cacao.

Un péptido derivado de Vicilina que se utiliza para la producción de cacao y chocolate como potenciador del sabor del cacao se conoce a partir del documento WO2002086125A2.

La presente invención describe así un péptido desconocido derivado del cacao que es altamente eficaz y activo contra un amplio espectro de microorganismos patógenos animales y vegetales. El péptido es seguro de usar, preferentemente sin contener productos químicos agresivos, que pueden ser tóxicos y perjudiciales para el medio ambiente.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención y sus modalidades sirven para proporcionar una solución a una o más de las desventajas mencionadas anteriormente. Con este fin, la presente invención se refiere a un péptido que tiene actividad antimicrobiana de acuerdo con la reivindicación 1. Más específicamente, la presente invención proporciona un péptido que muestra por lo menos un 95% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2. Se ha descubierto sorprendentemente que este péptido, que se puede obtener a partir de *Theobroma cacao* o que se produce de forma recombinante o sintética, tiene actividad antibacteriana y/o antifúngica contra un amplio espectro de patógenos. Las modalidades preferidas del péptido se muestran en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende un péptido de acuerdo con la reivindicación 10. Las modalidades preferidas de la composición se muestran en las reivindicaciones 11 y 12.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso del péptido con fines terapéuticos de acuerdo con la reivindicación 13. Las modalidades preferidas del uso se muestran en cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21. Más particularmente, el péptido se utiliza para infecciones con bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas y/u hongos, preferentemente hongos hifales o levaduras en humanos, animales o plantas.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método de obtención de dicho péptido, de acuerdo con las reivindicaciones 22 y 23.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un vector que comprende la secuencia genética que codifica el péptido, que permite la expresión de dicho péptido, de acuerdo con la reivindicación 24, a una planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 25 y a un método de obtención de la planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 26.

En un último aspecto, la presente invención se refiere a una semilla recubierta con dicho péptido, de acuerdo con la reivindicación 27.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra las proteínas aisladas de los granos de cacao después de la separación en un gel de poliacrilamida SDS bidimensional (2D). La separación horizontal se realiza de acuerdo con su punto isoeléctrico (pI, pH 4-7) y la separación vertical se basa en su peso molecular. El punto resaltado se analizó mediante la huella de masa de péptidos, como se revela en la Figura 2A. Los números de la izquierda indican el peso molecular en kDa del marcador de referencia.

La Figura 2 muestra un esquema representativo para la detección y la ubicación de la secuencia de fragmentos de huella de masa de péptidos, según se determinó mediante el análisis MALDI-ToF. Las secuencias de aminoácidos subrayadas en la Figura 2A se identificaron como productos de digestión

tríptica de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1 obtenido de un gel de poliacrilamida SDS 2D de proteínas de cacao. Las secuencias de aminoácidos subrayadas en la Figura 2B se identificaron como productos de digestión tríptica de un péptido recombinante de acuerdo con la SEQ ID No. 2 obtenido de un gel de poliacrilamida SDS.

La Figura 3 muestra los resultados de LC-MS de una muestra que contiene un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 2. El péptido detectado tenía una masa de 15,3 kDa tanto en la muestra no reducida (Figura 3A) como en la reducida (Figura 3B).

La Figura 4 muestra la citotoxicidad de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 2 para células de *Candida albicans* y *HaCaT* de acuerdo con un ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH). Cada experimento se realizó con 10,000 células que se incubaron con el péptido a diferentes concentraciones durante 1 hora.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un péptido o composición que comprende dicho péptido como principio activo para uso médico o farmacéutico, en donde dicho péptido tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2. Además, la presente invención se refiere al uso de dicho péptido, a un método de obtención de dicho péptido, y a un vector que permite la expresión de dicho péptido.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos utilizados en la divulgación de la invención, incluyendo los términos técnicos y científicos, tienen el significado que comúnmente entiende una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta invención. A modo de orientación adicional, se incluyen definiciones de términos para apreciar mejor la enseñanza de la presente invención.

Como se utilizan en el presente documento, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

“Un”, “una” y “el”, según se utilizan en el presente documento, se refieren tanto a referentes singulares como plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A modo de ejemplo, “un compartimento” se refiere a uno o más de un compartimento.

“Aproximadamente” como se utiliza en el presente documento en referencia a un valor medible como un parámetro, una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o menos, preferentemente $\pm 10\%$ o menos, más preferentemente $\pm 5\%$ o menos, incluso más preferentemente $\pm 1\%$ o menos, y aún más preferentemente $\pm 0.1\%$ o menos del valor especificado, en la medida en que dichas variaciones sean apropiadas para su realización en la invención divulgada. Sin embargo, debe entenderse que el valor al que se refiere el modificador “aproximadamente” también se divulga específicamente.

“Comprenden”, “que comprende”, “comprende” y “comprendido de” según se usan en este documento son sinónimos de “incluyen”, “que incluye”, “incluye” o “contienen”, “que contiene”, “contiene” y son términos inclusivos o abiertos que especifican la presencia de lo que sigue, por ejemplo, componente y no excluyen ni impiden la presencia de componentes, características, elementos, miembros o pasos adicionales no enumerados, conocidos en la técnica o divulgados en ella.

Además, los términos primero, segundo, tercero y similares en la descripción y en las reivindicaciones se utilizan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico, a menos que se especifique. Debe entenderse que los términos utilizados de esta manera son intercambiables en circunstancias apropiadas y que las modalidades de la invención descritas en este documento pueden funcionar en otras secuencias que las descritas o ilustradas en este documento.

La enumeración de rangos numéricos por puntos finales incluye todos los números y fracciones incluidos en ese rango, así como los puntos finales enumerados.

La expresión “% en peso”, “por ciento en peso”, “% en peso”, aquí y en toda la descripción a menos que se defina de otra manera, se refiere al peso relativo del componente respectivo en función del peso total de la formulación.

Si bien los términos “uno o más” o “por lo menos uno”, como uno o más o por lo menos un miembro(s) de un grupo de miembros, son claros *per se*, mediante una ejemplificación adicional, el término abarca, entre otras cosas, una referencia a cualquiera de dichos miembros, o a cualquiera de dos o más de dichos miembros, como, por ejemplo, cualesquiera ≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 o ≥ 7 , etc. de dichos miembros, y hasta todos dichos miembros.

El término “péptido”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto que contenga dos o más residuos de aminoácidos unidos por un enlace amida formado a partir del grupo carboxilo de un residuo de aminoácido y el grupo amino del residuo de aminoácido adyacente. Los residuos de aminoácidos pueden tener la forma L así como la forma D, y pueden ser de origen natural o sintético, lineales así como cíclicos.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” es una cantidad que es eficaz para mejorar un síntoma de una enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una “cantidad profilácticamente eficaz”, ya que la profilaxis puede considerarse una terapia.

La “suspensión” de granos de cacao como se utiliza en el presente documento se define como la masa de semillas de cacao molidas después de la separación de la manteca de cacao.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos utilizados en la divulgación de la invención, incluyendo los términos técnicos y científicos,

tienen el significado que comúnmente entiende una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta invención. A modo de orientación adicional, se incluyen definiciones de los términos utilizados en la descripción para apreciar mejor la enseñanza de la presente invención. Los términos o definiciones utilizados en el presente documento se proporcionan únicamente para ayudar a comprender la invención.

La referencia en toda esta especificación a “una modalidad” significa que un rasgo, estructura o característica particular descrita en relación con la modalidad está incluida en por lo menos una modalidad de la presente invención. Por lo tanto, las apariciones de las frases “en una modalidad” en varios lugares a lo largo de esta especificación no necesariamente se refieren todas a la misma modalidad, pero pueden hacerlo. Además, los rasgos, estructuras o características particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada, como sería evidente para una persona experta en la técnica a partir de esta divulgación, en una o más modalidades. Además, si bien algunas modalidades descritas en el presente documento incluyen algunas, pero no otras características incluidas en otras modalidades, las combinaciones de características de diferentes modalidades están destinadas a estar dentro del alcance de la invención y formar diferentes modalidades, como lo entenderían los expertos en la técnica. Por ejemplo, en las siguientes reivindicaciones, cualquiera de las modalidades reivindicadas se puede utilizar en cualquier combinación.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un péptido, en donde dicho péptido tiene una secuencia de aminoácidos que exhibe por lo menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2. Preferentemente, dicho péptido tiene una secuencia de aminoácidos que exhibe por lo menos un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% o más preferentemente un 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2. En una modalidad preferida, el péptido tiene una secuencia de

aminoácidos que exhibe por lo menos un 95 % de identidad con la SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2.

El término “identidad de secuencia” como se utiliza en este documento se refiere al grado en que las secuencias son idénticas aminoácido por aminoácido durante una ventana de comparación. Por lo tanto, el término “porcentaje de identidad de secuencia” se calcula comparando dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que se encuentra el aminoácido idéntico en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Un espacio, es decir, una posición en una alineación donde un residuo está presente en una secuencia, pero no en la otra, se considera una posición con residuos no idénticos. La determinación del porcentaje de identidad de secuencia se puede realizar manualmente o haciendo uso de programas informáticos que están disponibles en la técnica. Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

En otra modalidad, dicho péptido tiene una secuencia que difiere en un máximo de 24, más preferentemente un máximo de 23, incluso más preferentemente un máximo de 22, incluso más preferentemente un máximo de 21, incluso más preferentemente un máximo de 20, incluso más preferentemente un máximo de 19, incluso más preferentemente un máximo de 18, incluso más preferentemente un máximo de 17, incluso más preferentemente un máximo de 16, incluso más preferentemente un máximo de 15, incluso más preferentemente un máximo de 14, incluso más preferentemente un máximo de 13, incluso más preferentemente un máximo de 12, incluso más preferentemente un máximo de 11, incluso más preferentemente un máximo de 10, incluso más preferentemente un máximo de 9, incluso más preferentemente

un máximo de 8, incluso más preferentemente un máximo de 7, incluso más preferentemente un máximo de 6, incluso más preferentemente un máximo de 5, incluso más preferentemente un máximo de 4, incluso más preferentemente un máximo de 3, incluso más preferentemente un máximo de 2, incluso más preferentemente un máximo de 1 residuo de aminoácido de una de las secuencias SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2.

En una modalidad, dicho péptido tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID No. 1 o que exhibe por lo menos un 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 2 o que difiere con un máximo de 2 aminoácidos de la secuencia de acuerdo con la SEQ ID No. 2.

Alternativamente, el péptido de la invención tiene una identidad de secuencia según la SEQ ID No. 1 o No. 2.

Las variantes de secuencia de aminoácidos de un péptido contemplado en el presente documento pueden ser variantes sustitucionales, insercionales o de delección. Las variantes de delección carecen de uno o más residuos del péptido que pueden no ser críticos para la función. Las variantes sustitucionales contienen típicamente un aminoácido alternativo en uno o más sitios dentro del péptido y pueden estar diseñadas para modular una o más propiedades del polipéptido, como la estabilidad frente a la escisión proteolítica. Las sustituciones son preferentemente conservadoras, es decir, un aminoácido se reemplaza por uno de tamaño similar y cadena lateral o grupo funcional. Las sustituciones conservadoras son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, los cambios de alanina a glicina, valina o leucina; arginina a lisina; asparagina a glutamina; aspartato a glutamato; cisteína a metionina; glutamina a asparagina; glutamato a aspartato; glicina a prolina; histidina a glutamina, tirosina, arginina, lisina, asparagina o cisteína; isoleucina a leucina o valina; leucina a valina o isoleucina; lisina a arginina; fenilalanina a tirosina, leucina o metionina; serina a treonina; treonina a serina; triptófano a fenilalanina; tirosina a triptófano o fenilalanina; y valina a isoleucina o leucina.

Preferentemente, el péptido de la invención se deriva o se aísla de *Theobroma cacao*. De manera más particular, dicho péptido de la invención se deriva de la región N-terminal de la proteína vicilina de *Theobroma cacao*. La vicilina es una proteína de almacenamiento presente y caracterizada en varias especies de plantas, como, entre otras, *Ananas comosus*, *Arachis hypogaea*, *Beta vulgaris*, *Capsicum annuum*, *Capsicum chinense*, *Carya illinoensis*, *Chenopodium quinoa*, *Corchorus olitorius*, *Cucurbita maxima*, *Fragaria vesca*, *Glycine max*, *Gossypium arboreum*, *Herrania umbratica*, *Hordeum vulgare*, *Jatropha curcas*, *Juglans regia*, *Macadamia integrifolia*, *Macleaya cordata*, *Musa acuminata*, *Papaver somniferum*, *Ricinus communis*, *Solanum lycopersicum*, *Spinacia oleracea*, *Stenocarpus sinuatus*, *Theobroma cacao* y *Zea mays*. Dichas proteínas contienen típicamente una región N-proximal extremadamente hidrófila y una región C-terminal. Además, se producen con un péptido señal N-terminal hidrófobo, que generalmente se elimina durante la maduración de la proteína. La región N-proximal de dicha proteína precursora es particularmente interesante ya que contiene por lo menos dos, preferentemente cuatro pares de motivos de cisteína (CXXXC) con el mismo patrón de espaciado.

En otra modalidad, el péptido como se divulga en este documento se deriva de la variedad CCN-51 *Theobroma cacao*. Sorprendentemente, se demostró que la variedad de cacao CCN-51, conocida por su alta resistencia a las infestaciones microbianas, es particularmente rica en péptido N-terminal derivado de vicilina.

En otra modalidad adicional, dicho péptido comprende un péptido señal en su extremo N. Preferentemente, dicho péptido señal tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID No. 3. En otra modalidad, dicho péptido señal exhibe por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más preferentemente un 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 3. Alternativamente, dicho péptido tiene una secuencia de péptido señal que difiere en un máximo de 3, más preferentemente un máximo de 2, incluso más preferentemente 1 residuo de aminoácido de la secuencia SEQ ID No. 3. Las proteínas de vicilina aisladas de fuentes naturales no tienen típicamente dicho péptido señal. Se ha

descubierto sorprendentemente que cuando se añadió un péptido señal al péptido, se mejoró su actividad antimicrobiana.

