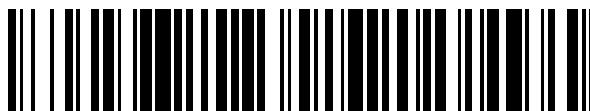


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 242**

51 Int. Cl.:
C07K 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06720369 .5**
- 96 Fecha de presentación: **07.02.2006**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1853620**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.11.2007**

54 Título: **Hexapéptidos antimicrobianos**

30 Prioridad:
09.02.2005 US 651270 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.04.2012

73 Titular/es:
**Helix Biomedix, Inc.
22118 20th Avenue SE Suite 204
Bothell, WA 98021, US**

72 Inventor/es:
**FALLA, Timothy, J.;
ZHANG, Lijuan y
HARRIS, Scott, M.**

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 378 242 T3

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

DESCRIPCIÓN

Hexapéptidos antimicrobianos

5 **Reivindicación de prioridad**

La presente solicitud reivindica beneficio de prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos 60/651.270 presentada el 9 de febrero de 2005 e incorpora por referencia en este documento los contenidos completos de la misma.

10

Campo de la invención

La invención se refiere a composiciones y métodos que comprenden hexapéptidos antimicrobianos que muestran propiedades biológicas deseables. Más específicamente, los hexapéptidos muestran actividades antifúngicas deseadas y, opcionalmente, antibacterianas. En particular, se describen hexapéptidos que tienen restos cargados (hidrófilos) en las posiciones una y tres; restos hidrófobos en las posiciones dos, cuatro y seis; y una naftilalanina, un resto alifático (tal como prolina) o uno aromático (tal como fenilalanina) en la posición cinco; representados generalmente por la fórmula XBXBBOB. La actividad puede potenciarse adicionalmente, particularmente en suero, mediante la adición de un resto lipídico al extremo N terminal de ciertos de estos péptidos. Adicionalmente, la amidación en el extremo C terminal parece aumentar la actividad.

15

20

Descripción de técnica relacionada

Los investigadores han desarrollado tratamientos y agentes antimicrobianos durante décadas. Recientemente, ha surgido la necesidad de nuevos agentes antimicrobianos para tratar un número creciente de infecciones bacterianas, virales y fúngicas resistentes a fármacos.

25

Se han presentado diversos péptidos bioactivos tanto en la bibliografía científica como en patentes expedidas. Los péptidos se han aislado históricamente de fuentes naturales y recientemente han sido el objeto de estudios de relación estructura-función. Adicionalmente, los péptidos naturales han actuado como puntos de partida para el diseño de análogos peptídicos sintéticos.

30

Se publicó una revisión de antibióticos peptídicos por R. E. W. Hancock en 1997 (Lancet 349: 418-422). Se analizaron la estructura, función y aplicaciones clínicas de diversas clases de péptidos. Una revisión adicional de antibióticos peptídicos catiónicos se publicó en 1998 (Hancock, R. E. W. y Lehrer, R. Trends Biotechnol. 16: 82-88). Los péptidos son típicamente moléculas antipáticas catiónicas de 12 a 45 aminoácidos de longitud. Los péptidos permeabilizan membranas celulares lo que conduce al control de agentes microbianos. El potencial clínico de péptidos catiónicos de defensa del huésped se analizó por R. E. W. Hancock en 1999 (Drugs 57(4): 469-473; Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43(6): 1317-1323). Se analizan las propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, anticancerosas y de curación de heridas de la clase de péptidos.

35

40

También se han publicado revisiones de las características estructurales de péptidos antimicrobianos helicoidales y sus supuestos mecanismos de acción (véase, por ejemplo, Dathe, M. y Wieprecht, T. Biochimica et Biophysica Acta 1462: 71-87 (1999); Epanand, R. M. y Vogel H. J. Biochimica et Biophysica Acta 1462: 11 -28 (1999)). Los parámetros estructurales que se cree que son capaces de modular la actividad y selectividad incluyen helicidad, momento hidrófobo, hidrofobicidad, ángulo subtendido por las superficies de hélice hidrófoba/hidrófila, y carga.

45

Se ha indicado una amplia serie de péptidos alfa helicoidales de origen natural. Se describen en el presente documento varios representantes de las muchas referencias en el campo. Las cecropinas son una familia de péptidos alfa helicoidales aislados de insectos. Las cecropinas se conocen por sus propiedades antibacterianas, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 4.355.104 y 4.520.016. Se descubrió en general que las cecropinas tenían actividad contra ciertas bacterias gram negativas. Se descubrió que las cecropinas no tienen actividad contra células eucariotas (Andreu, *et al.*, Biochemistry 24: 163-188 (1985); Boman, *et al.*, Developmental and Comparative Immunol. 9: 551-558 (1985); Steiner *et al.*, Nature 292: 246-248 (1981)). Las cecropinas de *Drosophila* y *Hyalphora* se presentaron como con actividad contra diversas cepas de hongos (Ekengren, S. y Hultmark, D., Insect Biochem. and Molec. Biol. 29: 965-972 (1999)). Se ha notificado que la cecropina A del mosquito *Aedes aegypti* es diferente de la mayoría de cecropinas de insecto porque carece de triptófano y amidación C terminal (Lowenberger, C. *et al.*, J. Biol. Chem. 274 (29): 20092-20097 (1999)).

50

55

Las ranas del género *Rana* producen una amplia serie de péptidos antimicrobianos en su piel (Goraya, J. *et al.*, Eur. J. Biochem. 267: 894-900 (2000)). Se presentaron péptidos tan cortos como de 13 aminoácidos y se agruparon en familias estructurales. Las secuencias mostraron poca o ninguna identidad de secuencia con péptidos aislados de ranas de otros géneros, tales como los péptidos magainina y dermaseptina. La magainina es un péptido de 23 aminoácidos α -helicoidal aislado de la piel de la rana Africana *Xenopus laevis* (Zaslöff, M. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 5449-5453 (1987)).

60

65

La Patente de Estados Unidos N° 5.962.410 describe la inhibición de patógenos eucariotas y la estimulación de linfocitos y fibroblastos con péptidos líticos tales como cecropinas y sarcotoxinas. Diversos péptidos presentados incluyen Cecropina B, Cecropina SB-37, Cecropina A, Cecropina D, Shiva-1, Lepidopterano, Sarcotoxina 1A, Sarcotoxina 1B y Sarcotoxina 1C.

5 Se presentaron ratones transgénicos que producían el péptido lítico de clase cecropina Shiva-1 por Reed, W. A. *et al.*, Transgenic Res. 6: 337-347 (1997). La infección de los ratones transgénicos con una presentación de *Brucella abortus* dio como resultado una reducción del número de bacterias en relación con infección de ratones no transgénicos.

10 Se encuentran péptidos α -helicoidales asociados con catelina de 23 a 38 aminoácidos en las células sanguíneas de ovejas, seres humanos, vacas, cerdos, ratones y conejos (Zanetti, M. *et al.*, FEBS Lett. 374: 1-5 (1995)).

15 Las actividades antimicrobianas de buforina II, cecropina P1, indolicidina, magainina II, nisina y ranalexina se notificaron por Giacomette, A. *et al.* (Peptides 20: 1265-1273 (1999)). Los péptidos mostraron actividades variables contra bacterias y levadura.

20 Se han preparado y ensayado tanto *in vitro* como *in vivo* diversos péptidos sintéticos. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.861.478 describió péptidos líticos sintéticos de aproximadamente 20 a 40 aminoácidos que adoptan una conformación α -helicoidal. Los péptidos son eficaces en el tratamiento de infecciones microbianas, heridas y cáncer. Los péptidos descritos incluyen cecropina B, SB-37*, LSB-37, SB-37, Shiva 1 y 10-12, péptido señal de β -fibrina, Manitou 1 -2, Hecate 1 -3, Anubis 1 -5 y 8 y Vishnu 1-3 y 8.

25 Hecate se describió como un análogo peptídico sintético de melitina por Baghian, A. *et al.* (Peptides 18(2): 177-183 (1997)). Los péptidos difieren en su distribución de carga, pero no en su conformación α -helicoidal anfipática. Hecate inhibió virus del herpes simple (VHS-1) sin afectar de forma adversa al crecimiento celular y la síntesis proteica.

30 Los péptidos sintéticos D2A21, D4E1, D2A22, D5C, D5C1, D4E y D4B se describieron en Schwab, U. *et al.*, Antimicrob. Agents and Chemotherapy 43(6): 1435-1440 (1999). Se describieron actividades contra diversas cepas bacterianas.

35 Se prepararon péptidos híbridos compuestos de péptidos cecropina y melitina y se ensayaron por Juvvadi, P. *et al.* (J. Peptide Res. 53:244-251 (1999)). Se sintetizaron híbridos para investigar los efectos de secuencia, dirección de enlace amida (dipolo de hélice), carga, anfipatía e hidrofobicidad en la capacidad de formación de canales y en la actividad antibacteriana. Se ha sugerido que la secuencia y la dirección de enlace amida son requisitos estructurales importantes para la actividad de los híbridos.

40 Se describió una cecropina de insecto de 26 aminoácidos, híbrido de melitina de abeja, y análogos del mismo, en un estudio de resistencia salina (Friedrich, C. *et al.*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43(7): 1542-1548 (1999)). Se descubrió que un resto de triptófano en la segunda posición era crítico para la actividad. Se descubrió que cambios modestos en la secuencia conducían a cambios sustanciales en las propiedades de los péptidos.

45 Los efectos de restos de prolina en las propiedades antibacterianas de péptidos α -helicoidales se han publicado (Zhang, L. *et al.*, Biochem. 38: 8102-8111 (1999)). Se ha indicado que la adición de prolinas cambia las propiedades de inserción en membrana y el reemplazo de una prolina sencilla puede cambiar un péptido antimicrobiano a una toxina lítica.

50 Se preparó una serie de péptidos que tenían entre 18 y 30 aminoácidos para ensayar los efectos de cambios en secuencia y carga en propiedades antibacterianas (Scott, M. G., *et al.*, Infect. Immun. 67(4): 2005-2009 (1999)). No se descubrió correlación significativa entre longitud, carga o hidrofobicidad y la actividad antimicrobiana de los péptidos. Se descubrió una tendencia general de que los péptidos más cortos eran menos activos que los péptidos más largos, aunque se observó que este efecto probablemente dependería de la secuencia.