En otra modalidad, el péptido es un péptido recombinante o sintético. Un sistema de expresión adecuado, como *Escherichia coli*, u otro sistema adecuado conocido en la técnica, tras la inserción de un vector que contiene una secuencia de codificación para un péptido con una SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2, da lugar a un péptido. Se puede emplear cualquier método de síntesis de proteína/péptido adecuado conocido en la técnica para sintetizar el péptido de la invención.

En otra modalidad adicional, el péptido descrito en el presente documento está provisto de una etiqueta de afinidad en su extremo N y/o C. Las etiquetas de afinidad se utilizan para la purificación por afinidad de proteínas recombinantes y péptidos expresados en *Escherichia coli* y otros sistemas. Dicha etiqueta puede ser una etiqueta de polihistidina, que es un motivo de aminoácido que consta de por lo menos seis residuos de histidina (His).

En una modalidad, un péptido como se divulga en el presente documento que contiene un péptido señal tiene una identidad de secuencia de acuerdo con la SEQ ID No. 4 o No. 5.

Alternativamente y sin ser limitante, el péptido se puede etiquetar con una etiqueta HQ que alterna residuos de histidina y glutamina (HQQHQ), una etiqueta HN que alterna histidina y asparagina (HNHNHNHNHNHN), una etiqueta HAT (KDHLIHNVHKEEHAHAHNK), una etiqueta ALFA (SRLEEELRRRLTE), una etiqueta Avi (GLNDIFEAQKIEWHE), una etiqueta C (EPEA), una etiqueta (KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL), una etiqueta de poliglutamato, una etiqueta de poliarginina, una etiqueta E (GAPVPYPDPLEPR), una etiqueta FLAG (DYKDDDDK), una etiqueta HA (YPYDVPDYA), una etiqueta Myc (EQKLISEEDL), una etiqueta NE (TKENPRSNQEESYDDNES), una etiqueta Rho1D4 (TETSQVAPA), una etiqueta S (KETAAAKFERQHMDs), un Etiqueta SBP

(DEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP) o una etiqueta Strep (WSHPQFEK).

El análisis del péptido de la invención mostró que el péptido tiene actividad antibacteriana y/o antifúngica.

El péptido antimicrobiano en sí tiene una estructura tridimensional particular que puede determinarse utilizando técnicas de cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear. Sin ánimo de limitarse a la teoría, se cree que esta estructura desempeña un papel en la actividad observada de dicho péptido. Los péptidos antimicrobianos derivados de plantas (AMPs) de hélice alfa, a los que pertenece el péptido de la invención, a menudo tienen hélices anfipáticas con una cara de la hélice predominantemente hidrófila y la otra cara predominantemente hidrófoba. Esta estructura se encuentra regularmente en AMPs que alteran las membranas celulares para provocar la fuga del contenido celular y la lisis y en AMPs que ingresan a las células para atacar otras estructuras dentro de la célula. Los AMPs alfa-helicoidales suelen estar estructuralmente desordenados en solución, lo que facilita el paso a través de la densa red de la pared celular. Al unirse a la membrana celular, que es hidrófoba y está cargada por debajo de las cabezas lipídicas, se forman estructuras secundarias (hélices alfa) que permiten que la proteína penetre en la membrana celular. Esta transición de orden/desorden está regulada predominantemente por la longitud del dominio hidrófobo dentro de las hélices alfa. Las hélices hidrófobas demasiado largas dan lugar a estructuras ordenadas en solución, lo que tiene un impacto negativo en la actividad de los AMPs.

En una modalidad, dicho péptido es activo frente a bacterias y hongos Gram-positivos y Gram-negativos, preferentemente hongos hifales o levaduras. Sin ser limitante, el péptido es activo frente a bacterias seleccionadas del grupo que comprende: *Acinetobacter spp.*, *Bartonella spp.*, *Bordetella spp.*, *Borrelia spp.*, *Brucella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Chlamydia spp.*, *Clostridium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Erwinia spp.*,

Escherichia spp., Francisella spp., Haemophilus spp., Helicobacter spp., Klebsiella spp., Legionella spp., Leptospira spp., Listeria spp., Mycobacterium spp., Mycoplasma spp., Neisseria spp., Rickettsia spp., Salmonella spp., Shigella spp., Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Treponema spp., Ureaplasma spp., Vibrio spp., Yersinia spp., Acidovorax spp., Agrobacterium spp., Arthrobacter spp., Bacillus spp., Burkholderia spp., Clavibacter spp., Cronobacter spp., Curtobacterium spp., Lefisonia spp., Pantoea spp., Paenibacillus spp., Pectobacterium spp., Phytoplasma spp., Proteus spp., Pseudomonas spp., Ralstonia spp., Rhizobacter spp., Rhizomonas spp., Rhodococcus spp., Serratia spp., Sphingomonas spp., Spiroplasma spp., Streptomyces spp., Xanthomonas spp., Xylella spp. o Xylophilus spp.

Sin ánimo de ser limitante, el péptido de la invención es activo frente a hongos seleccionados del grupo que comprende: *Ajellomyces spp., Aspergillus spp., Basidiobolus spp., Blastomyces spp., Candida spp., Coccidioides spp., Conidiobolus spp., Cryptococcus spp., Emmonsia spp., Histoplasma spp., Hanseniaspora spp., Lacazia spp., Paracoccidioides spp., Pneumocystis spp., Sporothrix spp., Stachybotrys spp., Talaromyces spp., Acrocalymma spp., Aecidium spp., Albonectria spp., Allodus spp., Alternaria spp., Amphobotrys spp., Apiosporina spp., Armillaria spp., Blumeria spp., Botryotinia spp., Botrytis spp., Ceratosystis spp., Colletotrichum spp., Cryptosporiopsis spp., Exobasidium spp., Fusarium spp., Hypocrea spp., Leptosphaeria spp., Magnaporthe spp., Melampsora spp., Meyerozyma s. pp., Monilinia spp., Mycosphaera spp., Microsphaera spp., Mucor spp., Penicillium spp., Pichia spp., Phytophthora spp., Saccharomyces spp., Sporobolomyces spp., Plasmodiophora spp., Podosphaera spp., Puccinia spp., Pythium spp., Rhizoctonia spp., Sclerotinia spp., Septoria spp., Taphrina spp., Thanatephorus spp., Torulaspora spp., Uromyces spp., Ustilago spp., Venturia spp. o Verticillium spp.*

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona composiciones que comprenden un péptido como se describe en los párrafos anteriores. Esta

composición es particularmente adecuada para aplicaciones farmacéuticas y veterinarias, para la protección de cultivos y/o para aplicaciones cosméticas.

En una modalidad, dicha composición comprende un péptido que muestra por lo menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2 o que difiere en un máximo de 5 aminoácidos de la secuencia de acuerdo con la SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2 y un excipiente.

En algunas modalidades de la composición como se describe en el presente documento, dicho péptido comprende un péptido señal que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 95 % con la SEQ ID No. 3 o tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID No. 3.

En una modalidad, las composiciones son líquidas, semisólidas, sólidas o gaseosas y/o están en una forma de dosificación de comprimido, cápsula, polvo, granulado, aerosol, pasta, jarabe, suspensión, emulsión o solución. Ejemplos no limitantes de dichas composiciones son polvos solubles, gránulos solubles, gránulos humectables, formulaciones de comprimidos, fluidos secos, fluidos acuosos, gránulos dispersables humectables, dispersiones de aceite, concentrados de suspensión, concentrados dispersables, concentrados emulsionables, suspensiones acuosas, gránulos fertilizantes o composiciones pulverizables. Dichas composiciones pueden formularse de manera que sean adecuadas para administración oral, inyectable, intravenosa, intramuscular, cutánea, por inhalación, tópica o intranasal. En otra modalidad, dichas composiciones están formuladas para permitir el recubrimiento de uno o más objetos, pulverización, recubrimiento por pulverización, evaporación, nebulización, atomización, suspensión, dilución, etc.

En algunas modalidades, las composiciones comprenden un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. De preferencia, dichos excipientes se eligen entre rellenos, aglutinantes, desintegrantes, edulcorantes, recubrimientos, lubricantes y/o deslizantes. Los diluyentes o rellenos aumentan el volumen de las composiciones sólidas y pueden hacer que una forma de

dosificación que contiene las composiciones sea más fácil de manipular para el paciente y el cuidador. Los diluyentes adecuados para comprimidos según la presente invención incluyen, por ejemplo, celulosa microcristalina (por ejemplo, Avicel®), celulosa microfina, lactosa, almidón, almidón pregelatinizado, carbonato de calcio, sulfato de calcio, azúcar, dextratos, dextrina, dextrosa, fosfato de calcio dibásico dihidratado, fosfato de calcio tribásico, caolín, carbonato de magnesio, óxido de magnesio, maltodextrina, manitol, polimetacrilatos (por ejemplo, Eudragit®), cloruro de potasio, celulosa en polvo, cloruro de sodio, sorbitol y talco.

Las composiciones sólidas que se compactan en una forma de dosificación, como una tableta, pueden incluir excipientes cuyas funciones incluyen ayudar a contener el ingrediente activo y otros excipientes juntos después de la compresión. Los aglutinantes adecuados incluyen acacia, ácido algínico, carbómero (por ejemplo, carbopol), carboximetilcelulosa sódica, dextrina, etilcelulosa, gelatina, goma guar, aceite vegetal hidrogenado, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa (por ejemplo, Klucel®), hidroxipropilmetilcelulosa (por ejemplo, Methocel®), glucosa líquida, silicato de magnesio y aluminio, maltodextrina, metilcelulosa, polimetacrilatos, povidona (por ejemplo, Kollidon®, Plasdone®, almidón pregelatinizado, alginato de sodio y almidón.

La velocidad de disolución de las composiciones sólidas compactadas se puede aumentar mediante la adición de un desintegrante a las composiciones. Los desintegrantes adecuados incluyen ácido algínico, carboximetilcelulosa cálcica, carboximetilcelulosa sódica (por ejemplo, Ac-Di-Sol®, Primellose®), dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa sódica, crospovidona (por ejemplo, Kollidon®, Poliplasdone®), goma guar, silicato de aluminio y magnesio, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polacrilina potásica, celulosa en polvo, almidón pregelatinizado, alginato de sodio, glicolato de almidón sódico (por ejemplo, Explotab®) y almidón.

Se pueden añadir deslizantes para mejorar la fluidez de las composiciones sólidas no compactadas y para mejorar la precisión de la dosificación. Los excipientes que pueden funcionar como deslizantes incluyen dióxido de silicio coloidal, trisilicato de magnesio, estearato de magnesio, celulosa en polvo, almidón, talco y fosfato de calcio tribásico.

Cuando se elabora una forma de dosificación, como un comprimido, mediante la compactación de una composición en polvo, la composición se somete a la presión de un punzón y un tinte. Algunos excipientes e ingredientes activos tienden a adherirse a las superficies del punzón y el tinte, lo que puede provocar que el producto presente picaduras y otras irregularidades en la superficie. Se puede añadir un lubricante a las composiciones para reducir la adhesión y facilitar la liberación del producto del tinte. Los lubricantes incluyen estearato de magnesio, estearato de calcio, monoestearato de glicerilo, palmitoestearato de glicerilo, aceite de ricino hidrogenado, aceite vegetal hidrogenado, aceite mineral, polietilenglicol, benzoato de sodio, lauril sulfato de sodio, estearil fumarato de sodio, ácido esteárico, talco y estearato de cinc. Preferentemente, dicho lubricante está presente en una proporción de entre el 0.25 y el 1 % (p/p) en peso.

Los agentes aromatizantes y potenciadores del sabor hacen que la forma de dosificación sea más agradable al paladar del paciente. Los agentes aromatizantes y potenciadores del sabor habituales para productos farmacéuticos que pueden incluirse en las composiciones descritas en el presente documento incluyen maltol, vainillina, etil vainillina, mentol, ácido cítrico, ácido fumárico, etil maltol y ácido tartárico.

Las composiciones sólidas también pueden teñirse utilizando cualquier colorante farmacéuticamente aceptable para mejorar su apariencia y/o facilitar la identificación por parte del paciente del producto y el nivel de dosificación unitaria.

En una modalidad y específicamente cuando las composiciones están destinadas a un uso agrícola, dichos excipientes son excipientes compatibles con la agricultura. Dichos “vehículos compatibles con la agricultura” o “excipientes compatibles con la agricultura” que pueden considerarse como un vehículo, son generalmente inertes y deben ser aceptables en la agricultura. Por lo tanto, la frase “compatible con la agricultura” denota una sustancia que puede usarse rutinariamente en condiciones de campo sin interferir con el equipo de plantación de los agricultores y sin influir negativamente en el desarrollo del cultivo o el equilibrio ecológico deseado en un área cultivada.