55 Se prepararon "modelinas", un grupo de péptidos sintéticos, y se ensayaron para comparar relaciones de secuencia y estructura (Bessalle, R. *et al.* J. Med. Chem. 36: 1203-1209 (1993)). Los péptidos de 16 y 17 aminoácidos que tenían caras opuestas hidrófobas e hidrófilas fueron altamente hemolíticos y antibacterianos. Los péptidos más pequeños tendían a tener actividades biológicas más bajas.

60 Se descubrió que un péptido híbrido de cecropina-melitina y un péptido de platija amidado protegían el salmón de infecciones por *Vibrio anguillarum in vivo* (Jia, X. *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 66(5): 1928-1932 (2000)). Se usaron bombas osmóticas para suministrar una dosis continua de uno de los péptidos al pez.

65 Se ha notificado que los péptidos anfipáticos son capaces de potenciar la curación de heridas y estimular el crecimiento de fibroblastos y queratinocitos *in vivo* (Patentes de Estados Unidos N° 6.001.805 y 5.561.107). Se ha notificado que se han preparado plantas transgénicas que expresan péptidos líticos como una proteína de fusión con

ubiquitina (Patente de Estados Unidos N° 6.084.156). Se ha notificado que se prepararon péptidos ricos en lisina metilada, que presentaban resistencia proteolítica mejorada (Patente de Estados Unidos N° 5.717.064).

5 El cesionario Helix BioMedix, Inc. es el propietario de varias patentes expedidas y publicaciones de patente adicionales que enseñan péptidos lógicos y procedimientos para su uso. La Patente de Estados Unidos N° 6.440.935 describe los usos estimulantes y proliferativos de péptidos que tienen de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 aminoácidos dispuestos al menos en parte en una conformación alfa-helicoidal. La Patente de Estados Unidos N° 6.303.568 describe procedimientos para tratar animales infectados con un hongo o bacterias gram negativas. El tratamiento implica la administración de un péptido tal como Cecropina C-37. La Patente de Estados Unidos N° 10 6.255.282 describe procedimientos para matar microbios que implican la administración de diversos péptidos. Los péptidos se definen por sus propiedades conformacionales y de secuencia. La Solicitud de Patente de Estados Unidos Publicada N° 20020025918 describe el uso de péptidos similares en plantas. La Solicitud de Patente de Estados Unidos Publicada N° 20030109452 y 20030083243 describen péptidos bioactivos "FLAK" y métodos para su uso.

15 Existen diversas patentes que describen composiciones cosméticas que contienen péptidos cortos. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.492.326 sugiere la preparación y uso de composiciones de cuidado de la piel que contienen pentapéptidos y principios activos de cuidado de la piel.

20 Strom *et al.* 2003 (Journal of Medicinal Chemistry 46: 1567-1570) describen péptidos antibacterianos cortos centrados principalmente en péptidos muy cortos (dímeros y trímeros) que contienen modificaciones químicas. También se describen ciertos hexapéptidos. Sin embargo, no existen ensayos o análisis de actividad antimicrobiana o específicamente ninguna antifúngica de estos hexapéptidos.

25 Lopez Garcia *et al.* (Int. Journal of Food Microbiol. 89: 163-170 (2003) y Applied and Environ. Microbiol. 68: 2453-2460, (2002)) describen la exploración de una biblioteca combinatoria de péptidos sintéticos que da como resultado la identificación de hexapéptidos antifúngicos con actividad contra los patógenos de cultivo de hongos fitopatógenos. Estos péptidos antifúngicos contenían el motivo de RKT o RKK como los tres primeros restos. No se describen ensayos o análisis de actividad antimicrobiana contra patógenos clínicamente significativos, incluyendo patógenos 30 fúngicos. De forma similar, no hay análisis de la estabilidad de los hexapéptidos o propiedades tóxicas.

Los siguientes documentos describen diversos oligopéptidos antimicrobianos que contienen restos aromáticos y cambiados: documento WO01/98364; documento WO95/19370; Applied and environmental microbiology. Mayo 35 2002, vol 68, ho.5, p.2453-2460; Journal of Peptide Science, vol. 8, ho.4, Oct 2004, p. 159-169; y el Journal of Peptide Research: Official Journal of the American Peptide Society, vol. 64, ho.4, Oct 2004, p.159-169.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar péptidos que tengan un amplio intervalo de actividad antimicrobiana potente contra varios microorganismos, incluyendo bacterias grama negativas, protozoos, virus y similares, y especialmente contra patógenos eucariotas tales como hongos. Puesto que los patógenos fúngicos son eucariotas y 40 por lo tanto relativamente más similares al hospedador humano que a bacterias procariotas, tradicionalmente ha sido más difícil desarrollar terapias eficaces contra patógenos eucariotas que carecen de toxicidad. Este también es el caso con el desarrollo de péptidos antifúngicos.

Además, los péptidos antifúngicos han tendido a ser relativamente largos (>15 aminoácidos) y por lo tanto estar asociados con toxicidad y también muestran alta susceptibilidad a proteasas, baja penetración tisular y alto coste. Adicionalmente, los péptidos antimicrobianos aunque sean buenos candidatos farmacológicos para aplicaciones tópicas, tradicionalmente no son compatibles con la circulación sistémica que acompañaría a la administración sistémica.

50 Sumario de la invención

La presente invención proporciona hexapéptidos antimicrobianos que comprenden restos hidrófilos cargados (X), en las posiciones una y tres; restos hidrófobos (B) en las posiciones dos, cuatro y seis; y una naftilalanina, un resto alifático o uno aromático (O) en la posición cinco; en los que la estructura hexapeptídica se representa por la fórmula 55 $XBXBOB$; y seleccionándose el hexapéptido del grupo que consiste en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 56, SEC ID N°: 62, SEC ID N°: 63, SEC ID N°: 70, SEC ID N°: 72, SEC ID N°: 77, SEC ID N°: 78, SEC ID N°: 79, SEC ID N°: 80, SEC ID N°: 81, SEC ID N°: 83 y SEC ID N°: 85.

En ciertas realizaciones, el hexapéptido comprenderá los siguientes aminoácidos, en los que X se selecciona del grupo que consiste en Arginina (R) y Lisina (K); B se selecciona del grupo que consiste en Fenilalanina (F) y Triptófano (W); y O se selecciona del grupo que consiste en naftilalanina (Nal), Prolina (P) y Fenilalanina (F).

Son hexapéptidos similares a los de la presente invención KFKWPW-NH₂ (SEC ID N°: 1), KWRWPW-NH₂ (SEC ID N°: 2), KWKWFW-NH₂ (SEC ID N°: 3), RWRWPW-NH₂ (SEC ID N°: 4), KFKWFW-NH₂ (SEC ID N°: 6), RFKWFW-NH₂ (SEC ID N°: 7), OCTKFKWPW-NH₂ (SEC ID N°: 55), OCT-KWKWFW-NH₂ (SEC ID N°: 56), KWK-WUW-NH₂ (SEC ID N°: 62), y KWKWZW-NH₂ (SEC ID N°: 63).

En ciertas realizaciones el hexapéptido es SEC ID N°: 1.

En otras realizaciones, el hexapéptido está modificado. Estas modificaciones pueden incluir lipidación o amidación.

- 5 En otras realizaciones, el hexapéptido está lipidado y el lípido se selecciona del grupo que consiste en ácido heptanoico, ácido nonanoico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido pentadecanoico, ácido undecanoico, ácido tridecanoico o ácido octanoico.

- 10 En otras realizaciones más, el hexapéptido se selecciona del grupo que consiste en, Non- KFKWPW-NH₂ (SEC ID N°: 70), Lau- KFKWPWNH₂ (SEC ID N°: 72), Myr-KFKWPW-NH₂ (SEC ID N°: 77), Pen- KFKWPW-NH₂ (SEC ID N°: 78), Und- KFKWPW-NH₂ (SEC ID N°: 79), Tri-KFKWPW-NH₂ (SEC ID N°: 80), Oct-kfkwpw-NH₂ (SEC ID N°: 81), Lau-kfkwpw-NH₂ (SEC ID N°: 83), y Deca-KFKWPW-NH₂ (SEC ID N°: 85).

- 15 En otras realizaciones más el hexapéptido es soluble en una solución acuosa.

- 20 En ciertas realizaciones el hexapéptido está presente en una composición junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones el hexapéptido está presente en las composiciones en una concentración terapéuticamente eficaz. Esta concentración terapéuticamente eficaz puede estar en un intervalo de aproximadamente 0,0002 % a aproximadamente 90 %. En otras realizaciones, la concentración terapéuticamente eficaz está en el intervalo de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 10 %.

- 25 En ciertas realizaciones la composición incluye adicionalmente un sistema de suministro subcutáneo. En otras realizaciones el sistema de suministro puede ser un sistema de suministro tópico. El sistema de suministro tópico puede estar en cualquier forma que se selecciona del grupo que consiste en una preparación cosmética, polvo, emulsión, loción, pulverización, pomada, aerosol, crema y espuma.

En otra realización, se usa una cantidad terapéuticamente eficaz del hexapéptido para tratar o prevenir una infección fúngica o bacteriana en un mamífero.

- 30 La invención proporciona composiciones útiles para tratar tejido de mamíferos, las composiciones generalmente comprenderán un hexapéptido que comprende restos cargados en las posiciones uno y tres, restos hidrófobos en las posiciones dos, cuatro y seis; y una naftilalanina, un resto alifático o uno aromático en la posición cinco; estando representada la estructura hexapeptídica por la fórmula XBXBOB .

- 35 En otra realización más, la invención proporciona la composición útil para tratar infecciones microbianas, estando comprendida dicha composición por un hexapéptido seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 56, SEC ID N°: 62, SEC ID N°: 63, SEC ID N°: 70, SEC ID N°: 77, SEC ID N°: 78, SEC ID N°: 79, SEC ID N°: 80, SEC ID N°: 81, SEC ID N°: 83, y SEQ ID 85. Esta composición puede incluir adicionalmente un sistema de suministro farmacéutico.