Los vehículos o excipientes compatibles con la agricultura pueden ser sólidos. Los excipientes o portadores sólidos pueden incluir, entre otros, arcillas, silicatos naturales o sintéticos, sílice, resinas, ceras, fertilizantes sólidos, un polímero, una masa granular, perlita, un gránulo de perlita, turba, un pellet de turba, tierra, vermiculita, carbón vegetal, lodo de prensa de carbonatación de fábrica de azúcar, cáscara de arroz, carboximetilcelulosa, arena fina, carbonato de calcio, harina, alumbre, un almidón, talco, polivinilpirrolidona o una combinación de los mismos. El excipiente o portador compatible con la agricultura puede ser un líquido. Los excipientes o portadores líquidos pueden incluir, entre otros, agua, alcoholes, cetonas, fracciones de petróleo, aceites, hidrocarburos aromáticos o parafínicos, hidrocarburos clorados, gases licuados o una combinación de los mismos. Más particularmente, los portadores o excipientes compatibles con la agricultura pueden incluir un dispersante, un surfactante, un aditivo, un espesante, un agente antiaglomerante, un agente de descomposición de residuos, una formulación de compostaje, una aplicación granular, tierra de diatomeas, un agente colorante, un estabilizador, un conservante, un polímero, un recubrimiento o una combinación de los mismos. Una persona experta en la técnica puede determinar fácilmente el portador o excipiente apropiado que se utilizará teniendo en cuenta factores tales como un compuesto particular, la planta a la que se aplicará el inóculo, el tipo de suelo, las condiciones climáticas, si el inóculo está en forma líquida, sólida o en polvo, y similares. El aditivo puede comprender un aceite, una goma, una resina, una arcilla, un polioxietilenglicol, un terpeno, un compuesto orgánico viscoso, un

éster de ácido graso, un alcohol sulfatado, un sulfonato de alquilo, un sulfonato de petróleo, un sulfato de alcohol, un diamato de alquil butano sódico, un poliéster de dioato de tiobutano sódico, un derivado de acetonitrilo de benceno, un material proteínico o una combinación de los mismos. El material proteínico puede incluir un producto lácteo, harina de trigo, harina de soya, sangre, albúmina, gelatina o una combinación de los mismos. El espesante puede comprender un alquilsulfonato de polietilenglicol de cadena larga, oleato de polioxietileno o una combinación de los mismos. El surfactante puede contener un aceite de petróleo pesado, un destilado de petróleo pesado, un éster de ácido graso de poliol, un éster de ácido graso polietoxilado, un polioxietilenglicol de arilo alquilo, un acetato de amina de alquilo, un sulfonato de arilo de alquilo, un alcohol polihídrico, un fosfato de alquilo o una combinación de los mismos. El agente antiaglomerante puede incluir una sal de sodio, como un sulfito de sodio, un sulfato de sodio, una sal de sodio de sulfonato de monometilnaftaleno o una combinación de los mismos; o una sal de calcio, como carbonato de calcio, tierra de diatomeas o una combinación de los mismos.

En una modalidad, dichas composiciones comprenden además uno o más de los siguientes: agua, otra sustancia nutritiva, ácido débil, aceite vegetal, aceite esencial, estimulante del metabolismo, agente emulsionante, agente de viscosidad, material colorante, agente de suspensión, agente de dispersión, conservante, agente complejante, estabilizador, portador, vehículo o agente humectante, o cualquier combinación de los mismos. En una modalidad, dichas composiciones comprenden además por lo menos un aceite, un surfactante y un polímero.

Las composiciones pueden fabricarse de manera convencional. En ciertas modalidades, las composiciones proporcionadas en el presente documento incluyen uno o más conservantes para inhibir la actividad microbiana. Los conservantes adecuados incluyen sustancias que contienen mercurio, como merfen y tiomersal; dióxido de cloro estabilizado; y compuestos de amonio

cuaternario, como cloruro de benzalconio, bromuro de cetiltrimetilamonio y cloruro de cetilpiridinio.

Los péptidos como se describen en este documento se pueden formular en las composiciones en una cantidad de entre 0.1 y 50 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 45 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 40 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 35 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 30 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 25 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 20 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 15 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 10 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 9 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 8 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 7 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 6 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 5 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 4 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 3 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 2 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 1 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 0.9 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 0,8 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 0.7 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 0.6 µg/ml, preferentemente entre 0.1 y 0.5 µg/ml o preferentemente entre 0.1 y 0.4 µg/ml.

Alternativamente, los péptidos se pueden formular en las composiciones en una cantidad de entre 0.2 y 50 µg/ml, preferentemente entre 0.3 y 50 µg/ml, preferentemente entre 0.4 y 50 µg/ml, preferentemente entre 0.5 y 50 µg/ml, preferentemente entre 0.6 y 50 µg/ml, preferentemente entre 0.7 y 50 µg/ml, preferentemente entre 0.8 y 50 µg/ml, preferentemente entre 0.9 y 50 µg/ml, preferentemente entre 1 y 50 µg/ml, preferentemente entre 2 y 50 µg/ml, preferentemente entre 3 y 50 µg/ml, preferentemente entre 4 y 50 µg/ml, preferentemente entre 5 y 50 µg/ml, preferentemente entre 6 y 50 µg/ml, preferentemente entre 7 y 50 µg/ml, preferentemente entre 8 y 50 µg/ml, preferentemente entre 9 y 50 µg/ml, preferentemente entre 10 y 50 µg/ml, preferentemente entre 15 y 50 µg/ml, preferentemente entre 0.5 y 20 µg/ml, preferentemente entre 25 y 50 µg/ml, preferentemente entre 30 y 50 µg/ml, preferentemente entre 35 y 50 µg/ml, preferentemente entre 40 y 50 µg/ml, preferentemente entre 45 y 50 µg/ml,

En otra modalidad, las composiciones contienen por lo menos 0.1 % en peso del péptido, más preferentemente por lo menos 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99.5% en peso de péptido.

En un tercer aspecto, los péptidos o composiciones como se describen en este documento son adecuados para uso terapéutico.

En una modalidad, el péptido o la composición para uso terapéutico comprende un péptido que presenta por lo menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2 o que difiere en un máximo de 5 aminoácidos de la secuencia de acuerdo con la SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2.

En una modalidad adicional, dicho péptido comprende un péptido señal que tiene una identidad de secuencia de por lo menos un 95 % con SEQ ID No. 3 o tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID No. 3.

El término “uso terapéutico” tal como se describe en el presente documento se refiere al uso de los péptidos o de las composiciones de los mismos para mejorar los síntomas de una enfermedad en un ser humano o en un animal no humano. Al poner en práctica los métodos de tratamiento o uso proporcionados en el presente documento, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica descrita en el presente documento a un sujeto, como un mamífero o un animal no mamífero, que padece una enfermedad, trastorno o afección que se va a tratar. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar ampliamente dependiendo de la gravedad de la enfermedad, la edad y la salud relativa del

sujeto, la potencia del agente terapéutico utilizado y otros factores. Los agentes terapéuticos y, en algunos casos, las composiciones descritas en el presente documento, se pueden utilizar individualmente o en combinación con uno o más agentes terapéuticos como componentes de mezclas.

En una modalidad, los péptidos descritos en el presente documento se utilizan en composiciones farmacéuticas para el tratamiento o la prevención de infecciones provocadas por una amplia gama de microorganismos, incluyendo bacterias grampositivas y gramnegativas, y/u hongos, preferentemente hongos hifales o levaduras, en un sujeto que lo necesite. Dicho sujeto puede ser un ser humano o un animal. Dichas composiciones farmacéuticas pueden contener una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido antimicrobiano y un vehículo adecuado.

En una modalidad, el péptido o la composición para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas y/o fúngicas en un sujeto que lo necesita comprende un péptido que muestra por lo menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2 o que difiere en un máximo de 5 aminoácidos de la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2.

En una modalidad adicional, dicho péptido comprende un péptido señal que tiene una identidad de secuencia de por lo menos un 95 % con la SEQ ID NO. 3 o tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 3.

Los péptidos o composiciones descritos en este documento se pueden administrar a un sujeto por vías de administración apropiadas, que incluyen, entre otras, vías de administración intravenosa, intraarterial, oral, parenteral, bucal, tópica, transdérmica, rectal, intramuscular, subcutánea, intraósea, transmucosa, por inhalación o intraperitoneal. La composición descrita en el presente documento puede incluir, entre otras, dispersiones líquidas acuosas, dispersiones autoemulsionantes, soluciones sólidas, dispersiones liposomales, aerosoles, formas de dosificación sólidas, polvos, formulaciones de liberación inmediata, formulaciones de liberación controlada, formulaciones de fusión

rápida, comprimidos, cápsulas, píldoras, formulaciones de liberación retardada, formulaciones de liberación prolongada, formulaciones de liberación pulsátil, formulaciones multiparticuladas y formulaciones mixtas de liberación inmediata y controlada.

En una modalidad, los péptidos o composiciones como se describe en el presente documento se pueden añadir al pienso para animales para reducir las posibles infecciones microbianas en el ganado. En otra modalidad, los péptidos o composiciones como se describe en el presente documento se formulan para administración oral, tópica o parenteral para tratar infecciones microbianas en medicina veterinaria.

En otra modalidad, los péptidos o composiciones como se describe en el presente documento son adecuados para su uso en la protección de cultivos, como aditivo para piensos o alimentos, para uso farmacéutico, como conservante y/o como descontaminante.

En una modalidad, dicho péptido o composición peptídica comprende un péptido que presenta por lo menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2 o que difiere en un máximo de 5 aminoácidos de la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2.

En una modalidad adicional, dicho péptido comprende un péptido señal que tiene una identidad de secuencia de por lo menos un 95 % con la SEQ ID NO. 3 o tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 3.

Cuando se utilizan para la protección de cultivos, los péptidos o las composiciones como se describe en este documento se formulan con un vehículo compatible con la agricultura o un portador compatible con la agricultura de acuerdo con las modalidades descritas anteriormente. El experto en la técnica determinará la dosis, la forma y el método de aplicación correctos de dicha composición, en función del cultivo tratado y del patógeno al que se dirige.

En una modalidad, los péptidos o composiciones descritos en este documento se incorporan en aditivos alimentarios o de piensos para evitar la propagación de patógenos a través de los piensos y los alimentos. Se sabe que los piensos pueden transportar patógenos que son perjudiciales para la salud y el bienestar de los animales. Los productos antisépticos como el formaldehído se utilizan habitualmente para desinfectar los piensos, pero estos productos pueden, a su vez, ejercer efectos negativos. Los péptidos antimicrobianos descritos en este documento son una alternativa segura.

En otra modalidad, los péptidos o las composiciones descritos en este documento son adecuados para su uso como descontaminantes o desinfectantes de superficies, herramientas, instrumentos, dispositivos, objetos o partes del cuerpo. En una modalidad, dichos dispositivos u objetos incluyen, entre otros, ropa de cama, telas, plásticos, tejidos de látex, cauchos naturales, dispositivos implantables, superficies o contenedores de almacenamiento. En una modalidad particular, los péptidos o las composiciones descritos en este documento se incorporan en agentes de limpieza, detergentes, jabones o aerosoles.

En ciertas modalidades, los péptidos descritos en este documento también se pueden incorporar en diversos productos para el cuidado de la salud, en particular productos cosméticos. Por ejemplo, los péptidos se pueden incorporar en pasta de dientes, enjuague bucal, champú, jabón, crema o antitranspirante para reducir o prevenir la colonización o el restablecimiento microbiano de la cavidad oral o la piel.

En otra modalidad, los péptidos y las composiciones como se describen en este documento se pueden usar como conservantes de alimentos, piensos, cosméticos o productos farmacéuticos o en el tratamiento de productos alimenticios para controlar, reducir o eliminar posibles patógenos o contaminantes.

En otra modalidad, los péptidos o composiciones como se describe en el presente documento se utilizan para controlar un patógeno en una planta, preferentemente en un cultivo en el que dichos patógenos son bacterias y/u hongos Gram-positivos y Gram-negativos, preferentemente hongos hifales o levaduras. Dicha planta puede ser una planta monocotiledónea o dicotiledónea, incluyendo legumbres forrajeras, plantas ornamentales, cultivos alimentarios, árboles o arbustos. En una modalidad, dicha planta es preferentemente un cultivo. Preferentemente, dicha planta pertenece al grupo de *Acer spp.*, *Actinidia spp.*, *Abelmoschus spp.*, *Agave sisalana*, *Agropyron spp.*, *Agrostis stolonifera*, *Allium spp.*, *Amaranthus spp.*, *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona spp.*, *Apium graveolens*, *Arachis spp.*, *Artocarpus spp.*, *Asparagus officinalis*, *Avena spp.*, *Averrhoa carambola*, *Bambusa spp.*, *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsea*, *Beta vulgaris*, *Brassica spp.*, *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, *Capsicum spp.*, *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carya spp.*, *Carthamus tinctorius*, *Castanea spp.*, *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*, *Cinnamomum spp.*, *Citrullus lanatus*, *Citrus spp.*, *Cocos spp.*, *Coffea spp.*, *Colocasia esculenta*, *Cola spp.*, *Corchorus spp.*, *Coriandrum sativum*, *Corylus spp.*, *Crataegus spp.*, *Crocus sativus*, *Cucurbita spp.*, *Cucumis spp.*, *Cynara spp.*, *Daucus carota*, *Desmodium spp.*, *Dimocarpus longan*, *Dioscorea spp.*, *Diospyros spp.*, *Echinochloa spp.*, *Elaeis spp.*, *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Erianthus spp.*, *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus spp.*, *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum spp.*, *Fagus spp.*, *Festuca arundinacea*, *Ficus carica*, *Fortunella spp.*, *Fragaria spp.*, *Ginkgo biloba*, *Glycine spp.*, *Gossypium hirsutum*, *Helianthus spp.*, *Hemerocallis fulva*, *Hibiscus spp.*, *Hordeum spp.*, *Ipomoea batatas*, *Juglans spp.*, *Lactuca sativa*, *Lathyrus spp.*, *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lotus spp.*, *Luffa acutangula*, *Lupinus spp.*, *Luzula sylvatica*, *Lycopersicon spp.*, *Macrotyloma spp.*, *Malus spp.*, *Malpighia emarginata*, *Mammea americana*, *Mangifera indica*, *Manihot spp.*, *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, *Melilotus spp.*, *Mentha spp.*, *Miscanthus sinensis*, *Momordica spp.*, *Morus nigra*, *Musa spp.*, *Nicotiana spp.*, *Olea spp.*, *Opuntia spp.*, *Ornithopus spp.*, *Oryza spp.*, *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*, *Pennisetum spp.*, *Persea spp.*, *Petroselinum*

crispum, *Phalaris arundinacea*, *Phaseolus spp.*, *Phleum pratense*, *Phoenix spp.*, *Phragmites australis*, *Physalis spp.*, *Pinus spp.*, *Pistacia vera*, *Pisum spp.*, *Poa spp.*, *Populus spp.*, *Prosopis spp.*, *Prunus spp.*, *Psidium spp.*, *Punica granatum*, *Pyrus communis*, *Quercus spp.*, *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes spp.*, *Ricinus communis*, *Rubus spp.*, *Saccharum spp.*, *Salix spp.*, *Sambucus spp.*, *Secale cereale*, *Sesamum spp.*, *Sinapis spp.*, *Solanum spp.*, *Sorghum bicolor*, *Spinacia spp.*, *Syzygium spp.*, *Tagetes spp.*, *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, *Trifolium spp.*, *Tripsacum dactyloides*, *Triticosecale rimpau*, *Triticum spp.*, *Tropaeolum minus*, *Tropaeolum majus*, *Vaccinium spp.*, *Vicia spp.*, *Vigna spp.*, *Viola odorata*, *Vitis spp.*, *Zea mays*, *Zizania palustris*, *Ziziphus spp.*; incluyendo las progenies e híbridos entre los anteriores.