- 40 Los hexapéptidos de la presente invención pueden usarse en el tratamiento o prevención de infecciones microbianas en mamíferos, estando comprendido el método por administrar una concentración terapéuticamente eficaz de al menos uno de los hexapéptidos de la presente invención. Los hexapéptidos que pueden usarse en tales métodos se seleccionan del grupo que consiste en KFKWPW-NH₂ (SEC ID N°: 1), ID, OCTKFKWPW-NH₂ (SEC ID N°: 55), OCT-KWKWFW-NH₂ (SEC ID N°: 56), KWK-WUW-NH₂ (SEC ID N°: 62), KWKWZW- NH₂ (SEC ID N°: 63), Non-KFKWPW-NH₂ (SEC ID N°: 70), Lau- KFKWPW-NH₂ (SEC ID N°: 72), MyrKFKWPW-NH₂ (SEC ID N°: 77), Pen-KFKWPW-NH₂ (SEC ID N°: 78), Und- KFKWPWNH₂ (SEC ID N°: 79), Tri-KFKWPW-NH₂ (SEC ID N°: 80), Oct-kfkwpw-NH₂ (SEC ID N°: 81), Lau-kfkwpw-NH₂ (SEC ID N°: 83), y DECA-KFKWPW-NH₂ (SEC ID N°: 85).

- 50 Estos métodos son útiles cuando la infección microbiana es una infección fúngica. Los métodos también pueden ser útiles cuando la infección microbiana es una infección mixta fúngica bacteriana. Los métodos también pueden ser particularmente útiles cuando la infección fúngica está causada por un hongo seleccionado del grupo que consiste en *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*, y *Trichoplyton inentagrophytes*. Los métodos también pueden ser útiles cuando la infección bacteriana está causada por una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *P. acuroginosa*, *E. coil*, y *S. aureus*.

- 60 En otra realización más, la presente invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de una célula fúngica que comprende poner en contacto dicha célula fúngica con al menos uno de los hexapéptidos de la presente invención de modo que se inhiba el crecimiento de la célula fúngica. En ciertas realizaciones, la célula fúngica es un patógeno de plantas seleccionado del grupo que consiste en *Mycosphaerella brassicicola*, *Pyrenopezizci brassicae*, *Peronospora destructoi*; y *Botrytis squamosa*.

- 65 La presente invención se refiere a un método para prevenir infecciones microbianas en mamíferos, comprendiendo dicho método administrar una concentración terapéuticamente eficaz de un hexapéptido seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 56, SEC ID N°: 62, SEC ID N°: 63, SEC ID N°: 70, SEC ID N°: 72, SEC ID N°: 77, SEC ID N°: 78, SEC ID N°: 79, SEC ID N°: 80, SEC ID N°: 81, SEC ID N°: 83, y SEC ID N°: 85.

En otra realización más, la presente invención proporciona la composición farmacéutica que comprende un hexapéptido seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 56, SEC ID N°: 62, SEC ID N°: 63, SEC ID N°: 70, SEC ID N°: 72, SEC ID N°: 77, SEC ID N°: 78, SEC ID N°: 79, SEC ID N°: 80, SEC ID N°: 81, SEC ID N°: 83, y SEC ID N°: 85.

Descripción de las figuras

Las siguientes figuras forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a una o más de estas figuras en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en este documento.

La Figura 1 muestra una representación de dicroísmo particular de SEC ID N°: 1 (P0666) que demuestra un desplazamiento de la estructura tras la interacción del péptido con un ambiente lipídico proporcionado en este caso por liposomas.

La Figura 2 muestra una curva de muerte realizada en estimulante vaginal que demuestra la muerte de bacterias (*S. aureus*) y levadura (*C. albicans*) en este ambiente por el péptido SEC ID N°: 55 (P1032).

La Figura 3 muestra una curva de muerte realizada en suero 80 % que demuestra la capacidad de SEC ID N°: 55 (P1032) para matar *S. aureus* en este ambiente.

Las Figuras 4A y 4B muestran representaciones gráficas de las estructuras naftilalanina-1 y naftilalanina-2, que demuestran su similitud y su naturaleza aromática.

La Figura 5 muestra una curva de muerte realizada en suero 10 % que demuestra la capacidad aumentada de un péptido lipidado SEC ID N°: 55 (P1032) para matar bacterias (*S. aureus*) frente a su precursor no lipidado SEC ID N°: 1 (P0666) en ese ambiente.

La Figura 6 muestra una curva de muestra realizada en suero 10 % que demuestra la actividad de SEC ID N°: 55 (P1032) en comparación con SEC ID N°: 56 (P1033) y P50 (un 17-mer activo).

La Figura 7 muestra un ensayo de unión de LTA que demuestra que SEC ID N°: 72 (P 1148) se une a LTA en el mismo grado que P50 (un 17-mer activo).

La Figura 8 muestra una curva de muerte realizada en suero 10 % que demuestra la actividad de SEC ID N°: 55 (P1032) en comparación con P64 (un péptido antimicrobiano catiónico tradicional).

La Figura 9 representa la estructura de SEC ID N°: 1 (P0666) como se determina por ET-NMR representándose la carga en negro y la hidrofobicidad en blanco.

La Figura 10 muestra una curva de muerte realizada en ambiente de suero 80 % que demuestra la actividad de SEC ID N°: 72 (P1148), SEC ID N°: 83 (P1343), SEC ID N°: 79 (P1275), y SEC ID N°: 80 (P1276).

La Figura 11 muestra una curva de muerte realizada en un lípido 1 mg/ml y ambiente de suero 10 % que demuestra la actividad de SEC ID N°: 55 (P1032) en comparación con P64 (un péptido antimicrobiano catiónico tradicional).

Descripción de las listas de secuencias

Las siguientes listas de secuencias de aminoácidos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a una o más de estas secuencias en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en este documento.

TABLA 1

SEC ID N°:	N° P	Secuencia de aminoácidos
1	P0666	KFKWPW-NH ₂
2	P0665	KWRWPW-NH ₂
3	P0736	KWKFW-NH ₂
4	P0735	RWRWPW-NH ₂
5	P0633	RWRWRW-NH ₂

ES 2 378 242 T3

6	P0734	KFKWFW-NH ₂
7	P0737	RFKWFW-NH ₂
8	P0634	RRRWWW-NH ₂
9	P0635	KFKFKF-NH ₂
10	P0636	KYKYKY-NH ₂
11	P0637	FKFKFK-NH ₂
12	P0661	FKFKPV-NH ₂
13	P0662	VKVKPV-NH ₂
14	P0663	FALKKL-NH ₂
15	P0664	RKTWPW-NH ₂
16	P0667	FKLAPW-NH ₂
17	P0668	KWKKPV-NH ₂
18	P0669	FRHFRW-NH ₂
19	P0670	VAKLAK-NH ₂
20	P0671	FAKLAK-NH ₂
21	P0672	KFKSFK-NH ₂
22	P0673	KWKKLA-NH ₂
23	P0699	KWKFKF-NH ₂
24	P0700	KWKVFK-NH ₂
25	P0701	VAKKWK-NH ₂
26	P0671	FAKLAK-NH ₂
27	P0712	KLAKLL-NH ₂
28	P0713	LAKLAK-NH ₂
29	P0714	KPWKFK-NH ₂
30	P0715	KPVWPW-NH ₂
31	P0716	IKPVKFK-NH ₂
32	P0717	KFVWPW-NH ₂
33	P0718	LLKWPW-NH ₂
34	P0719	FPWKFK-NH ₂
35	P0720	KPVWPF-NH ₂
36	P0721	KFFWPF-NH ₂
37	P0738	KAKFPF-NH ₂
38	P0739	KFKPFW-NH ₂
39	P1030	KUKWPW-NH ₂
40	P1013	KFKLPW-NH ₂
41	P1014	KFKWPW-COOH
42	P1016	KWKWPW-COOH
43	P1017	KWKWFW-COOH
44	P1018	KFKWFW-COOH

ES 2 378 242 T3

45	P1020	FAKWPW-COOH
46	P1022	VAKWPW-COOH
47	P1023	KWKWPW-NH ₂
48	P1024	FAKWPW-NH ₂
49	P1025	VAKWPW-NH ₂
50	P1026	KWKFPF-NH ₂
51	P1027	KWKWGW-NH ₂
52	P1028	KLKWPW-NH ₂
53	P1029	KWKLAL-NH ₂
54	P1031	OCT-FALLKL-NH ₂
55	P1032	OCT-KFKWPW-NH ₂
56	P1033	OCT-KWKWFW-NH ₂
57	P1034	OCT-KFKWFW-NH ₂
58	P1035	JALLKL-NH ₂
59	P1036	KJKWPW-NH ₂
60	P1037	KWKWJW-NH ₂
61	P1083	KJKWJW-NH ₂
62	P1085	KWKWUW-NH ₂
63	P1087	KWKWZW-NH ₂
64	P1007	KWKWLPW-NH ₂
65	P1008	KWKWPPW-NH ₂
66	P1109	KWKWPGW-NH ₂
67	P1011	KPKWPPW-NH ₂
68	P1012	KFKWPPW-NH ₂
69	P1145	Hep-KFKWPW-NH ₂
70	P1146	Non-KFKWPW-NH ₂
71	P1147	Cap-KFKWPW-NH ₂
72	P1148	Lau-KFKWPW-NH ₂
73	P1149	Pal-KFKWPW-NH ₂
74	P1150	Ste-KFKWPW-NU ₂
75	P1151	Ole-KFKWPW-NH ₂
76	P1258	Aca-KFKWPW-NH ₂
77	P1273	Myr-KFKWPW-NH ₂
78	P1274	Pen-KFKWPW-NH ₂
79	P1275	Und-KFKWPW-NH ₂
80	P1276	Tri-KFKWPW-NH ₂
81	P1205	Oct-kfkwpw-HN ₂
82	P1206	kfkwpw-NH ₂
83	P1343	Lau-kfkwpw-NH ₂

84	P1304	Oct-KFKWPw-NH ₂
85	P1345	Deca-KFKWPW-NH ₂
86	P153	FALKALKKLLKALKKAL-NH ₂
87	P55	FAKLLAKALKKLL-NH ₂
88	P50	VAKKLAKLAKKLAKLAL-NH ₂
89	P43	FAKLLAKLAKKLL-NH ₂
90	P64	FAKALKALLKALKAL-NH ₂
91	P650	FAKALLKALLKALK-NH ₂
92	P146	KYKKALKKLAKLL-NH ₂

Clave de elementos de aminoácidos: OCT indica la adición de ácido octanoico mediante un enlace amida al péptido, usando química de péptidos convencional. COOH indica que el extremo C terminal no está amidado; J es el símbolo de una fenilalanina fluorada; U significa 1-Nal-OH y Z significa 2-Nal-OH, siendo Nal naftilalanina, un aminoácido no natural que es un análogo de fenilalanina y alanina. Lípidos enumerados anteriormente con abreviaturas y acoplados de forma similar a OCT:

myr=ácido mirístico, und=ácido undecanoico, pen=ácido pentadecanoico, pal=ácido palmítico, ste=ácido esteárico, lau=ácido láurico, triácido tridecanoico, cap=ácido caproico, ole=ácido oleico, non=ácido nonanoico, hep=ácido heptanoico, aca=ácido 8-amino-caprílico y deca=ácido decanoico. Las letras en minúsculas para aminoácidos indican restos de forma D.