Los péptidos o composiciones como se describe en este documento son adecuados para ser introducidos en una planta, una parte de la planta o un sustrato que comprende o alberga dicha planta, confiriendo de ese modo resistencia a patógenos o control de patógenos a dicha planta. Dicha introducción puede ser artificial.

Los métodos para introducir los péptidos o las composiciones de los mismos en las plantas pueden incluir: tratar la planta y/o una parte de la planta y/o medio de crecimiento en el que se cultiva dicha planta, se inocula las semillas, se recubre las semillas, se inocula directamente las plantas o partes de la planta, se rocía o humedecer las plantas o partes de la planta (por ejemplo, las espigas). Se puede elegir un método apropiado dependiendo del tipo de planta en la que se va a introducir el péptido o la composición.

Como otro ejemplo no limitante adicional, los péptidos o composiciones como se describe en este documento se pueden aplicar en forma de recubrimientos. El recubrimiento se puede aplicar a la semilla rociando sobre las semillas o sumergiendo dichas semillas en una solución que contiene el péptido o la composición. En otro ejemplo, para recubrir semillas con una solución como la

descrita en el ejemplo anterior, se puede añadir un agente aglutinante, tal como un agente aglutinante que comprende carburo (carbonato de calcio).

En algunas modalidades, el recubrimiento se puede aplicar a una parte de la planta desnuda y sin tratar. En otras modalidades, el recubrimiento se puede aplicar como una capa superior a una parte de la planta tratada previamente. Los recubrimientos de semillas son particularmente preferidos en el tratamiento de enfermedades fúngicas transmitidas por el suelo. En algunas modalidades, el recubrimiento de semillas se puede aplicar a una semilla desnuda y sin tratar. En otras modalidades, el recubrimiento de semillas se puede aplicar como una capa superior de semillas a una semilla tratada previamente.

En una modalidad, los péptidos o composiciones como se describe en este documento se pueden aplicar al suelo o cualquier otro sustrato en el que dicha planta crece con el fin de eliminar plagas y/o patógenos de dicho sustrato.

La inoculación del sustrato que comprende o alberga dicha planta o parte de la planta se puede realizar, a modo de ejemplo y sin la intención de ser limitante, utilizando un polvo, un gránulo, una pastilla, un tapón o un empapado de suelo que se aplica al sustrato. La inoculación también se puede realizar mediante una aplicación líquida, como una pulverización foliar o una composición líquida. La aplicación se puede aplicar a una planta en crecimiento o al sustrato. Las plantas, en particular las plantas agrícolas, pueden cultivarse en el sustrato. En una modalidad, dicho sustrato es tierra, arena, grava, polisacárido, mantillo, compost, musgo de turba, paja, troncos, arcilla o una combinación de los mismos. En otra modalidad, el sustrato también puede incluir un sistema de hidrocultivo o un sistema de cultivo *in vitro*. En algunas modalidades, se aplica una combinación de diferentes métodos de aplicación como se describe en el presente documento.

En una modalidad, los péptidos o las composiciones como se describe en el presente documento son adecuados para su uso en el tratamiento o prevención de infecciones patógenas en las que los patógenos se seleccionan del grupo

que consiste en bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas y/u hongos como se describe en cualquiera de las modalidades anteriores.

La invención como se describe en el presente documento también se refiere a una semilla de planta recubierta con el péptido o la composición descritos en cualquiera de las modalidades anteriores.

En otro aspecto, la invención se refiere a métodos para obtener los péptidos como se divulga en este documento, en donde dichos péptidos son péptidos recombinantes, péptidos sintéticos, o se extraen o precipitan de *Theobroma cacao*.

En una modalidad, los métodos como se divulga en este documento se utilizan para obtener un péptido que exhibe por lo menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2 o que difiere en un máximo de 5 aminoácidos de la secuencia según la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2 y en donde dicho péptido es un péptido recombinante, un péptido sintético, o se extrae o precipita de *Theobroma cacao*.

Se encontró que la variedad CCN-51 *Theobroma cacao* tiene altos niveles del péptido de la invención y por lo tanto se puede purificar económicamente a partir de granos de cacao CCN-51 utilizando la técnica de extracción y precipitación adecuada, seguida de técnicas de cromatografía optimizadas y otros métodos conocidos en la técnica anterior. Por lo tanto, la presente invención ofrece una solución para una valorización directa de los granos de cacao CCN-51, particularmente granos de cacao CCN-51 no fermentados para el aislamiento de un péptido que exhibe actividad antimicrobiana.

En una modalidad preferida, se utilizan granos de cacao no fermentados y/o fermentados y secos para la extracción de los péptidos como se divulga en este documento. En otra modalidad, se extrae cualquier tipo de tejido/órganos de *Theobroma cacao* para obtener el péptido de la presente invención. Debe entenderse que las mazorcas de cacao y/o las cáscaras, hojas, tallos y raíces

de los granos de cacao se pueden utilizar como material vegetal para la extracción del péptido de la invención sin apartarse del alcance de la presente invención. En otra modalidad, los péptidos como se divulga en este documento se pueden extraer o precipitar a partir de cualquier material procesado de *Theobroma cacao*.

En una modalidad, el material de la planta de cacao se recoge de granjas de cultivo de cacao seleccionadas y se utiliza para aislar los péptidos como se describe en este documento. Preferentemente, las muestras se almacenan a 4 °C para su posterior procesamiento. Alternativamente, las muestras se almacenan a -80 °C antes del procesamiento.

Para la extracción de péptidos, se pueden utilizar granos no fermentados y bien secos. La pulpa mucilaginosa de los granos no fermentados se retira típicamente, preferentemente se limpia. Las cubiertas de las semillas se pelan con un bisturí estéril, fórceps y/o cualquier otro aparato adecuado.

Los granos son ricos en lípidos y, en una modalidad preferida, los granos de cacao se desgrasan antes de la extracción de péptidos. En una modalidad, los granos de cacao molidos se pueden desgrasar en acetona, los granos en polvo residuales se secan y luego se extraen en un tampón acuoso. La inactivación de enzimas se reduce añadiendo lentamente acetona muy fría durante la extracción.

En una modalidad, dichos granos de cacao se someten a descascarado antes de la extracción de péptidos. Los materiales de grano descascarillado han demostrado la mejor capacidad de extracción del péptido en comparación con otras partes del cacao, como, entre otras, cáscaras y pulpa.

Los granos de cacao se muelen finamente utilizando un molino, molinillo o un mortero y mano de mortero adecuado, en donde dichos aparatos se enfrían previamente, preferentemente, en una atmósfera fría, una cámara de congelación o se enfrían con nitrógeno líquido. El polvo molido se almacena

típicamente a una temperatura que no exceda los 4 °C, preferentemente no exceda los 0 °C, más preferentemente a -20 °C para su posterior procesamiento.

En otra modalidad, se utiliza material vegetal congelado para la extracción de los péptidos como se describe en este documento. Todas las operaciones se llevan a cabo a una temperatura de 0° a 4 °C (es decir, en una cámara fría o en hielo). El procedimiento de extracción se realiza rápidamente para minimizar la exposición de las proteínas de interés a compuestos y enzimas potencialmente dañinos liberados tras la rotura celular.

En una modalidad, los granos de cacao se muelen sin dejar que el nitrógeno líquido entre en contacto con el tejido. Para garantizar que la muestra permanezca congelada, el mortero/molino y/o el triturador pueden colocarse en un estanque poco profundo de nitrógeno líquido (por ejemplo, en la tapa de una caja de poliestireno estándar). El material fresco puede molerse directamente en el tampón helado. En una modalidad, se utiliza un homogeneizador de tejidos para moler granos de cacao frescos no fermentados. En otra modalidad, los granos de cacao se muelen en una licuadora o un mortero y mano de mortero con la adición de arena lavada con ácido. La formación de espuma puede ser un problema al mezclar, y se puede lograr cierto grado de control añadiendo unas gotas de n-octanol o cualquier otro disolvente orgánico adecuado conocido en la técnica.

En una modalidad, se utiliza un tampón de extracción con un pH de preferentemente 8 para la extracción. Dicho tampón mantiene la estabilidad de los péptidos aislados tanto desde el punto de vista del pH como de la fuerza iónica. Algunos de los ejemplos no limitantes de tampones utilizados incluyen ácido N-2-hidroxietilpiperazina N-2-etanosulfónico (HEPES), fosfato, ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (MES), trisaminometano (TRIS), tampón TAE (base Tris, ácido acético y EDTA), TBE (base Tris, ácido bórico y EDTA) o cualquier mezcla de los mismos en acetona, fenol o cualquier otro disolvente adecuado o una mezcla de los mismos. Un experto en la materia debe

entender que la elección y el tipo de tampón se optimizan en función de la variedad de cacao, el uso de granos fermentados o no fermentados en el proceso de extracción. Se puede emplear cualquier tampón adecuado utilizado habitualmente en el estado de la técnica para extraer los péptidos, sin apartarse del alcance de la presente invención. El volumen de tampón de extracción utilizado por unidad de peso de material vegetal y/o granos de cacao depende del tipo de material vegetal y de la concentración de péptidos. De acuerdo con una modalidad de la invención, se logra una mejor extracción utilizando una relación mayor entre el volumen del tampón y el peso del material vegetal y/o de los granos de cacao (por ejemplo, 10:1).

En una modalidad, en un proceso de extracción de los péptidos como se describe en el presente documento, primero se concentra un extracto de muestra. Esto se puede hacer por precipitación, una técnica de cromatografía adecuada o cualquier otro método conocido en la técnica. En una modalidad, se añade entre un 10 % y un 20 % de glicerol (v/v) a un tampón de extracción para garantizar la estabilidad de los péptidos.

En una modalidad, se añade un antioxidante al tampón de extracción para evitar oxidaciones de los péptidos, para mantener el estado reducido de los grupos sulfhidrilo libres y para reducir la oxidación de otros componentes, como los fenólicos. Algunos ejemplos no limitantes de dichos antioxidantes incluyen ditioneitol (DTT), β -mercaptoetanol o ácido ascórbico y, en algunas circunstancias, si es necesario, agentes reductores más fuertes como el ditionito de sodio. En otra modalidad, se puede utilizar más de un agente reductor, como, por ejemplo, pero sin limitarse a, una combinación de DTT y β -mercaptoetanol.

En una modalidad, se añaden detergentes al tampón para mejorar la disrupción de las membranas y la solubilización de las proteínas de membrana. Algunos ejemplos no limitantes incluyen dodecil sulfato de sodio (por ejemplo, entre 0.1 y 1.0 %), Tween 80 (por ejemplo, entre 0.1 % y 1 %), Triton X-100 (por ejemplo, entre 0.1 % y 1 %), 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-2-hidroxi-1-

propanosulfonato (CHAPS) o glicósidos de octilo, o cualquier mezcla de los mismos. Un experto en la materia debe entender que se necesitan pruebas empíricas iniciales para determinar las combinaciones óptimas de surfactantes para maximizar la concentración de péptidos de vicilina (precursores) obtenidos en el extracto.

Debe entenderse que se pueden utilizar agentes protectores como, por ejemplo, entre otros, polivinilpirrolidona (PVPP), polivinilpirrolidona soluble (PVP) y/o polietilenglicol, para evitar la unión de polifenoles, como taninos, a los péptidos antimicrobianos de la invención.

Adicionalmente, se puede añadir cualquier inhibidor de proteinasa a un tampón durante la extracción de los péptidos antimicrobianos para controlar la degradación de las proteínas después de la extracción. Algunos ejemplos no limitantes de dichos inhibidores de proteinasa son fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), inhibidor de tripsina pancreática bovina (también conocido como aprotinina), clorhidrato de fluoruro de 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonilo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 1,10-fenantrolina o 2,2-bipiridilo, trans-epoxisuccinil-L-leucil-amido-(4-guanidino)butano, antipaína y leupeptina, pepstatina, proteinasas aspárticas, inhibidores de proteinasa disponibles comercialmente (por ejemplo, los proporcionados en forma de comprimidos por Roche y como soluciones por Sigma) que contienen un cóctel de estos inhibidores adaptados a las plantas, y similares.

En una modalidad particularmente preferida, para la extracción se utiliza un tampón Tris-HCl con ditioneitol (DTT) añadido como antioxidante y dodecil sulfato de sodio (SDS) como tensioactivo aniónico en un entorno alcalino y opcionalmente en presencia de un cóctel de inhibidores de proteinasas.

El tiempo de extracción/incubación se optimiza en función de la mezcla de extracción y la concentración de péptidos antimicrobianos en el material vegetal y puede variar de 15 minutos a 48 horas, preferentemente no menos de 30 minutos, más preferentemente no menos de 1 hora, y preferentemente no más

de 5 horas, más preferentemente no más de 3 horas. La temperatura de extracción preferentemente no debe superar los 40 °C, preferentemente no debe superar la temperatura ambiente (23 °C), y lo más preferentemente se realiza a una temperatura que no supere los 15 °C.

En una modalidad, los péptidos como se divulga en el presente documento pueden aislarse de semillas de cacao. Dichas semillas de cacao pueden ser fermentadas o no fermentadas. En otra o más modalidades, pueden ser semillas de cacao secas y/o no secas. En una modalidad preferida, los péptidos como se describe en el presente documento pueden aislarse de semillas de cacao secas y no fermentadas. En una modalidad, las semillas de cacao se trituran, se quitan las cáscaras y se prensan las semillas en un expulsor. De este modo, se obtiene una mezcla de manteca y suspensión. Dicha suspensión se utiliza para la extracción de péptidos en algunas modalidades.

En las modalidades en las que se utilizan las otras partes de la planta de cacao para extraer el péptido, se utilizan numerosos protectores, como tampones, antioxidantes, inhibidores de proteasas y similares para estabilizar las proteínas en los extractos. La cantidad de disolventes de extracción se mantiene en un mínimo razonable, para evitar la dilución de los extractos de proteínas. Los frutos del cacao son ácidos, con altos niveles de polifenoles y necesitan altas concentraciones de tampón para mantener el pH.

Los extractos de proteínas obtenidos mediante una etapa de extracción de acuerdo con la presente invención se separan preferentemente utilizando sedimentación, centrifugación, filtración o cualquier otra técnica comúnmente utilizada para obtener extractos de proteínas libres del material vegetal residual. Se puede utilizar la filtración a través de un paño, como, entre otros, Miracloth y similares. En otra modalidad, se prefiere un filtro de malla de nailon, ya que es muy resistente y se puede lavar y reutilizar.

En una modalidad, el filtrado se hace pasar por una gran columna de cromatografía ultrarrápida. De esta manera, se pueden separar de las proteínas varios polifenoles de bajo peso molecular que se unen a las proteínas durante la producción a gran escala.

Para la preparación de pequeñas muestras de tejido para ensayos en bruto, el extracto se puede desalinizar utilizando pequeñas columnas de filtración en gel, como, entre otros, columnas PD-10 o NAP, Amersham Biosciences y similares.

En otra modalidad, los péptidos como se describe en este documento se aíslan de los granos de cacao por precipitación isoeléctrica. Normalmente, esta precipitación se realiza una vez que las fracciones indeseables, como los carbohidratos, la grasa y/o el aceite se eliminan mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Este paso concentra la proteína en la porción restante del material vegetal.

De acuerdo con la presente invención, dichas porciones se disuelven en un tampón de un pH particular, y el pH se reduce al punto isoeléctrico de las proteínas para que puedan precipitarse. En una modalidad preferida, las proteínas del extracto se precipitan utilizando una solución de sulfato de amonio, preferentemente una solución de sulfato de amonio en la concentración de por lo menos 10 % en peso y como máximo 20 % en peso, lo más preferentemente una solución de sulfato de amonio de una concentración entre 12 y 14 % en peso. Las proteínas se recogen de los precipitados de proteínas por centrifugación.

En una modalidad preferida adicional, las proteínas precipitadas/extraídas se separan adicionalmente por electroforesis. En una modalidad particularmente preferida, dicha separación electroforética es una electroforesis bidimensional. Dicha electroforesis se realiza preferentemente en un gel de poliacrilamida. En una modalidad, dicha electroforesis se realiza en un gel SDS-PAGE al 15%. La electroforesis permite una alta purificación de los péptidos, eliminando las desventajas de las técnicas no electroforéticas que requieren mucha mano de

obra y son costosas. El campo vertical “separa” las proteínas según su movilidad en el campo, que se basa predominantemente en su peso molecular.

En una modalidad adicional, la separación es seguida por electroelución y similares, por lo que los péptidos son atraídos a la superficie de un gel, lo que permite la extracción y el posterior análisis de dicho péptido. En una modalidad, las bandas correspondientes a los péptidos se escinden del gel de electroforesis, se lavan en Tris-EDTA, se extraen mediante sonicación y centrifugación.

En una modalidad preferida adicional, el péptido de interés se seca mediante liofilización o centrifugación al vacío. Alternativamente, los péptidos se pueden precipitar con un agente adecuado. El péptido liofilizado y/o precipitado se volver a suspender opcionalmente en agua destilada y/o cualquier otro disolvente adecuado y se utiliza para análisis adicionales.

En otra modalidad, los péptidos extraídos o precipitados se concentran. Preferentemente, dichos péptidos se concentran mediante precipitación con sal estándar o disolvente orgánico. Alternativamente, los péptidos se concentran mediante diálisis frente a un tampón volátil (por ejemplo, carbonato de amonio), utilizando un concentrador basado en filtros o mediante cromatografía de intercambio iónico. Un experto en la materia debe saber que la concentración de los extractos/precipitados es un proceso lento y crítico y, por lo tanto, se debe tener especial cuidado de que los péptidos no se expongan a polifenoles y proteinasas durante estos procesos.

La cuantificación del contenido de péptidos se realiza mediante métodos espectrofotométricos como el método de Lowry o el ensayo de Bradford, o cualquier otro método conocido en la técnica. En otra modalidad, la cuantificación del péptido se realiza mediante cualquier método cromatográfico adecuado conocido en la técnica. En una modalidad preferida, se utiliza un método LC-MS para la cuantificación del contenido de péptidos. En una modalidad preferida, se realizan análisis MALDI-TOF en fragmentos generados

mediante digestión trípica de las proteínas obtenidas de extractos de cacao. En una modalidad, los datos obtenidos a partir de análisis de digestión trípica MALDI-MS se corroboran adicionalmente mediante la preparación y realización de ensayos inmunoquímicos para detectar diferencias específicas entre muestras.

En una modalidad preferida adicional, dicho péptido está sustancialmente libre de otros péptidos. El término “sustancialmente libre”, como se utiliza en el presente documento, significa por lo menos 95 % en peso libre de otros péptidos; preferentemente por lo menos 99 % en peso libre de otros péptidos. En una modalidad preferida, dicho péptido está presente en forma de cristal y/o sólida.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un vector que comprende una secuencia de codificación para un péptido que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 95 % con la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2 o que difiere en un máximo de 5 aminoácidos de la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2, y que comprende opcionalmente una secuencia para un péptido señal N-terminal, teniendo dicha secuencia de péptido señal una identidad de secuencia del 95 % con la SEQ ID NO. 3, o es una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 3, en donde dicho vector está diseñado para permitir la expresión de dicho péptido en un sistema de expresión. En una modalidad preferida, el vector comprende una secuencia de codificación de un péptido que tiene un 96 %, más preferentemente un 97 %, más preferentemente un 98 %, más preferentemente un 99 % o más preferentemente un 100 % de identidad con la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2. En una modalidad, dicho vector comprende una etiqueta de purificación como se divulgó en una modalidad anterior.

En una modalidad, el ADN extraído de las semillas de cacao se utiliza para amplificar la secuencia de codificación del péptido, y se clona en un vector de expresión adecuado, como cualquier plásmido o virus diseñado para la expresión génica en células.

Los péptidos descritos en el presente documento pueden expresarse en cualquier sistema adecuado con el fin de producir el péptido para su uso posterior. Los huéspedes adecuados para la expresión de la proteína incluyen *Escherichia coli*, células fúngicas, células de insectos, células de mamíferos y plantas. Los métodos estándar para expresar proteínas en dichos huéspedes se describen en una variedad de textos, incluyendo la sección 16 (Expresión de Proteínas) de *Current Protocols in Molecular Biology* (anteriormente mencionada).

En general, el ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de interés está contenido en un vector de expresión, en algunos casos unido en marco en el extremo 5' o 3' a otra secuencia de codificación de modo que codifique un péptido con por lo menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO.1 o la SEQ ID NO.2, y que opcionalmente comprende en el extremo N una SEQ ID NO. 3. La secuencia de codificación total está unida operativamente a un promotor de modo que el promotor impulsa la expresión de la secuencia de codificación. La secuencia de codificación también se denomina en el presente documento "gen diana".

De acuerdo con una modalidad, el promotor es un promotor nativo del microorganismo (por ejemplo, el promotor *trpE* de *Escherichia coli*), un promotor sintético como el promotor Tac, o un promotor obtenible a partir de un organismo heterólogo, por ejemplo, un virus, una bacteria o un bacteriófago como un fago λ o T7 que es capaz de funcionar en el microorganismo. El promotor puede ser constitutivo o, más preferentemente, inducible. El vector de expresión también puede contener un gen marcador seleccionable, que puede ser un gen de resistencia a antibióticos como un gen de resistencia a ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol o kanamicina.

Hay muchos sistemas promotores disponibles, a menudo de fuentes comerciales, que son adecuados para la expresión de péptidos de la invención en *Escherichia coli*. Por ejemplo, el promotor P_{BAD} del operón *araBAD* (arabinosa) tiene propiedades de inducción ventajosas, siendo inducible 1,200

veces por encima del nivel de fondo (Guzman et al., 1995). Otros promotores incluyen P_{LAC} , P_{TAC} , P_{TRC} , PL y PR. El promotor P_{TAC} es un híbrido derivado de los promotores *trp* y *lac* de *Escherichia coli*, y es uno de los sistemas promotores basados en *Escherichia coli* más potentes conocidos. Es inducible por IPTG, al igual que el promotor *lac*.

Las células hospedadoras preferidas de la presente invención son de la cepa hospedadora M15 de *Escherichia coli*. En otra modalidad preferida, se utilizan células hospedadoras de *Pichia pastoris* para la expresión de los péptidos de la invención.

En otra modalidad preferida, se realiza la selección de clones y se extraen los péptidos sobreexpresados a través de sus etiquetas de afinidad, utilizando agarosa Ni-NTA. Los péptidos recombinantes se separan y purifican utilizando los mismos métodos aplicados para los péptidos aislados de fuentes naturales en una modalidad anterior.

La expresión del nuevo péptido en una célula modificada genéticamente dará como resultado típicamente un producto que tiene una estructura tridimensional idéntica al péptido de origen natural, que se aísla del material de la planta de cacao. Esta estructura tridimensional incluye enlaces disulfuro intramoleculares formados correctamente entre los residuos de cisteína. Sin embargo, incluso si la proteína se sintetiza químicamente, se conocen métodos en la técnica para un procesamiento posterior de la proteína para romper los puentes disulfuro indeseables y formar los puentes entre los residuos de cisteína deseados para dar la estructura tridimensional deseada si esto fuera necesario.

En otra modalidad de la invención, dicho péptido se puede obtener mediante síntesis química utilizando las técnicas conocidas de síntesis de péptidos, tales como síntesis en fase sólida en instrumentos tales como sintetizadores de péptidos a temperatura ambiente, sintetizadores de péptidos de microondas, sintetizadores de péptidos paralelos y similares.

En una modalidad de la invención, es posible expresar el péptido como se describe en este documento en plantas transgénicas. En consecuencia, la presente invención también se refiere a plantas transgénicas que expresan uno o más péptidos como se describe en el presente documento.

En una modalidad, la planta transgénica expresa un péptido que presenta por lo menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2 o que difiere en un máximo de 5 aminoácidos de la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2. En una modalidad adicional, dicho péptido comprende una secuencia para un péptido señal N-terminal, teniendo dicha secuencia de péptido señal una identidad de secuencia del 95 % con la SEQ ID NO. 3.

En una modalidad adicional, la planta transgénica expresa un péptido que tiene un 96 %, más preferentemente un 97 %, más preferentemente un 98%, más preferentemente un 99 % o más preferentemente un 100% de identidad con la SEQ ID NO. 1 o la SEQ ID NO. 2.

En una modalidad, dicho péptido comprende una etiqueta de purificación como se divulgó en una modalidad anterior.

De acuerdo con la presente invención, las células vegetales pueden transformarse con constructos de ADN de acuerdo con una variedad de métodos de ingeniería genética conocidos (transformación de *Agrobacterium tumefaciens*, plásmidos Ti, electroporación, microinyecciones, pistola de microproyectiles, transformación mediada por PEG y similares). Un método de ingeniería genética como se usa en el presente documento puede entenderse como cualquier método usado para introducir secuencias de ADN extrañas en células vegetales, con el fin de regenerar plantas modificadas genéticamente que expresen rasgos o características deseados.

En una modalidad de la invención, las secuencias de ADN que codifican un péptido con por lo menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID

NO. 1 o la SEQ ID NO. 2, y que opcionalmente comprenden una SEQ ID NO. 3 en el extremo N, así como ADN que codifica homólogos de otras especies vegetales, se pueden utilizar junto con una secuencia de ADN que codifica una preproteína a partir de la cual se produce la proteína madura. Esta preproteína contiene una secuencia peptídica nativa, que dirigirá la proteína a un compartimento celular particular (por ejemplo, el apoplasto o la vacuola). Estas secuencias de codificación se pueden ligar a una secuencia promotora vegetal que asegurará una fuerte expresión en las células vegetales. Esta secuencia promotora podría asegurar una fuerte expresión constitutiva de la proteína en la mayoría o en todas las células vegetales, puede ser un promotor que asegure la expresión en tejidos o células específicos que son susceptibles a la infección microbiana y también puede ser un promotor que asegure una fuerte inducción de la expresión durante el proceso de infección. Estos tipos de casetes de genes también incluirán una secuencia de terminación de transcripción y poliadenilación 3' de la región codificante de la proteína antimicrobiana para asegurar la producción y estabilización eficientes del ARNm que codifica las proteínas antimicrobianas. Es posible que la expresión eficiente del péptido antimicrobiano divulgado en este documento pueda facilitarse mediante la inclusión de sus secuencias de ADN individuales en una secuencia que codifica un péptido mucho más grande.