Descripción detallada de la invención

Para que la invención descrita en este documento pueda entenderse más completamente, se expone la siguiente descripción detallada. La invención se refiere generalmente a composiciones y métodos que comprenden hexapéptidos antimicrobianos que muestran propiedades biológicas deseables.

La presente invención se refiere a hexapéptidos con actividad antimicrobiana contra una serie de patógenos antimicrobianos. Estos patógenos pueden incluir bacterias gram positivas o negativas, bacterias ácido resistentes tales como micobacterias, parásitos, dermatofitos o patógenos fúngicos. Los patógenos fúngicos típicos incluyen *Candida albicans* y los dermatofitos típicos incluyen *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*.

Un ejemplo de un hexapéptido tal es SEC ID N°: 1 (PO666), que tiene los beneficios útiles y sorprendentes de carecer de toxicidad sistémica, tener susceptibilidad reducida a degradación por proteasas, tener una capacidad aumentada de penetrar en áreas (o regiones) tisulares infectadas y de ser rentable de fabricar.

El término dermatofitos se refiere a un hongo particular pero es una etiqueta abreviada habitual para un grupo de tres géneros de hongos que habitualmente provocan enfermedades de la piel en personas y animales. Estos incluyen los géneros *Epidermophyton*, *Trichophyton*, y *Microsporum*.

Pueden hallarse detalles sobre técnicas para formulación y administración de agentes farmacéuticos en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co, Easton Pa.). Aunque es deseable el suministro tópico local, existen otros medios de suministro, por ejemplo: administración oral, parenteral, en aerosol, intramuscular, subcutánea, transcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal o intranasal. La presente invención puede formularse en varios vehículos transportadores, por ejemplo, en un pulverizador; un aerosol; una emulsión de tipo acuoso y oleoso; una emulsión de tipo oleoso y acuoso; una crema facial o crema corporal; una loción solar o loción para después del sol u otro vehículo de administración tópica.

Como se usa en este documento, el término "terapéutico" significa un agente utilizado para tratar, combatir, aliviar, prevenir o mejorar una enfermedad o afección no deseada de un paciente. La afección que se trata en la presente invención incluye diversas enfermedades fúngicas que habitualmente afectan a mamíferos tales como seres humanos, incluyendo infecciones de levadura típicamente causadas por *Candida albicans*, e infecciones cutáneas tales como pie de atleta típicamente causado por *Trichophyton rubrum*, y *Trichophyton mentagrophytes*. Adicionalmente, los hexapéptidos de la presente invención, y composiciones que los contienen, pueden proporcionar características útiles para inclusión en formulaciones cosméticas y de cuidado de la piel generales, tales como diversos cosméticos cutáneos, cremas cutáneas, lociones, protectores solares y lociones o cremas terapéuticas tales como formulaciones antiacné.

I. Síntesis Peptídica

5 Todos los hexapéptidos se sintetizaron usando química de Fmoc (9-Fluorenilmetoxycarbonilo) convencional en un Sintetizador de Múltiples Péptidos Advanced ChemTech Apex 396. El Apex 396 está equipado con un bloque de
 10 reacción de 40 pocillos para la producción de hasta 40 péptidos simultáneamente a una escala de 0,15 mmol. Los péptidos pueden prepararse como secuencias ácidas libres o amidadas usando aminoácidos convencionales. La resina se lavó primero y se hinchó previamente con N,N-dimetil formamida (DMF). Los tiempos de hinchamiento
 15 variaron de 3 minutos a una hora para amida de Rink o resinas Wang. El grupo protector de Fmoc se retiró con piperidina 25 % en DMF durante 25 minutos. La resina se lavó después completamente para retirar rastros de piperidina. Los monómeros de aminoácidos de Fmoc se preactivaron en una solución equimolar de HOAt o HOBt en DMF. Las soluciones fueron de concentración 0,5 M. Los acoplamientos de amida se llevaron a cabo usando HATU PyBop o HBTU como un agente de activación y exceso molar de 2,5-5 veces de aminoácido en condiciones básicas usando una base con impedimento estérico (diisopropiletilamina). Los tiempos de acoplamiento fueron 1-1,5 horas
 20 seguido de un lavado y reacoplamiento para conseguir un acoplamiento doble o triple antes de la desprotección y continuación de la cadena peptídica creciente. La eficacia de acoplamiento se controló usando el ensayo de Kaiser convencional. Una vez que se completó la síntesis peptídica en la resina, el grupo Fmoc final se retiró como anteriormente y las secuencias se dejaron como la base libre. Los lípidos se unieron al extremo N terminal o aminas de cadena lateral, como ácidos orgánicos, usando química peptídica convencional como se ha descrito anteriormente.

25 La escisión del péptido del enlazador lábil ácido se consiguió usando ácido trifluoroacético (TFA) 95 % y agua con los neutralizantes apropiados añadidos. Los tiempos de escisión varían de 30 minutos a una hora. Los péptidos escindidos se retiraron inmediatamente del bloque de escisión y se transfirieron a tubos para la retirada del TFA. El TFA se retira bajo presión reducida. Los péptidos estuvieron entonces listos para purificación y análisis mediante HPLC usando una columna D-18 de fase inversa y Espectrometría de Masas. Se consiguió confirmación de secuencia primaria y purificación preparatoria usando un sistema LC/MS/MS (ABI API2000).

30 Los hexapéptidos de la invención pueden construirse usando una diversidad de precursores de aminoácidos. Los péptidos pueden ser composiciones homogéneas que contienen solamente aminoácidos D, L o cíclicos (no racémicos). La estructura química de tales aminoácidos (término que se usa en este documento para incluir aminoácidos), independientemente de la configuración estereoisomérica, puede basarse en la de los diecinueve o veinte aminoácidos de origen natural: alanina (Ala; A), arginina (Arg; R), asparagina (Asn; N), aspartato (Asp; D), glutamina (Gln; Q), glutamato (Glu; E), glicina (Gly; G), histidina (His; H), isoleucina (Ile; I), leucina (Leu; L), lisina (Lys; K), metionina (Met; M), prolina (Pro; P), fenilalanina (Phe; F), serina (Ser; S), treonina (Thr; T), triptófano (Trp; W), tirosina (Tyr; Y), y valina (Val; V). Se excluye cisteína (Cys; C) para evitar problemas de enlace disulfuro en los productos. Las composiciones de la invención también pueden ser no homogéneas, que contienen por ejemplo aminoácidos D, L y/o cíclicos. Las composiciones hexapeptídicas también pueden contener aminoácidos que son distintos de los aminoácidos de origen natural tales como norleucina, homofenilalanina, ornitina, etc. Estos aminoácidos no naturales pueden seleccionarse de compuestos que contienen funcionalidad de aminoácido y ácido carboxílico, pero pueden no ser aminoácidos alfa.

45 Algunos de los hexapéptidos podrían modificarse con diversos miméticos de aminoácidos o aminoácidos no naturales, que pueden proporcionar hexapéptidos particularmente útiles, puesto que tienden a manifestar estabilidad aumentada *in vivo*. Más específicamente, los aminoácidos no críticos no necesitan limitarse a los de origen natural en proteínas, tales como L-alfa-aminoácidos o sus D-isómeros, pero pueden incluir también aminoácidos no naturales, tales como miméticos de aminoácidos, por ejemplo D o L-naftilalanina; D o L-fenilglicina; D o L-2-tieneilalanina; D o L-1, -2, 3-, o 4-pireneilalanina; D o L-3 tieneilalanina; D o L-(2-piridinil)-alanina; D o L-(3-pirindinil)-alanina; D o L-(2-pirazinil)-alanina; D o L-(4-isopropil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilalanina; D-rho-fluorofenilalanina; D o L-rho-bifenil-fenilalanina; D o L-rho-metoxibifenilfenilalanina; D o L-2-indol(alquil)alaninas; y D o L-alquilalaninas, en los que el grupo alquilo puede ser un metilo, etilo, propilo, hexilo, butilo, pentilo, isopropilo, isobutilo, secisotilo, isopentilo sustituido o no sustituido o un aminoácido no ácido. Los anillos aromáticos de un aminoácido no natural incluyen, por ejemplo, anillos aromáticos de tiazolilo, tiofenilo, pirazolilo, bencimidazolilo, naftilo, furanilo, pirrolilo y piridilo. La estabilidad de los hexapéptidos puede ensayarse de varias maneras. Por ejemplo, se han usado peptidasas y diversos medios biológicos, tales como plasma y suero, para ensayar la estabilidad. Véase, por ejemplo, Verhoef, *et al.*, Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinetics 11: 291 (1986). La semivida de los péptidos puede determinarse convenientemente usando un ensayo de suero 25 % (v/v) típico.

60 Se reconocerá por los expertos en la materia, que los hexapéptidos de la invención una vez seleccionados pueden modificarse para contener sustituciones de aminoácidos funcionalmente equivalentes y conservan aún las mismas o similares características antifúngicas o antibacterianas. La importancia del índice hidropático de aminoácidos para conferir función biológica en una proteína se ha analizado generalmente por Kyte y Doolittle (1982). Se ha descubierto por estos investigadores y otros que ciertos aminoácidos pueden sustituir a otros aminoácidos que tienen una puntuación o índice hidropático similar y conservar aún actividad biológica similar si no idéntica. Como se presenta en la Tabla 2 a continuación, se asigna a los aminoácidos un índice hidropático basándose en sus características de carga e hidrofobicidad. Se cree que el carácter relativo hidropático de los aminoácidos determina

- la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con la molécula sustrato. De forma similar, en péptidos cuya estructura secundaria no es un aspecto principal de la interacción del péptido, la posición dentro del péptido y la característica del resto aminoacídico determinan las interacciones que el péptido tiene en un sistema biológico. Se propone que la equivalencia funcional biológica puede mantenerse típicamente cuando los aminoácidos que tienen una diferencia no mayor de +/-1 a 2 en el valor de índice, y más preferiblemente dentro de una diferencia +/-1, se intercambian.

TABLA 2.

ÍNDICE HIDROPÁTICO DE AMINOÁCIDOS	
Isoleucina	4,5
Valina	4,2
Leucina	3,8
Fenilalanina	2,8
Cisteína/Cistina	2,5
Metionina	1,9
Alanina	1,8
Glicina	-0,4
Treonina	-0,7
Triptófano	-0,9
Serina	-0,8
Tirosina	-1,3
Prolina	-1,6
Histidina	-3,2
Ácido Glutámico	-3,5
Glutamina	-3,5
Ácido Aspártico	-3,5
Asparagina	-3,5
Lisina	-3,9
Arginina	-4,5

- 10 Por lo tanto, por ejemplo, isoleucina, que tiene un índice hidropático de +4,5, puede sustituir a valina (+4,2) o leucina (+3,8) y aún producir una proteína que tenga actividad biológica similar. Como alternativa, en el otro extremo de la escala, lisina (-3,9) puede sustituir a arginina (-4,5) y así sucesivamente.

- 15 En consecuencia, estas sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de sustituyentes del grupo R, por ejemplo, con respecto a tamaño, carácter electrófilo, carga y similares. En general, aunque estas no son las únicas sustituciones tales, las sustituciones preferidas que toman diversas de las características anteriores en consideración incluyen las siguientes:

TABLA 3

Resto Original	Sustituciones de Restos Ejemplares
Alanina	gly; ser
Arginina	lys
Asparagina	gln; his
Aspartato	glu
Cisteína	ser
Glutamato	asp
Glutamina	asn
Glicina	ala
Histidina	asn; gln
Isoleucina	leu; val
Leucina	ile; val
Lisina	arg; gln; glu
Metionina	met; leu; tyr
Serina	thr

Treonina	ser
Triptófano	tyr
Tirosina	trp; phe
Valina	ile; leu

A. Estabilización de Modificaciones Peptídicas

5 Puede realizarse una diversidad de modificaciones a los hexapéptidos siempre que se conserve la actividad antimicrobiana deseada. Pueden usarse algunas modificaciones para aumentar la potencia antimicrobiana intrínseca del hexapéptido. Otras modificaciones pueden facilitar el manejo del hexapéptido. Los grupos funcionales peptídicos que pueden típicamente modificarse incluyen hidroxilo, amino, guanidinio, carboxilo, amida, fenol, anillos de imidazol o sulfhidrilo. Las reacciones típicas de estos grupos incluyen pero sin limitación acetilación de grupos hidroxilo por alquil haluros. Los grupos carboxilo pueden esterificarse, amidarse o reducirse a alcoholes. Las carbodiimidas u otros catalizadores pueden usarse para catalizar la amidación de grupos carboxilo. Los grupos amida de asparagina o glutamina pueden desamidarse en condiciones básicas o ácidas. Las reacciones de acilación, alquilación, arilación o amidación se producen fácilmente con grupos amino tales como el grupo amino primario del péptido o el grupo amino de restos de lisina. El grupo fenólico de tirosina puede halogenarse o nitrarse. Los ejemplos en los que la solubilidad de un péptido podría reducirse incluyen acilar restos de lisina cargados o acetilar los grupos carboxilo de ácidos aspártico y glutámico.

Los hexapéptidos pueden conjugarse con moléculas vehículo solubles o insolubles para modificar sus propiedades de solubilidad según se necesite y para aumentar las concentraciones locales de hexapéptidos en sus áreas diana. Las composiciones de hexapéptidos de la invención también pueden inyectarse en el sistema vascular de una planta. Los ejemplos de moléculas vehículo solubles incluyen polímeros de polietilenglicol y polivinil pirrolidona. Los ejemplos de polímeros insolubles incluyen arena u otros silicatos o poliestireno, celulosa o similares. Los hexapéptidos también pueden microencapsularse para potenciar su estabilidad durante la aplicación a semilla, suelo o planta. La aplicación en planta puede ser especialmente útil para el tratamiento de diversas enfermedades fúngicas de la planta. Los patógenos fúngicos de planta típicos incluyen ejemplos tales como los patógenos de trigo *Stagonospora nodorum* y *Septoria tritici*, y patógenos hemibiotróficos tales como las especies de *Colletotrichum* y en particular el patógeno de antracnosa de las judías *C. lindemuthianum*. Otros patógenos fúngicos vegetales habituales incluyen tales como *Mycosphaerella brassicicola*, *Pyresiopeziza brassicae*, *Peroizospora destructor*, y *Botrytis squamosa*. Típicamente, se usan microesferas de poliéster para encapsular y estabilizar los péptidos.

30 B. Síntesis Peptídica a Gran Escala

La síntesis peptídica a gran escala (hasta 60 kg) en solución o fase sólida se conseguirá una vez que se han seleccionado composiciones peptídicas particulares para usarse en masa. Esta síntesis requiere una selección cuidadosa de grupos protectores y métodos de condensación. Todos los materiales y reactivos de partida pueden obtenerse con buena pureza de proveedores químicos tales como Sigma-Aldrich, Inc. Adicionalmente, pueden obtenerse aminoácidos de proveedores tales como Bachem o Novabiochem®. La racemización de componentes básicos de aminoácidos en condiciones de acoplamiento pueden suprimirse o eliminarse en gran medida mediante el uso de reactivos de nueva generación, es decir HOBt, HOAt, HBTU o HATU. Incluso la metodología de fase sólida está en la actualidad desarrollada de forma adecuada para fabricar péptidos farmacéuticos en múltiplos de al menos 10 kg/lote.

C. Síntesis a Gran Escala de Péptidos En Solución

45 La síntesis de fases de solución permite la planificación sencilla con respecto a estrategia de protección de grupos, selección de fragmentos y métodos de acoplamiento de fragmentos para minimizar la racemización. Los intermedios pueden en ocasiones aislarse simplemente mediante técnicas de cristalización, que pueden eliminar la necesidad de purificación por cromatografía de columna y por lo tanto mejorar el potencial de cambio de escala. La calidad de los fragmentos producidos de forma simultánea puede controlarse fácilmente en cada etapa.

50 D. Síntesis de Fase Sólida a Gran Escala de Péptidos

El coste de los polímeros más avanzados para síntesis de fase sólida es habitualmente alto. Algunos de los soportes no están disponibles a granel. Sin embargo, sus propiedades desempeñan un papel importante en la accesibilidad de péptido anclado y liberación del péptido de la resina en una forma completamente protegida, desprotegida o modificada. La transición de laboratorio a escala de fabricación de síntesis de péptidos de fase sólida (SPPS) es claramente ventajosa debido al hecho de que el proceso sintético completo podría fácilmente automatizarse y la eficacia de las etapas sintéticas podría controlarse y optimizarse. Los procesos de activación de escala de producción se conocen bien y son inocuos para el medio ambiente. Además, SPPS permite la recuperación directa y reciclaje del exceso de componentes básicos de aminoácidos de los filtrados de residuos a escala de producción.

60

Las siguientes referencias se incorporan específicamente por referencia en este documento: Boris Group, "Production of large-scale peptides in solution." *Biochem. Soc. Trans.*, 18(6), 1299-306; Christian Birr, "The transition to solid-phase production of pharmaceutical peptides." *Biochem. Soc. Trans.*, 18(6), 1313-16; y Paul Lloyd-Williams, Fernando Albericio y Ernest Giralt, "Convergent solid-phase peptide synthesis." *Tetrahedron* 49(48), 11065-11133.

5 Cuando se van a intentar síntesis a gran escala de las composiciones peptídicas de la invención, deberían seguirse los métodos y materiales enumerados en estas referencias.

Por supuesto, cuando se ha determinado que un péptido de L-aminoácidos es suficientemente inhibidor (con o sin estabilización), puede ser posible usar expresión de ADN recombinante de acuerdo con técnicas bien conocidas por los expertos en la materia para producir tales péptidos en cantidades a gran escala. Cuando se producen péptidos recombinantes y cuando se desea estabilidad de tales péptidos, el péptido puede protegerse de ataque en cada extremo ligando covalentemente D-aminoácidos a uno, el otro o ambos extremos usando técnicas conocidas por los expertos en la materia de química peptídica.

15 E. Encapsulación en Microesferas de los Péptidos

Pueden usarse diversos métodos de preparación de microesferas dependiendo de la naturaleza hidrófila o hidrófoba de la composición peptídica a encapsular. Wang, H. T., *et al.* 1991, "Influence of formulation methods on the in vitro controlled release of protein from poly(éster) microspheres," *J. of Controlled Release* 17: 23-25 se incorpora específicamente en este documento en la medida en que proporciona métodos y materiales no abordados en este documento.