Los casetes de genes que codifican los péptidos se expresan en células vegetales utilizando métodos conocidos en la técnica. En primer lugar, los casetes de genes se pueden ligar en vectores binarios que llevan: i) secuencias de borde izquierdo y derecho que flanquean el ADN-T del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*; ii) un gen marcador seleccionable adecuado para la selección de células vegetales resistentes a los antibióticos; iii) un origen de replicación que funciona tanto en *Agrobacterium tumefaciens* como en *Escherichia coli*; y iv) genes de resistencia a antibióticos que permiten la selección de células portadoras de plásmidos de *Agrobacterium tumefaciens* y *Escherichia coli*. Sin ánimo de ser limitativo, la secuencia de ADN de los péptidos divulgados en el presente documento puede clonarse en cualquier vector binario conocido en la técnica, como plásmidos (pEXA128, pBR322,

pUC19), bacteriófagos (fagos λ , fagos M13), cósmidos, BACs o YACs. El vector binario que lleva la secuencia de ADN de los péptidos puede introducirse mediante choque térmico, electroporación o apareamiento triparental en cepas de *Agrobacterium tumefaciens* que llevan plásmidos Ti desarmados, como las cepas LBA4404, GV3101 y AGL1, o en cepas de *Agrobacterium rhizogenes*, como A4 o NCCP1885. Estas cepas de *Agrobacterium* pueden entonces co-cultivarse con explantos vegetales adecuados o tejido vegetal intacto y las células vegetales transformadas y/o regenerantes seleccionarse utilizando resistencia a antibióticos. Alternativamente, el vector binario que lleva la secuencia de ADN de los péptidos puede sobreexpresarse en células bacterianas o fúngicas.

La presente divulgación también se refiere a un método para obtener una planta transgénica que expresa un péptido que muestra por lo menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2 o que difiere en un máximo de 5 aminoácidos de la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2 y que comprende opcionalmente una secuencia para un péptido señal N-terminal, teniendo dicha secuencia de péptido señal una identidad de secuencia del 95 % con la SEQ ID NO. 3.

El método comprende las etapas de:

(a) opcionalmente aislar o sintetizar una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido que muestra por lo menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2 o que difiere en un máximo de 5 aminoácidos de la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2;

e incorporar la secuencia de ácido nucleico en un vector de expresión adecuado;

(b) introducir el ácido nucleico en por lo menos una célula vegetal mediante un método de ingeniería genética para producir una célula vegetal transformada que exprese dicho péptido;

(c) regenerar la célula vegetal transformada en plantas transgénicas completas;

y

(d) seleccionar e identificar plantas transgénicas que expresen dicho péptido utilizando métodos de cribado adecuados.

En una modalidad del método como se divulga en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido se aísla utilizando cualquier método conocido en la técnica, como métodos de clonación de genes. Ejemplos no limitantes de clonación de genes incluyen la clonación basada en PCR y la clonación basada en enzimas de restricción.

En otra modalidad del método divulgado en el presente documento, la secuencia de ADN de los péptidos se introduce en la célula vegetal mediante bombardeo biolístico. El bombardeo biolístico implica la introducción de secuencias de ADN extrañas en las células vegetales utilizando una pistola de genes. La secuencia de ADN que codifica el péptido antimicrobiano como se divulga en el presente documento se une a partículas metálicas, como partículas de oro, y luego se bombardea en las células vegetales.

En otra modalidad más, la secuencia de ADN de los péptidos se introduce en la célula vegetal mediante electroporación, que implica el uso de pulsos eléctricos para crear poros en la membrana celular, lo que permite que la secuencia de ADN que codifica el péptido antimicrobiano entre en dicha célula. Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica el péptido antimicrobiano puede inyectarse directamente en la célula vegetal (microinyección).

En otra modalidad alternativa más, la secuencia de ADN que codifica dicho péptido se introduce en las células vegetales mediante transformación mediada por PEG que implica el uso de polietilenglicol (PEG) para crear poros temporales en la membrana celular, lo que permite que la secuencia de ADN entre en la célula.

Cualquier órgano, tejido o explanto de una planta puede utilizarse con el método de ingeniería genética para obtener la planta transgénica como se divulga en este documento. Ejemplos no limitantes incluyen: células

individuales, callos, semillas, explantos de hojas, explantos de tallos, explantos de raíces, tejido embrionario, meristemos o polen.

En general, el método de ingeniería genética específico y el explanto utilizado para obtener la planta transgénica que expresa el péptido como se divulga en este documento dependen de factores tales como la especie de planta, la eficiencia del método de transformación y el nivel deseado de expresión del péptido antimicrobiano.

En otra modalidad del método como se describe en este documento, la célula transformada se regenera en una planta completa que expresa el péptido.

Las plantas transgénicas que expresan el péptido se identifican y seleccionan. Esta etapa es esencial para eliminar las plantas no transformadas. La selección de resistencia a antibióticos o herbicidas es uno de los métodos de selección más utilizados para plantas transgénicas. Las plantas transgénicas se transforman con un gen que confiere resistencia a un antibiótico o herbicida y luego se cultivan en un medio que contiene dicho antibiótico o herbicida, que mata o inhibe el crecimiento de las plantas no transformadas. En algunas modalidades, las plantas transgénicas se transforman con un gen que codifica la proteína reportera y luego se pueden identificar y seleccionar fácilmente en función de la expresión del gen indicador.

En otras modalidades, las plantas transgénicas se seleccionan mediante selección nutricional. Este método se basa en la capacidad de las plantas transgénicas de crecer en medios que carecen de un nutriente específico que es esencial para el crecimiento de las plantas no transformadas. Las plantas transgénicas se transforman con un gen que confiere la capacidad de sintetizar el nutriente faltante.

La selección sin marcadores implica el uso de marcadores seleccionables que se pueden eliminar de las plantas transgénicas después de la selección. Esto se puede lograr utilizando sistemas de recombinación específicos del sitio,

como el sistema Cre-lox, que permite la eliminación del gen marcador seleccionable sin dejar ningún rastro del ADN extraño.

La invención se describe además mediante los siguientes ejemplos no limitantes que ilustran aún más la invención y no pretenden limitar, ni deben interpretarse que limita el alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Extracción, purificación e identificación de péptidos

Se recogieron muestras de granos de cacao derivados del híbrido de cacao CCN-51 de plantaciones de cacao pequeñas, tradicionales y de más de 30 años de antigüedad en Ecuador. Barry Callebaut AG proporcionó las muestras en forma no fermentada y fermentada/seca. Las muestras no fermentadas se enviaron en hielo seco y se almacenaron a -80 °C al llegar, mientras que las muestras secas fermentadas se enviaron y almacenaron a 4 °C para su posterior procesamiento. Se limpió la pulpa mucilaginosa de los granos no fermentados y se pelaron las cubiertas de las semillas con un bisturí estéril. Las cubiertas de las semillas de los granos fermentados se retiraron con fórceps. Los granos se molieron finamente con un molino de cuchillas Retsch Grindomix GM200 a 10,000 rpm. El polvo molido se utilizó directamente (o se almacenó a -20 °C para su posterior procesamiento).

Del polvo finamente molido, se transfirieron 250 mg a un tubo de microcentrífuga de polipropileno de 2 ml y se suspendieron en 1 ml de tampón de extracción de proteínas (100 mM Tris HCl, 1 % DTT y 1 % SDS; pH ajustado a 8.1; cóctel de inhibidores de proteasas de acuerdo con las instrucciones del fabricante). La mezcla se agitó en vórtex minuciosamente durante 60 segundos y se incubó durante 60 minutos con agitación suave a 4 °C, seguido de centrifugación a 13,200 rpm durante 20 minutos y a 4 °C en una centrífuga de banco 5810R. El sobrenadante que contenía la fracción de proteína se

transfirió suavemente a una taza nueva mediante pipeteo y se almacenó a -20 °C para su posterior análisis.

El contenido de proteínas de cacao extraídas se evaluó utilizando el método de Bradford MM divulgado en "Analytical Biochemistry" 1976; 72: 248-54.

Según el método de Bradford, a 10 µl de solución de proteína diluida, se añadieron 300 µl de reactivo de Bradford en una microplaca y se agitó brevemente. Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 595 nm por triplicado. Las concentraciones de proteína extraída se cuantificaron a partir de una curva estándar utilizando albúmina de suero bovino en el rango de concentración de 1 a 1500 µg/ml.

Las proteínas y/o péptidos de cacao extraídos se separaron de acuerdo con su peso molecular utilizando SDS-PAGE. En resumen, se mezclaron 25 µl de la muestra de proteína con 5 µl de tampón de muestra 6X que contenía azul de bromofenol como colorante de seguimiento. La mezcla se calentó a 95 °C durante 5 minutos y se cargó en geles SDS-PAGE (83 mm × 65 mm × 1 mm) que contenían 12.5 % o 15 % (p/v) de acrilamida. La electroforesis se realizó a 130 V durante 90 minutos. Después de la electroforesis, el gel se tiñó con azul de Coomassie® (45 % (v/v) de metanol, 10 % de ácido acético, 2.93 x 10⁻³ M Coomassie® Brilliant Blue G-250) durante 20 minutos o se transfirió electroforéticamente a membranas de PVDF como describieron previamente Towbin et al. en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 4350-4354. Las manchas se trataron con leche al 5 % (p/v) en PBST durante la noche a 4 °C. Posteriormente, las manchas de proteína se analizaron con un anticuerpo policlonal que se diluyó 1:2000 en PBST que contenía leche en polvo al 5 % (p/v) y se incubó durante 2 horas (h) a temperatura ambiente. Además, las manchas se lavaron seis veces, 5 minutos cada vez a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente, las manchas se incubaron en anticuerpo IgG de cabra anti-conejo conjugado con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente diluido 1:10,000 en PBST que contenía leche en polvo al 5 % (p/v). Después de la incubación, las manchas se lavaron seis veces con PBST, 5

minutos cada vez a temperatura ambiente con agitación suave. Finalmente, la HRP unida indirectamente se detectó por su actividad enzimática utilizando luminol como sustrato en presencia de peróxido de hidrógeno, como describen Mruk y Cheng en *Spermatogenesis*, 2011, 1, 121-122.

Antes de proceder a la electroforesis bidimensional, los extractos de proteína total se purificaron utilizando un kit de limpieza Ready Prep™ 2D. Para la eliminación de sustancias interferentes como detergentes iónicos, lípidos o compuestos fenólicos, los extractos de proteína total se purificaron utilizando dicho kit según lo recomendado por el fabricante. Después de la precipitación y el lavado en el tampón de lavado proporcionado con el kit, la muestra de proteína se volvió a suspender en 130 µL de tampón de rehidratación (tiourea 2 M, urea 6 M, CHAPS 16.2×10^{-3} M, DTT 25.9×10^{-3} M) y se complementó con anfolitos.

Se realizó electroforesis en gel 2D de proteínas de cacao mediante enfoque isoeléctrico y posterior SDS-PAGE. Para ello, se aplicaron 80 µg de proteína a tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) (7 cm, pH 3-10) y se dejaron en remojo durante 14 horas a temperatura ambiente. El enfoque isoeléctrico se llevó a cabo en una celda IEF Bio-Rad Protean® i12™ (50 V, 70 min; 150 V, 20 min; 300 V, 15 min; gradiente a 600 V, 10 min; 600 V, 15 min; gradiente a 1500 V, 10 min; 1500 V, 30 min; gradiente a 3,000 V, 20 min; 3,000 V, 210 min; pausa en 50 V). A continuación, las tiras de IPG se equilibraron durante 15 minutos en una solución de 6.48×10^{-2} M de DTT y 0.216 M de yodoacetamida disuelta en un tampón de equilibrio (urea 6 M, glicerol al 30 % (p/v), SDS 69.2×10^{-3} M en tampón Tris-HCl 0.05 M, pH 8.8) a temperatura ambiente. La separación del peso molecular se realizó en un sistema Bio-Rad Mini-Protean® Tetra (110 V, 10 min; 130 V más adelante) a través de un gel de poliacrilamida al 12.5 o 15 %. El peso molecular de las proteínas se evaluó mediante su movilización visual en el gel de poliacrilamida y el peso previsto de la secuencia de aminoácidos. Después de la tinción y desteñido, los geles 2D resultantes se escanearon en un escáner Epson.

Los geles 2D escaneados se procesaron con el software ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare). Al hacerlo, se establecieron los parámetros de detección automática de puntos para todas las muestras en: Smooth (Liso) = 6, Saliency (Prominencia) = 100, Min Area (Área Mínima) = 5. Los puntos no proteicos detectados, es decir, artefactos contaminantes que incluyen rayas y partículas de polvo, se eliminaron durante la selección manual de puntos. Los volúmenes de los puntos se restaron de forma predeterminada del fondo en función de los puntos, excluyendo los valores de píxel del décimo percentil más bajo en el límite del punto, de todos los demás valores de píxel dentro del límite del punto. Para hacer coincidir el conjunto de geles 2D, se definió una muestra de referencia, denominada gel maestro, que permitió la identificación de puntos proteicos idénticos en diferentes geles. El informe de coincidencia resultante enumera los puntos coincidentes en los geles 2D individuales con los puntos correspondientes en el gel maestro junto con el respectivo volumen de punto relativo normalizado.

Las manchas de proteína de interés se extrajeron de los geles 2D, se cortaron en trozos pequeños y se lavaron dos veces durante 15 minutos en 100 μ L de tampón de bicarbonato de amonio 0.05 M, que contenía 50 % de ACN (v/v). Los trozos de gel se deshidrataron mediante la adición de 500 μ L de acetonitrilo y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de decantar y secar brevemente al aire, las muestras se complementaron con tampón de digestión con tripsina y se incubaron durante 30 minutos a 55 °C como se estableció previamente. Las muestras se utilizaron directamente para los Análisis por espectrometría de masas con desorción Ionización-TOF láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS).