(1) Método de emulsión de aceite/aceite. Se usará un ensamblaje de titulación TTA-60 (Radiometer, Copenhagen, Dinamarca) en este método para agitación eficaz. Se disolverá poli(DL-lactida/glicolida, 50:50, Dupont) (0,5 g) en cloruro de metileno (3,3 ml). Después pueden dispersarse péptidos secados por pulverización (25 mg) en esta solución aplicando sonicación durante 30 segundos en un limpiador de ultrasonidos (Branson 3200, Branson Cleaning Company, Shelton, Conn.). Esta suspensión puede pasarse en gotas a través de una jeringa con una aguja de calibre 220 a una emulsión bien agitada que contiene aceite de silicona (20-30 ml), CH.sub.2 Cl.sub.2 (30-40 ml) y Span 85 (2 ml). Puede después añadirse en gotas éter de petróleo (30 ml) a la dispersión anterior. La agitación puede continuarse después durante 2 horas. Las microesferas producidas de esta manera se filtrarán después, se lavarán con éter de petróleo y se secarán en un vacío durante 72 horas.

(2) Método de emulsión de aceite/agua. Se emulsionará una suspensión a la que se han aplicado ultrasonidos de péptido secado por pulverización (25 mg), poli(DL-lactida/glicolida, 50:50) (Dupont o Birmingham Polymers) (0,5 g) y CH.sub.2 CL.sub.2 (2 ml) con una solución acuosa (50 ml) que contiene oleato sódico (0,2 g) en un ensamblaje de titulación TTA-60 durante 5 minutos. El cloruro de metileno se retirará con un evaporador rotatorio (120 rpm) a 47,88 KPa (1 hora a 22 °C), 21,28 KPa (0,5 horas a 22 °C) y 21,28 KPa y 40 °C (1h). Las microesferas obtenidas se filtrarán, se lavarán con agua y se secarán en vacío a temperatura ambiente.

(3) Método de emulsión de (agua/aceite)/agua. Se emulsionará una solución de péptido (2,6 mg) en agua destilada (100 ml) con solución de cloruro de metileno (0,5 g/2 ml) de poli(DL-lactida/glicolida, 50:50 Henley Chemical, RG503) a través del uso de un sonicador sonda (Branson, Danbury, Conn.) a 125 W y coeficiente de utilización 40 %, modo por pulsos. Esta emulsión (agua/aceite) se emulsionará en una solución acuosa (50 ml, 35 °C.) que contiene alcohol polivinílico 0,1 % con un homogeneizador (5000 rpm, ESGE Handmixer M122, Biospec Products, Bartlesville, Okla.) durante 5 minutos. El cloruro de metileno se retirará de la emulsión resultante (agua/aceite)/agua en un evaporador rotatorio a 39,90 KPa y 34 °C (120 rpm) durante 1 hora. Las microesferas obtenidas se filtrarán, lavarán con agua y se secarán al vacío a temperatura ambiente o se liofilizarán (Consol 4.5, Virtis Co., Gardiner, N. Y.).

Los pesos moleculares del polímero pueden determinarse por cromatografía de exclusión molecular. Los tamaños de partículas de las microesferas pueden determinarse por microscopía electrónica de barrido (SEM, Hitachi S-570, Tokio, Japón).

También pueden realizarse estudios de liberación de péptidos *in vitro*. Las microesferas (200 mg) se suspenderán en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (2,5 ml) pH 7,2 y se agitarán a 37 °C y 100 rpm en un agitador de incubador ambiental (G-24, New Brunswick Scientific Co., Edíson, N. J.). En tiempos de toma de muestras específicos (cada día durante los primeros 4 días y cada dos días durante el resto del estudio) la solución de tampón se retirará completamente y se reemplazará con PBS nuevo. El contenido peptídico del PBS se medirá usando el método de Bradford u otro ensayo cuantitativo adecuado.

60 Se conocen otros métodos de microencapsulación que pueden hallar utilidad en ciertos casos. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.324.683.

II. Métodos de Uso

65 Una realización adicional de la invención se refiere a métodos para usar los hexapéptidos descritos anteriormente. Los métodos de uso preferiblemente no provocan lesión o matan a células de mamífero no infectadas normales. Los

métodos de uso a niveles de dosis terapéuticos preferiblemente no provocan lesión ni matan células de mamífero no infectadas normales. Los métodos de uso pueden implicar el uso de un hexapéptido sencillo o pueden implicar el uso de múltiples hexapéptidos.

- 5 Para los fines de la presente invención, "principio activo" se refiere al hexapéptido con la capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos diana. Los microorganismos diana incluyen pero sin limitación patógenos de animales y del hombre, tales como los que provocan infecciones de levadura y diversas infecciones cutáneas tales como pie de atleta y otras afecciones dermatofíticas. El microorganismo diana también puede incluir los hongos que provocan podredumbre de la raíz, corrido de la flor, infecciones sistémicas, enfermedades vasculares e infecciones
- 10 de ciertas áreas superficiales de las plantas.

A. Enfermedades Fúngicas Animales (*Pythium, Candida*)

- 15 Se anticipa que la presente invención también hallará uso en el tratamiento de diversas infecciones de mamíferos. La Tabla 4 a continuación muestra una diversidad de enfermedades fúngicas de mamíferos incluyendo animales y hombres aptas para las composiciones y métodos de la presente invención. Se proporciona una composición farmacéutica útil para tratar infecciones bacterianas y/o fúngicas por la presente invención. Esta composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz del agente antimicrobiano y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Ciertos de los organismos enfermos enumerados en este documento se ensayaron con las composiciones de
- 20 hexapéptidos detalladas en este documento. Se conocen en la técnica y se describen en la Farmacopea de los Estados Unidos y el Formulario Nacional vehículos farmacéuticamente aceptables en los que pueden suministrarse los hexapéptidos de la invención.

TABLA 4

HONGO	DIANA
Sistémico:	
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	hombre, perros
<i>Coccidioides immitis</i>	hombre, perro, vaca, caballo, gato, ovejas, roedores (se han realizado varios intentos de una vacuna)
<i>Histoplasma capsulatum</i>	hombre, perro, gato, caballo
<i>Pythium spp.</i>	perros, caballos
<i>Zygomycetes spp.</i>	cerdos, cabras, vacas, ciervos, caballos, perros, gatos
<i>Rhinosporidium seeberg</i>	perros, caballos, hombre
<i>Sporothrix schenckii</i>	gato, perro, caballo, hombre
Dermatocitos:	
<i>Microsporum canis</i>	gato, perro, caballo, hombre
<i>Microsporum distortum</i>	perro
<i>Microsporum gypseum</i>	mamíferos
<i>Microsporum nanum</i>	cerdos
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	perro, gato, vaca, caballo, hombre
<i>Trichophyton equinum</i>	caballo
<i>Trichophyton verrucosum</i>	vaca, hombre (existe una vacuna en Europa)
<i>Trichophyton gallinae</i>	Aves

Incidencia de Infecciones Nosocomiales Fúngicas Sistémicas Humanas (casos por año)	
<i>Candida spp.</i>	202.000
(Especies enumeradas en frecuencia descendiente de causalidad de infección)	
<i>albicans</i>	
<i>topicalis</i>	
<i>parapsilosis</i>	
<i>krusei</i>	
<i>pseudotropicalis</i>	
<i>stellatoidea</i>	
<i>guilliermondii</i>	
<i>lusitaniae</i>	
<i>rugosa</i>	
<i>Aspergillus spp.</i>	43.000

Torulopsis glabrata

18.000

Zygomycetes

7.000

5 Dependiendo de la aplicación específica contemplada, la composición farmacéutica proporcionada por la invención objeto puede formularse como una solución, suspensión, preparación parenteral, pomada, crema, loción, pulverización, polvo o cápsula comprimida. Las preparaciones parenterales pueden incluir un vehículo tal como agua sin pirógenos especialmente destilada, tampón fosfato o solución salina normal. Las pomadas, cremas, lociones y pulverizaciones pueden incluir un vehículo tal como aceite vegetal o mineral, vaselina blanca o un alcohol de alto peso molecular, es decir, mayor de C₁₂. Las cápsulas o comprimidos pueden incluir diluyentes (por ejemplo, lactosa), aglutinantes, lubricantes (por ejemplo, ácido esteárico) y un disgregante (por ejemplo, almidón de maíz).

10 También se proporciona un método para tratar a un sujeto que tenga una infección fúngica que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz para muerte bacteriana o fúngica de la composición farmacéutica de la presente invención. Los modos de administración se reconocen bien en la técnica para tratamiento o prevención de infecciones bacterianas o fúngicas de la mucosa. Pueden situarse cremas, supositorios o soluciones que contengan el principio activo en contacto con el área infectada. Cuando la infección es externa, puede masajearse una crema en el área infectada y circundante dos veces al día hasta después de que la infección se haya erradicado. Cuando se requiera uso intravaginal, deberían inyectarse aproximadamente 5 gramos de la crema en la parte alta de la bóveda vaginal usando un aplicador convencional. Este tratamiento debería repetirse dos veces al día hasta que se haya erradicado la infección. Como alternativa, pueden insertarse óvulos vaginales en la parte alta de la bóveda vaginal una o dos veces al día y el tratamiento puede continuarse hasta que la infección se haya erradicado.

20 Puede ser deseable formular una pasta adhesiva dental convencional que contenga una cantidad eficaz del hexapéptido de la invención o combinaciones del mismo. Las concentraciones típicas variarán de 0,0125 % a 1,5 % en peso de agente antimicrobiano por 100 gramos de pasta. Se aplican aproximadamente 2 gramos de pasta de una manera convencional a la superficie de contacto de la dentadura antes de su inserción en la boca. Dicha aplicación debe realizarse después de empapado durante una noche en el limpiador de dentadura. Los limpiadores de dentadura pueden formularse mediante la adición de una cantidad eficaz del agente antimicrobiano con un comprimido de aproximadamente 3 a 3,5 gramos. Dicho comprimido se disuelve en agua produciendo una solución antimicrobiana para limpiar dentaduras. En el modo preferido de uso, la dentadura después de la retirada de la boca del paciente, se empapa en este limpiador durante aproximadamente 8 a aproximadamente 12 horas. Si se desea, en lugar de utilizar un cemento de dentadura, puede formularse también un polvo adhesivo de dentadura con los agentes antimicrobianos de la presente invención.