Para la identificación espectrométrica de patrones de péptidos, los péptidos se redujeron con 15 mM de TCEP o se utilizaron en forma no reducida. Los péptidos se cargaron en una columna Proshell 300SB-C8 (1 mm de diámetro interno x 75 mm, partículas de 5 μ l) equipada con una columna de protección de orificio estrecho Zorbax 300SB-C8 (2.1 mm de diámetro interno x 12.5 mm, partículas de 5 μ m). Las proteínas se eluyeron de la columna mediante un

gradiente lineal de 5 min desde el 95 % de disolvente A (0.1 % de ácido fórmico (FA), 0.05 % de ácido trifluoroacético (TFA) en agua) hasta el 90 % de disolvente B (0.1 % FA, 0.05 % TFA en acetonitrilo), seguido de un lavado de 3 minutos al 90 % de disolvente B, volviendo al 5 % de disolvente B en 2 minutos para un equilibrio de 2.5 minutos. El espectrómetro de masas se operó en modo MS a una resolución de 60000 (a m/z 400) en un rango de masas de 600 a 4000 m/z . Se utilizó un ajuste de AGC de $1E7$, lo que permitió llenar la trampa durante 1 segundo. Los ajustes de la fuente se establecieron en un SID de 15 V, una temperatura capilar de 325 °C a un voltaje de 4.2 kV.

Los espectros registrados se deconvolucionaron con el algoritmo Xtract TM en el software Freestyle (Thermo fisher scientific, EE. UU.).

Resultados: Los péptidos divulgados en este documento se identificaron en la fracción de proteína total aislada de los granos de cacao de la variedad CCN-51. Después de la separación 2D de las proteínas aisladas de los granos de cacao, se extirpó un punto correspondiente a 15 kDa y se digirió con tripsina (**Figura 1**). Los péptidos digeridos se identificaron utilizando análisis MALDI-TOF-MS (**Figura 2A**). El péptido recombinante de la SEQ ID NO. 2 se separó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, se escindió del gel y se sometió a digestión con tripsina, lo que dio como resultado una huella peptídica MALDI-TOF-MS que se muestra en la **Figura 2B**. Tanto en la muestra reducida como en la no reducida que contenía los péptidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 2, se detectaron masas de 15.3 kDa utilizando la huella de masa intacta. Los resultados de LC-MS de la muestra según la SEQ ID NO. 2 se muestran en la **Figura 3**.

Ejemplo 2: Producción de péptido recombinante

Se extrajo ADN total de embriones de granos de cacao CCN-51 y se amplificó la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido utilizando los cebadores Forward_BamH1-5'CGCGGATCCTATGGCAGAAAACAATAT3' y

Reverse_Kpn1-5'CGCGGTACCTTTGTGATTATGGTAATT3'. Esto dio como resultado un fragmento amplificado de ADN de 300 pb (ADN de interés).

El fragmento de ADN amplificado se ligó en los sitios BamH1/Kpn1 del vector de clonación pEXA128. Tanto el plásmido que contiene el ADN del péptido como el plásmido de sobreexpresión pQE30 se transformaron en células de *E. coli* DH5α para su amplificación. Los plásmidos se extrajeron de cultivos nocturnos, se digirieron con *Bam*HI y *Kpn*I a 37 °C durante 2 horas y se separaron en geles de agarosa al 1 %. Los plásmidos pQE30 linealizados y los insertos de los plásmidos pEXA128 se extrajeron de los geles y los insertos se ligaron en el plásmido pQE30. El plásmido de sobreexpresión pQE30 codifica la etiqueta HIS y la sobreexpresión del péptido de la invención dará lugar a un péptido de fusión que consiste en el péptido y una etiqueta HIS N-terminal. Los plásmidos resultantes se transformaron en células de sobreexpresión M15 de *E. coli*. Los plásmidos extraídos de cultivos nocturnos se secuenciaron y solo los clones que coincidían con las secuencias esperadas se utilizaron para la sobreexpresión. Se utilizaron 16 ml de cultivos nocturnos para inocular 800 ml de medio LB líquido a 37 °C. Una vez que se alcanzó una DO₆₀₀ de entre 0.6 y 0.8, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM para inducir la sobreexpresión. Las células que sobreexpresaban los péptidos que contenían el péptido señal se incubaron durante 24 horas a 20 °C, y la célula que sobreexpresaba los péptidos sin el péptido señal durante 5 horas a 37 °C.

El péptido recombinante se purificó e identificó como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3: Síntesis de los péptidos

Los péptidos de secuencia idéntica a la SEQ ID NO. 1 y SEQ ID NO. 2 fueron sintetizados químicamente por Seramun Diagnostica GmbH (Heidesee, Alemania).

Ejemplo 4: Ensayos de concentración inhibitoria mínima (CIM)

Los ensayos de CIM determinan la concentración más baja a la que un compuesto inhibe el crecimiento de una población microbiana. El potencial antimicrobiano de los péptidos descritos en este documento se comparó con la actividad de otros dos AMPs, TcAMP1 y TcAMP2, como se analiza en el documento WO1998027805, y antibióticos o fungicidas. Se llevaron a cabo ensayos comparativos de MIC frente a varias especies bacterianas y fúngicas (Tabla 1).

Los péptidos según la SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 6 y SEQ ID NO. 7 se diluyeron en serie para crear una secuencia de concentración que oscilaba entre 0.39 µg/ml y 303 µg/ml.

Pantoea, *Staphylococcus* y *Listeria* se cultivaron en un medio Trypticase Soy Broth (TSY) que consistía en 1.7 % de peptona de caseína, 0.3 % de peptona de soya, 0.25 % de glucosa, 0.5 % de NaCl, 0.25 % de K₂HPO₄ y, opcionalmente, 1.5 % de agar. Las células de *Candida* se cultivaron en un medio de caldo de Extracto de Levadura Peptona Dextrosa (YPD) que consistía en 1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona, 2 % de glucosa y, opcionalmente, 2 % de agar. *Ceratocystis*, *Botrytis*, *Leptosphaeria*, *Mycosphaerella*, *Sclerotinia* y *Verticillium* se cultivaron en un medio de Agar de Dextrosa de Patata (PDA) que consistía en 2.4 % de caldo premezclado Difco y, opcionalmente, 1.5 % de agar.

Para el ensayo de CIM, las bacterias y los hongos se cultivaron en placas de agar con sus respectivos medios. Los precultivos se prepararon inoculando colonias bacterianas individuales o pequeños trozos de hongos en 5 ml del medio líquido respectivo. La densidad óptica (DO) a 600 nm se midió después de uno a cinco días y se ajustó a una DO₆₀₀ de 1. Esta suspensión celular se utilizó para preparar diluciones 1:500, correspondientes a aproximadamente 2 x 10⁶ células microbianas por ml.

Para evaluar las CIMs, se prepararon placas de 96 pocillos con los péptidos antimicrobianos de prueba. Cada pocillo contenía 100 µl de cultivo de células

microbianas, 90 µl de medio de cultivo y 10 µl de péptido o control a la dilución correspondiente. Las placas se incubaron durante la noche (ON) a la temperatura de crecimiento óptima para cada organismo probado (Tabla 1). Los resultados se evaluaron visualmente y las CIMs se determinaron en función del crecimiento o la ausencia de crecimiento.

Tabla 1. Organismos que se analizaron en ensayos de CIM para una variedad de péptidos antimicrobianos. Se proporciona el nombre de la especie, la clasificación y las condiciones de crecimiento. DSM se refiere al número de orden de German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (DSMZ, Braunschweig, Alemania). SF se refiere a los organismos obtenidos de Jena Microbial Resource Collection (JMRC, Jena, Alemania).

Especies	Número de orden	Clasificación	Medio de crecimiento	Temperatura de crecimiento
<i>Pantoea agglomerans</i>	JUB-CC-3253	Bacteria gramnegativa	TSY	37°C
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	DSM 11729	Bacteria grampositiva	TSY	37°C
<i>Listeria monocytogenes</i>	DSM 102976	Bacteria grampositiva	TSY	37°C
<i>Candida albicans</i>	DSM 1386	Levadura	YPD	30°C
<i>Ceratosystis paradoxa</i>	DSMZ 63054	Hongo	PDA	18°C
<i>Botrytis cinerea</i>	DSMZ 877	Hongo	PDA	24°C
<i>Leptosphaeria maculans</i>	SF 70	Hongo	PDA	18°C
<i>Mycosphaerella pinodes</i>	DSMZ 62763	Hongo	PDA	30°C
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	SF 79	Hongo	PDA	18°C
<i>Verticillium dahlia</i>	SF 76	Hongo	PDA	28°C

Los ensayos de CIM se llevaron a cabo en por lo menos dos réplicas independientes y con diferentes concentraciones iniciales de péptidos. Las pruebas previas mostraron que ninguna de las etapas realizadas para purificar las proteínas analizadas afectó a las CIMs obtenidas.

Resultados: Todos los péptidos de acuerdo con la invención mostraron una fuerte actividad antimicrobiana contra todos los organismos analizados.

Los valores de CIM obtenidos para los péptidos de acuerdo con la SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.6 y SEQ ID NO.7 frente a especies de hongos se muestran en la Tabla 2. Todos los péptidos de la invención fueron más eficientes en la inhibición del crecimiento de hongos a una concentración menor que los péptidos de la técnica anterior.

Tabla 2. Resultados de los ensayos de CIM con especies de hongos como organismos de prueba y los péptidos de la invención (SEQ ID NO.1, NO. 2, NO. 4) y péptidos de la técnica anterior (SEQ ID NO.6 y NO. 7). Se utilizó clotrimazol como referencia.

Hongo	Concentración inhibidora mínima (µg/ml)					
	Clotrimazol	Péptido de la invención según la SEQ ID No. 1	Péptido de la invención según la SEQ ID No. 2	Péptido de la invención según la SEQ ID No. 4	Péptido de la técnica anterior según la SEQ ID No. 6	Péptido de la técnica anterior según la SEQ ID NO. 7
<i>Candida albicans</i>	3.1	0.4	3.1	0.4	13.1	12.75
<i>Ceratosystis paradoxa</i>	0.4	5	6.25	1	4.8	4.7
<i>Botrytis cinerea</i>	6.25	6.25	6.25	3.1	14.5	12.75
<i>Leptosphaeria maculans</i>	0.4	3.75	6.25	4.1	37.9	9.4
<i>Mycosphaerella pinodes</i>	3.1	1.9	4.5	2	13.12	10.68
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	25	10.25	19.3	1.5	27.2	23.5
<i>Verticillium dahliae</i>	1.56	1.6	3.1	1.55	14.5	12.7

Los valores de CIM obtenidos para los péptidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 6 y SEQ ID NO. 7 frente a especies bacterianas se muestran en la Tabla 3. Todos los péptidos de la invención inhibieron el crecimiento bacteriano, y los péptidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 1, No. 2 y No. 4 fueron más eficientes que los péptidos de la técnica anterior en todas las especies probadas.

Tabla 3. Resultados de los ensayos de CIM con especies bacterianas como organismos de prueba y los péptidos de la invención (SEQ ID NO. 1, No. 2 y No. 4) y péptidos de la técnica anterior (SEQ ID NO. 6 y No. 7). Se utilizaron gentamicina y estreptomicina como referencias.

Bacteria	Concentración inhibidora mínima (µg/ml)						
	Gentamicina	Estreptomicina	SEQ ID No. 1	SEQ ID No. 2	SEQ ID No. 4	SEQ ID No. 6	SEQ ID No. 7
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.8	>125	3.1	7.1	1.8	13	13.6
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.4	7.8	3.1	7.1	1.8	3.25	13.6
<i>Pantoea agglomerans</i>	1.56	NA	1.1	1.9	1	7.9	9.45
<i>E. coli</i>	1	NA	3.1	6.2	NA	NA	NA

Ejemplo 5: Estabilidad de péptidos en fluidos corporales

Ensayo de sangre de oveja

Se llevaron a cabo experimentos *in vitro* para probar el comportamiento de los péptidos como se divulga en este documento en sangre, frente a *C. albicans*. Se utilizaron aislados de *C. albicans* de sangre humana (DSMZ 6569). El péptido de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 se ajustó a una concentración de 1 mg/ml y se mezcló con sangre de oveja en partes iguales. Esta mezcla se incubó durante la noche a 30 °C. Para eliminar las partes sólidas de la sangre, la mezcla se centrifugó y el sobrenadante de plasma obtenido se utilizó para las CIMs.

Ensayo de orina

Se llevaron a cabo experimentos *in vitro* para probar el comportamiento de los péptidos como se divulga en este documento en orina, frente a *C. albicans*. El péptido de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 se ajustó a una concentración de 1 mg/ml y se mezcló con orina sintética u orina humana en partes iguales. Estas mezclas se incubaron durante la noche a 30 °C. Para eliminar las partes

sólidas de la orina, la mezcla se centrifugó y el sobrenadante obtenido se utilizó para las CIMs.

Ensayo de leche de vaca

Se llevaron a cabo experimentos *in vitro* para probar el comportamiento de los péptidos como se divulga en este documento en leche de vaca con un 3.5 % de grasa, frente a *Listeria monocytogenes*. El péptido de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 se ajustó a una concentración de 1 mg/ml y se mezcló con leche de vaca en partes iguales. Esta mezcla se incubó durante la noche a 37 °C. Para eliminar las partes sólidas de la leche, la mezcla se centrifugó y el sobrenadante obtenido se utilizó para las CIMs.

Resultados: Se observó una disminución en la capacidad para inhibir el crecimiento de células de *C. albicans* cuando los péptidos se mezclaron con sangre de oveja. Sin embargo, los péptidos como se describe en este documento todavía estaban activos a 25 µg/ml en sangre de oveja (Tabla 4).

La capacidad para inhibir el crecimiento de células de *C. albicans* se vio afectada en menor medida por la mezcla del péptido con orina. En orina sintética, la actividad antimicrobiana eficiente se logró a 2 µg/ml de péptido y en orina humana a 5 µg/ml de péptido, en comparación con 0.4 µg/ml en condiciones de control (Tabla 4).