35 También puede formularse una pulverización bucal que contenga una cantidad eficaz del agente activo con uno o más hexapéptidos de la presente invención. Este material puede pulverizarse como un agente antimicrobiano en alícuotas de 0,25 a 0,5 ml sobre las superficies del diente y la encía de cada cuadrante entre 1 y 3 veces al día. En el caso de personas que usan dentadura postiza, la pulverización puede utilizarse directamente sobre la superficie de la dentadura antes de la inserción diaria de la dentadura postiza. Si se desea, puede proporcionarse una formulación de enjuague bucal que contenga una cantidad eficaz del agente antimicrobiano.

40 Los agentes antimicrobianos pueden emplearse en cantidades eficaces e incluir dosis en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mg por kilogramo de peso del hospedador, cuando se administran de forma sistémica. Pueden formularse agentes activos en solución salina tamponada con fosfato. También se conocen inhalantes de pulverización de aerosol mediante los que pueden introducirse composiciones de hexapéptidos antimicrobianos de la invención. Pueden encontrarse métodos ejemplares para preparar péptidos antimicrobianos como composiciones farmacéuticas en la Patente de Estados Unidos N° 5.126.257, incorporada en este documento por referencia en su totalidad.

50 Una realización de la invención es el uso de uno o más de los hexapéptidos de la invención para inhibir o matar células microbianas (microorganismos). Los microorganismos pueden ser células bacterianas, células fúngicas, protozoos, virus o células eucariotas infectadas con microorganismos patogénicos. El método generalmente se refiere al contacto de microorganismos con uno o más hexapéptidos de la presente invención. La etapa de contacto puede realizarse *in vivo*, *in vitro*, por vía tópica, vía oral, vía transdérmica, vía sistémica o por cualquier otro método conocido por los expertos en la materia. La etapa de contacto se realiza preferiblemente a una concentración suficiente para inhibir o matar los microorganismos. La concentración del hexapéptido puede ser al menos aproximadamente 0,1 μM, al menos aproximadamente 0,5 μM, al menos aproximadamente 1 μM, al menos aproximadamente 10 μM, al menos aproximadamente 20 μM, al menos aproximadamente 50 μM o al menos aproximadamente 100 μM. Los métodos de uso pueden dirigirse a la inhibición o muerte de microorganismos tales como bacterias, bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, microbacterias, levaduras, hongos, algas, protozoos, virus y organismos intracelulares. Los ejemplos específicos incluyen, pero sin limitación, *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Chlamydia*, *Candida albicans*, *Saccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Trypanosoma cruzi*, o *Plasmodium falciparum*. La etapa de contacto puede realizarse por inyección sistémica, inyección oral, subcutánea, IP, IM, IV o

por aplicación tópica. Para inyección, la dosificación puede estar entre cualquiera de las siguientes concentraciones: aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg. La etapa de contacto puede realizarse en un mamífero, un gato, un perro, una vaca, un caballo, un cerdo, un pájaro, un pollo, una planta, un pez o un ser humano.

Los hexapéptidos preferidos actualmente para aplicaciones antibacterianas incluyen SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 70; SEC ID N°: 72, SEC ID N°: 79 y SEC ID N°: 80.

Los hexapéptidos preferidos actualmente para aplicaciones antifúngicas incluyen SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 70; SEC ID N°: 72, SEC ID N°: 79 y SEC ID N°: 80.

Los hexapéptidos preferidos actualmente para aplicaciones antibacterianas y antifúngicas incluyen SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 70; SEC ID N°: 72, SEC ID N°: 79 y SEC ID N°: 80.

B. Sinergia de Hexapéptidos con Antifúngicos o Antibacterianos

Una realización adicional de la invención se refiere a métodos para la potenciación aditiva o sinérgica de la actividad de un agente terapéutico. El método puede comprender preparar una composición, comprendiendo la composición al menos un hexapéptido de la presente invención y un agente terapéutico (por ejemplo un antibiótico tal como penicilina). Como alternativa, el método puede comprender tratamiento conjunto a la terapia con un hexapéptido (o una combinación de hexapéptidos) usado junto con otros agentes terapéuticos. El hexapéptido o combinación de hexapéptidos puede ser cualquiera de los hexapéptidos enumerados en la Tabla 1. Preferiblemente el método comprende administrar al menos uno de los hexapéptidos de SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 56, SEC ID N°: 62, SEC ID N°: 63, SEC ID N°: 69, SEC ID N°: 70, SEC ID N°: 72, SEC ID N°: 77, SEC ID N°: 78, SEC ID N°: 79, SEC ID N°: 80, SEC ID N°: 81, SEC ID N°: 83, y SEC ID N°: 84.

Por ejemplo, SEC ID N°: 55 (S35-2) muestra sinergia con el agente terapéutico clotrimazol contra cepas resistentes a azol de cepas de *C. albicans*, como se describe en los siguientes experimentos. El índice de concentración inhibidora fraccional (FIC) se usó para determinar la sinergia entre agentes antimicrobianos. Se determinaron MIC de los péptidos contra microorganismos de ensayo tres veces en ocasiones separadas. Se ensayaron diluciones seriadas dos veces de ácido nalidíxico o cloranfenicol en presencia de una cantidad constante de péptido, igual a un cuarto de la MIC del péptido. El índice de FIC se calculó como sigue: $FIC = 0,25 + MIC$ (antibiótico en la combinación)/MIC (antibiótico solo), en el que 0,25 es la relación de la MIC del péptido en combinación con la MIC del péptido por sí solo. Se considera que un índice de FIC de menos de 0,5 demuestra sinergia.

TABLA 5

Sinergia de SEC ID N°: 55 (S35-2) Con Azoles Contra <i>C. albicans</i>, FIC<0,5 Indica Efectos Sinérgicos				
Cepa	MIC-SEC ID N°: 55	MIC-clotrimazol	MIC-SEC ID N°: 55+azol	Índice de FIC
N° 185 (CDR1,2)	32	128	16/12,5	0,598
N° 186 CDR1,2	16	32	2/12,5	0,515
N° 187 CDR1,2	32	>256	4/25	0,223
N° 192 CDR1,2,	32	128	4/50	0,515
N° 196 CDR1,2	32	64	4/50	0,905
N° 199 CDR1,2	32	64	4/25	0,515

Todas las cepas son aislados clínicos resistentes a azol del Profesor Ted White (Seattle Biotechnology Research Institute, Seattle)

TABLA 6

Candida de T.W.	Ketoconazol	Clotrimazol	Miconazol	S35-2 SEC ID N°: 55	S35-3 SEC ID N°: 56
N° 184	64	>256	>256	32	128
N° 185	8	128	>256	32	128
N° 186	8	32	>256	16	128

Nº 187	16	>256	>256	32	128
Nº 192	32	128	>256	32	128
Nº 193	8	0.5	>256	32	128
Nº 194	16	>256	>256	32	>128
Nº 195	128	256	>256	64	128
Nº 196	32	64	128	32	128
Nº 197	>256	>256	>256	32	>128
Nº 198	1	>256	128	16	128
Nº 199	16	64	>256	32	128

5 En otro ejemplo más, SEC ID Nº: 55 (S35-2) muestra sinergia con un agente terapéutico polimixina B (PXB) contra bacterias resistentes a fármacos tales como *P. aeruginosa* tales como las descritas en la Tabla 7. La Tabla 7 demuestra el potencial de los hexapéptidos para promover la actividad bactericida de antibióticos convencionales tales como polimixina B (PXB) contra bacterias resistentes a fármacos tales como *P. aeruginosa*. Como se ha demostrado, SEC ID Nº: 55 (S35-2) presentó actividad sinérgica (indicada por un índice de FIC <0,5) en combinación con polimixina B.

TABLA 7
Sinergia de SEC ID Nº: 55 (S35-2) con polimixina B (PXB)

Cepa de <i>P. aeruginosa</i>	MIC-1032(µg/ml)	MIC-PXB (µg/ml)	MIC-Nº:55 combinado (µg/ml)	MIC-PXB-combinado (µg/ml)	FIC*
H187	32	0,5	8	0,06	0,37
100609	64	0,5	2	0,125	0,28
H401	64	0,25	2	0,0625	0,28
M917	64	1	16	0,25	0,266

Notas:

P. aeruginosa H187-tipo silvestre

P. aeruginosa 100609-resistente a tobromicina

P. aeruginosa H401-aislado clínico mucóide

P. aeruginosa M917-aislado clínico resistente a multifármacos

*FIC=(MIC-Nº: 55-combinado)/(MIC-Nº: 55)+(MIC-PXB-combinado)/(MIC-PXB)

*FIC<0,5 indica sinergia

- 10 El agente terapéutico puede en general ser cualquier agente terapéutico y preferiblemente es un antibiótico, un agente antimicrobiano, un factor de crecimiento, un agente quimioterapéutico, un agente antimicrobiano, lisozima, un agente quelante o EDTA. Preferiblemente, la actividad de la composición es mayor que la actividad de la misma composición que contiene el agente terapéutico pero sin el hexapéptido. La composición o terapia conjunta puede usarse en aplicaciones *in vitro*, *in vivo*, tópicas, orales, IV, IM, IP y transdérmicas. La potenciación de la actividad de la composición que contiene el agente terapéutico y el hexapéptido es preferiblemente al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 % o 200 % en relación con la actividad del agente terapéutico por sí solo.
- 15
- 20 Generalmente, cualquier hexapéptido que sea activo por sí solo contra una diana se prefiere para su uso para aumentar de forma aditiva o sinérgica la actividad de otro agente terapéutico contra esa diana. Si varios hexapéptidos son candidatos para una aplicación de sinergia dada, entonces los hexapéptidos menos tóxicos se considerarían más favorablemente.
- 25 Una realización adicional más de la invención se refiere a métodos para el tratamiento de pacientes diagnosticados con Fibrosis Quística, (FQ). FQ provoca, entre otros efectos, inflamación e infección en los pulmones. Los hexapéptidos descritos anteriormente de la presente invención pueden usarse en el tratamiento de tales infecciones pulmonares, que con frecuencia están causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Los hexapéptidos de la invención pueden poseer propiedades antimicrobianas útiles que los harían eficaces para tratar infecciones pulmonares en pacientes con FQ. El hexapéptido o combinación de hexapéptidos podrían administrarse a un paciente con FQ por cualquier medio aceptable incluyendo inhalación o suministro sistémico. El hexapéptido o combinación de hexapéptidos podrían administrarse en una dosis sencilla, en múltiples dosis o como un suministro continuo.
- 30
- 35 Una realización adicional de la invención se refiere a métodos para tratar enfermedades de transmisión sexual (ETS). Muchas de las especies fúngicas responsables de ETS probablemente se inhiben o mueren por aplicación de uno o más de los hexapéptidos de la invención de la Tabla 1. Los ejemplos de tales especies incluyen *C. albicans*,