De manera similar, cuando los péptidos se mezclaron con leche, la concentración que inhibió el crecimiento de *L. monocytogenes* aumentó a 80 µg/ml, desde 3.2 µg/ml en condiciones sin leche (Tabla 4).

Los péptidos no perdieron completamente su capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias y levaduras en fluidos corporales, lo que sugiere que son adecuados para uso terapéutico.

Tabla 4. Resultados de los ensayos de CIM cuando el péptido de la invención (SEQ ID NO. 1) se mezcló con sangre de oveja, orina o leche de vaca. El control es el péptido sin fluido corporal, y la caspofungina y la tetraciclina se utilizan como referencias.

Organismo analizado	Condición	Concentración inhibidora mínima (µg/ml)
<i>Candida albicans</i>	Control	0.4
	Caspofungina	0.5
	Sangre de oveja	25
	Orina sintética	2
	Orina humana	5
<i>Listeria monocytogenes</i>	Control	3.1
	Tetraciclina	1.6
	Leche de vaca	80

Ejemplo 6: Ensayo de CIM en suspensión de suelo

Se llevaron a cabo experimentos *in vitro* para probar el comportamiento de los péptidos divulgados en este documento en suspensión de suelo, frente a *Erwinia amylovora*. La suspensión de suelo se generó mezclando 5 g de suelo en 20 ml de agua. Esta mezcla se incubó durante 1 hora en un agitador superior. Las partes sólidas se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante obtenido, denominado suspensión de suelo, se utilizó para el ensayo de CIM. Se mezclaron volúmenes iguales del péptido de acuerdo con la SEQ ID NO.1 (8 mg/ml) y suspensión de suelo y se incubaron durante la noche a 28 °C. La mezcla se utilizó para la CIM frente a *Erwinia amylovora*.

Resultados: Los péptidos descritos en este documento inhibieron el crecimiento de bacterias a 25 µg/ml en suspensión de suelo en comparación con 15 µg/ml en condiciones de control. Como no pierden completamente su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano en el suelo, los péptidos descritos en este documento son adecuados para uso agrícola.

Ejemplo 7: Aplicabilidad de los péptidos en superficies técnicas.

Se realizaron experimentos para probar el comportamiento de los péptidos divulgados en este documento en superficies técnicas frente a *Candida albicans*.

Se probó la formación de biopelícula de este organismo en superficies de cerámica (tamaño de poro de 1100 μm), acero inoxidable y silicio en un reactor de biopelícula. Se introdujeron en cada reactor cuatro tallos de discos, cada uno con discos de las 3 superficies, y se atornillaron firmemente. Los sistemas se esterilizaron en autoclave con todos los discos montados. Se llenaron 297 ml de medio SU en cada uno de los reactores y se añadieron 3 ml de un precultivo de *C. albicans* (aislado vaginal) en SU ($\text{DO}_{600} = 0.1$). Los reactores de biopelícula se incubaron a 30 °C y agitación a 200 rpm. En total, se utilizaron tres sistemas de biorreactores: un control, un tratamiento con extracto de cacao enriquecido con péptidos a partir del día 0 y un tratamiento con dicho extracto a partir del día 3. El extracto de cacao tuvo una concentración final de proteína total de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Los días 1, 3, 5 y 7, se retiró un tallo de discos de cada reactor. Los discos se desenroscaron y se sumergieron en 2 mL de SU. Estos líquidos se diluyeron en medio SU y se preparó una serie de diluciones de 10^{-1} - 10^{-5} . Las diluciones se sembraron en un medio sólido YPD y se incubaron a 30 °C durante 48 horas. Se contaron las colonias formadas en las placas y se calcularon las unidades formadoras de colonias (UFC)/ cm^2 de disco.

Resultados: No se observó crecimiento de *C. albicans* en ninguna de las superficies analizadas. Estos resultados sugieren que los péptidos divulgados en este documento son altamente estables y eficaces para su uso como desinfectantes o descontaminantes de superficies.

Experimento 8: Ensayo *in vitro* en células de levadura y de mamíferos

Para investigar si el efecto inhibitor del crecimiento de los péptidos es de naturaleza microestática o microbicida, se realizó un ensayo de liberación de

lactato deshidrogenasa (LDH) en *C. albicans* (aislado vaginal) como organismo modelo de elección y en células de queratinocitos humanos (HaCaT). La LDH es una enzima presente en muchos tipos de células. El daño a la membrana celular da como resultado la liberación de LDH en el medio de cultivo celular, que posteriormente se puede detectar y cuantificar mediante una reacción enzimática de color acoplada.

Las células HaCaT se cultivaron en medio DMEM suplementado con 4.5 g/L de glucosa, 2 mM de L-glutamina y 10 % de suero bovino fetal (FCS) a 37 °C y 8 % de CO₂. Las células se cultivaron en matraces de cultivo celular de 75 cm² con aproximadamente 20 ml de DMEM. Los medios se cambiaron dos veces por semana. Las células se pasaron en una proporción de 1:10 una vez que se alcanzó una confluencia de más del 90 %. La solución de paso consistió en una mezcla 1:1 de EDTA (stock al 0.05 %) y tripsina (stock al 0.1 %) en PBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺.

El ensayo de citotoxicidad de LDH CyQUANT™ (Invitrogen, No. C20300 y C20301) se realizó de acuerdo con el protocolo proporcionado por la compañía. Se determinó que la densidad de siembra óptima era de 10,000 células por 100 µL para células HaCaT o *C. albicans* de acuerdo con un protocolo estándar como se describe en el kit. Las células se expusieron al péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 2 durante 1 hora o durante la noche con concentraciones que oscilaban entre 1.95 µg/ml y 250 µg/ml y se detectó la liberación de LDH. La siguiente fórmula proporcionada por la compañía se utilizó para calcular la citotoxicidad: $\% \text{ de Citotoxicidad} = \left[\frac{(\text{Péptido} - \text{actividad LDH tratada}) - (\text{Actividad LDH espontánea})}{(\text{Actividad LDH máxima}) - (\text{Actividad LDH espontánea})} \right] * 100$, con la actividad LDH espontánea medida en la muestra sin tratar (con agua añadida) y la actividad LDH máxima medida en la muestra con el agente lisante proporcionado por el proveedor del kit.

Resultados: La muerte celular detectada del organismo objetivo *C. albicans* fue lineal de 0 a 250 µg/ml hasta una citotoxicidad del 92 % a la concentración de proteína más alta analizada (**Figura 4**). Por el contrario, se indujo poca o

ninguna liberación de LDH tras el tratamiento de células HaCaT con el péptido. La citotoxicidad celular del péptido para las células HaCaT fue de entre 0 % y 1 % hasta una concentración de péptido de 125 µg/ml y alcanzó el 6 % a una concentración de péptido de 250 µg/ml (**Figura 4**).

Se supone que la presente invención no está restringida a ninguna forma de realización descrita anteriormente y que se pueden añadir algunas modificaciones al ejemplo de fabricación presentado sin reevaluar las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, las modalidades preferidas de la presente invención se refieren a la variedad CCN-51 de *Theobroma cacao*, pero se puede utilizar cualquier variedad de cacao que produzca vicilina en una cantidad suficiente para su posterior procesamiento sin apartarse del alcance de la presente invención.

Ejemplo 9: Extracción de péptidos de granos de cacao no fermentados

Los péptidos que se describen en el presente documento se aislaron de granos de cacao no fermentados, pero bien secos. Los granos de cacao se trituraron mecánicamente con un triturador de granos para obtener una mezcla de pepitas y cáscaras. Se retiraron las cáscaras y las pepitas descascaradas se transfirieron a un expulsor. De este modo, se obtuvo una mezcla de manteca y suspensión, que se separó mediante centrifugación a 16,600 x g durante 10 minutos a 40 °C. La fracción de manteca recogida en la parte superior se descartó, mientras que el pellet de suspensión sólida se pulverizó y se almacenó a 4 °C hasta su uso posterior.

Los péptidos se extrajeron de 3 maneras.

Método 1: Extracción con PEB (tampón de extracción de proteínas)

El pellet de suspensión pulverizado se precalentó en un baño de agua a 50 °C durante 10 min y luego se disolvió en un tampón de extracción de proteínas (100 mM Tris, 1 % SDS y 1 % DTT, pH 8.1), que se agregó en una proporción

de pellet a tampón de 1:4 p/v. El pellet de suspensión disuelto se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente bajo agitación, seguido de una centrifugación a 16,600 x g durante 20 minutos. La fase líquida que contenía el péptido se recolectó y se purificó mediante diálisis o ultrafiltración (Centricon Plus-70, Merck Chemicals GmbH, una filial de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) para eliminar los componentes del PEB.

Método 2: Extracción de PEB seguida de precipitación ácida

El pellet de suspensión pulverizado se trató como se describe en el método 1, es decir, el pellet de suspensión pulverizado se precalentó en un baño de agua a 50 °C durante 10 minutos y luego se disolvió en PEB. El pellet de suspensión disuelto se incubó luego durante 1 hora a temperatura ambiente bajo agitación, seguido de centrifugación a 16,600 x g durante 20 minutos. La fase líquida que contenía el péptido se recolectó y se sometió a precipitación ácida para enriquecer el péptido de la invención en la mezcla de proteínas en función de su punto isoeléctrico. De este modo, el pH de los extractos de proteínas se redujo a 6.0 con ácido cítrico 1 M, lo que resultó en un cambio de color de gris oscuro a rojo. Esta mezcla se sometió luego a centrifugación a 16,600 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el pellet de proteína se volvió a suspender en el PEB utilizando sonicación para disolver adecuadamente el pellet. Posteriormente se eliminaron las sustancias nocivas mediante ultrafiltración con un MWCO de 5 kDa (Centricon Plus-70, Merck Chemicals GmbH, una filial de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Método 3: Extracción por calor

El pellet de suspensión pulverizada se calentó a 60 °C en agua corriente en una proporción de pellet a agua de 1:4 p/v durante 10 minutos con agitación. La mezcla obtenida se centrifugó a 16,600 x g durante 20 minutos a 10 °C.

El sobrenadante que contenía péptidos, obtenido después de la extracción con cualquiera de los métodos 1 a 3, se recolectó y cuantificó o analizó mediante

SDS-PAGE y CIMS. El extracto de proteína se liofilizó o se centrifugó al vacío para aumentar la concentración antes de su aplicación.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO. 1 (péptido de acuerdo con una modalidad de la invención)

YGRKQYERDPRQQYEQCQRRCESEATEEREQEQCCEQRCEREYKEQQRQQ
EEELQRQYQQCQGRCQEQQQGQREQQQCQRKCWEQYKEQERGEHENYH
NHKKN

SEQ ID NO. 2 (péptido de acuerdo con una modalidad de la invención)

YGRKQYERDPRQQYEQCQRRCESEATEEREQEQCCEQRCEREYKEQQRQQ
EEELQRQYQQCQGRCQEQQQGQREQQQCQRKCWEQYKEQERGEHENYH
NHK

SEQ ID NO. 3 (péptido señal de acuerdo con una modalidad de la invención)

MVISKSPFIVLIFSLLLSFALLCSGVSA

SEQ ID NO. 4 (péptido de acuerdo con una modalidad de la invención)

MVISKSPFIVLIFSLLLSFALLCSGVSA YGRKQYERDPRQQYEQCQRRCESEAT
EEREQEQCCEQRCEREYKEQQRQQEEELQRQYQQCQGRCQEQQQGQREQ
QQCQRKCWEQYKEQERGEHENYHNHKN

SEQ ID NO. 5 (péptido de acuerdo con una modalidad de la invención)

MVISKSPFIVLIFSLLLSFALLCSGVSA YGRKQYERDPRQQYEQCQRRCESEAT
EEREQEQCCEQRCEREYKEQQRQQEEELQRQYQQCQGRCQEQQQGQREQ
QQCQRKCWEQYKEQERGEHENYHNHKN

SEQ ID NO. 6 (péptido de la técnica anterior)

YERDPRQQYEQCQRRCESEATEEREQEQCCEQRCEREYKEQQRQQEEE

SEQ ID NO. 7 (péptido de la técnica anterior)

LQRQYQQCQGRCQEQQQGQREQQQCQRKCWEQYKEQERGEHENYHNHKN
KNRSEEEEGQQR

SEQ ID NO. 8 (Cebador directo Forward_BamH1)

CGCGGATCCTATGGCAGAAAACAATAT

SEQ ID NO. 9 (Cenador directo Reverse_Kpn1)

CGCGGTACCTTTGTGATTATGGTAATT

SEQ ID NO. 10 (etiqueta HQ)

HQQHQ

SEQ ID NO. 11 (etiqueta HN)

HNHNHNHNHNHN

SEQ ID NO. 12 (etiqueta HAT)

KDHLIHNVHKEEHAHAHNK

SEQ ID NO. 13 (etiqueta ALFA)

SRLEEELRRRLTE

SEQ ID NO. 14 (etiqueta Avi)

GLNDIFEAQKIEWHE

SEQ ID NO. 15 (etiqueta C)

EPEA

SEQ ID NO. 16 (etiqueta Calmodulin)

KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL

SEQ ID NO. 17 (etiqueta E)

GAPVPYPDPLEPR

SEQ ID NO. 18 (etiqueta FLAG)

DYKDDDDK

SEQ ID NO. 19 (etiqueta HA)

YPYDVPDYA

SEQ ID NO. 20 (etiqueta Myc)

EQKLISEEDL

SEQ ID NO. 21 (etiqueta NE)

TKENPRSNQEESYDDNES

SEQ ID NO. 22 (etiqueta Rho1D4)

TETSQVAPA

SEQ ID NO. 23 (etiqueta S)

KETAAAKFERQHMDS

SEQ ID NO. 24 (etiqueta SBP)

DEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP

SEQ ID NO. 25 (etiqueta Strep)

WSHPQFEK