5 *C. glabrata* y *C. tropicalis*. El hexapéptido o hexapéptidos de la invención pueden adicionalmente usarse contra otros agentes responsables de ETS incluyendo virus y bacterias. El hexapéptido o hexapéptidos pueden administrarse a un paciente con ETS por cualquier método aceptable, tal como suministro tópico, oral o sistémico. El hexapéptido o hexapéptidos pueden administrarse en una dosis sencilla, en múltiples dosis o como un suministro continuo. El hexapéptido o hexapéptidos pueden administrarse en cualquier forma aceptable, tal como una crema, gel o líquido. Un indicio de la probabilidad de actividad de los hexapéptidos de la presente invención en el ambiente vaginal se muestra en la Figura 2, en la que se muestra la actividad de SEC ID N°: 55 en curvas de muerte frente a *C. Albicans* y *S. aureus*.

10 Las composiciones de la presente invención también pueden incluir un vehículo farmacéutica o dermatológicamente aceptable. Los ejemplos de vehículos incluyen emulsiones y geles. Las emulsiones con frecuencia son una mezcla de una fase oleosa y una fase acuosa. Las composiciones también pueden comprender materiales abrasivos exfoliantes. Las composiciones también pueden comprender un estabilizador. Las composiciones también pueden comprender un compuesto de control de la espuma.

15 Las composiciones también pueden incluir uno o más componentes activos de cuidado de la piel adicionales. Los ejemplos de componentes activos de cuidado de la piel incluyen sustancias activas desescamantes, sustancias activas antiacné, compuestos de vitamina B3, retinoides (incluyendo retinol, retinal, ésteres de retinol, retinil propionato, ácido retinoico y retinil palmitato), hidroxiácidos, eliminadores de radicales, quelantes, agentes antiinflamatorios, agentes anestésicos tópicos, sustancias activas de bronceado, agentes de aclaramiento de la piel, agentes anticelulíticos, flavonoides, sustancias activas antimicrobianas, agentes de curación de la piel, sustancias activas antifúngicas, farnesol, fitantriol, alantoina, ácido salicílico, niacinamida, dexpanterol, acetato de tocoferol y glucosamina.

20 Las composiciones también pueden incluir compuestos de filtro solar. Los ejemplos de compuestos de filtro solar incluyen compuestos de filtro solar inorgánicos y compuestos de filtro solar orgánicos. Los compuestos de filtro solar inorgánicos pueden incluir óxidos metálicos tales como óxido de cinc, óxido de titanio y óxido de hierro. Los compuestos de filtro solar orgánicos pueden incluir octilmetoxicinamato, octil salicilato, ácido tereftaliden dicánfor sulfónico, avobenzona y octocrieno.

25 Una realización adicional de la invención se refiere al uso de uno o más de los hexapéptidos de la Tabla 1 en la promoción de la curación de heridas. En ciertas realizaciones, el hexapéptido tiene una alta potencia contra microorganismos incluyendo bacterias más frecuentemente asociadas con infecciones de heridas: *S. aureus*, *S. pyogenes* y *P. aeruginosa*. Ciertos hexapéptidos también promueven la curación de heridas y reducción de la inflamación. El hexapéptido o hexapéptidos pueden administrarse en cualquier forma aceptable, tal como una crema, gel o líquido. El hexapéptido o hexapéptidos pueden administrarse de cualquier manera aceptable, tal como administración tópica o administración sistémica.

30 **C. Cepas Microbianas**

40 La siguiente tabla enumera los diversos microorganismos usados a lo largo de los Ejemplos.

TABLA 8

Microorganismo	Referencia o fuente
<i>Escherichia coli</i> UB1005	D. Clark, FEMS Microb. Lett. 21:189-195, 1984
<i>Salmonella typhimurium</i> 14028S	Fields <i>et al.</i> , Science 243:1059-1062, 1989
<i>Staphylococcus aureus</i> SAP0017	Aislado clínico resistente a metilicina del Profesor T. Chow, hospital General de Vancouver
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> H187	Angus, <i>et al</i> , AAC 21:299-309, 1982
<i>Candida albicans</i> 105	De la Profesora Barbara Dill (UBC)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 100609	resistente a tobramicina Universidad de Calgary
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> H401	aislado clínico mucoide Universidad de Columbia Británica
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> M917	aislado clínico resistente a multifármaco Universidad de Columbia Británica

D. Actividad Antimicrobiana

Las MIC (concentraciones inhibidoras mínimas) se determinaron para los hexapéptidos de interés usando una versión ligeramente modificada del método de microdilución de caldo de cultivo de NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) como se ha descrito previamente (Steinberg *et al.*, AAC 41: 1738, 1997). Brevemente, se prepararon agentes antimicrobianos como concentrados 10X en el disolvente más apropiado. Para el hexapéptido, se usó ácido acético 0,01 % que contenía albúmina de suero bovino 0,2 % como una proteína vehículo. Se prepararon inóculos resuspendiendo colonias de una BAP (por favor deletee este término) en medio y ajustando a la suspensión para adecuarse a la de un patrón McFarland 0,5. La suspensión se diluyó en medio nuevo (como se recomienda por NCCLS para el organismo) para proporcionar 2×10^5 a 7×10^5 UFC/ml para bacterias o 2×10^3 a 7×10^3 UFC/ml para *Candida*. Después de distribuir alícuotas de 100 µl de la suspensión microbiana a cada pocillo de una placa de microtitulación de polipropileno de 96 pocillos, se añadieron 11 µl de compuesto de ensayo. La MIC se definió como la concentración más baja de fármaco que evitaba la turbidez visible después de 16 a 20 horas (bacterias) o 46 a 50 horas (*Candida*) a 35 °C.

En la Tabla 9, la MIC de hexapéptidos seleccionados contra un panel extendido de *S. aureus* muestra su actividad eficaz contra cepas clínicas particularmente difíciles.

TABLA 9

MIC De Hexapéptidos Contra Panel Extendido De <i>S. aureus</i>									
	Cepa bacteriana								
Péptido	Nº 82	Nº 84	Nº 86	Nº 88	Nº 89	Nº 92	Nº 93	Nº 13	Nº 12
P1032 SEC ID Nº: 55	32	32	8	32	16	16	16	16	8
P1033 SEC ID Nº: 56	32	32	4	16	16	16	16	32	8
P1037 SEC ID Nº: 60	32	32	>128	16	16	8	16	16	8
P1041	16	32	8	16	16	8	16	16	nd
P1081	16	16	8	16	8	8	8	nd	nd
P1087 SEC ID Nº: 63	16	16	2	16	8	4	8	8	4

nd – no determinado/no ensayado
 Clave de cepas bacterianas:
 Nº 82: *S. aureus*, aislado de quemadura
 Nº 84: MRSA
 Nº 86: *S. ep/cterm/cfe*ATCC12228
 Nº 88: *S. aureus*, aislado de esputo
 Nº 89: *S. aureus* ATCC29213
 Nº 92: *S. aureus*, resistente a trimetoprima
 Nº 93: *S. aureus*, aislado clínico
 Nº 13: *S. aureus* SAP0017, MRSA
 Nº 12: *S. aureus* ATCC25923

20

TABLA 10

Concentraciones Inhibidoras Mínimas (Mic) /mg/ml

SEC ID Nº:	Nº de P	Secuencia(N-C)	<i>P. aeruginosa</i> cepa H187	<i>S. aureus</i> cepa SAP 0017	<i>C. albicans</i> cepa 105
1	P0666	KFKWPW-NH ₂	32	16	32
2	P0665	ICWRWPW-NH ₂	128	64	64
3	P0736	KWKWFW-NH ₂	128	32-64	64-64
4	P0735	RWRWPW-NH ₂	>128	64	64-128
5*	P0633	RWRWRW-NH ₂	128	32	64
6	P0734	KFKWFW-NH ₂	128	64	64
7	P0737	RFKWFW-NH ₂	128	64-128	64-128 ¹
8*	P0634	RRRWWW-NH ₂	>128	>128	>128
9*	P0635	KFKFKF-NH ₂	128	128	128
10*	P0636	KYKYKY-NH ₂	>128	>128	>128
11*	P0637	FKFKFK-NH ₂	128	64	64

ES 2 378 242 T3

12*	P0661	FKFKPV-NH ₂	>128	>128	>128
13*	P0662	VKVKPV-NH ₂	>128	>128	>128
14*	P0663	FALKKL-NH ₂	>128	>128	>128
15*	P0664	RKTWPW-NH ₂	>128	>128	>128
16*	P0667	FKLAPW-NH ₂	>128	>128	>128
17*	P0668	KWKKPV-NH ₂	>128	>128	>128
18*	P0669	FRHFRW-NH ₂	>128	>128	>128
19*	P0670	VAKLAK-NH ₂	>128	>128	>128
20*	P0671	FAKLAK-NH ₂	>128	>128	>128
21*	P0672	KFKSFK-NH ₂	>128	>128	>128
22*	P0673	KWKKLA-NH ₂	>128	>128	>128
23*	P0699	KWKFKF-NH ₂	>128	>128	128
24*	P0700	KWKVFK-NH ₂	>128	>128	>128
25*	P0701	VAKKWK-NH ₂	>128	>128	>128
26*	P0671	FAKLAK-NH ₂	>128	>128	>128
27*	P0712	KLAKLL-NH ₂	>128	>128	>128
28*	P0713	LAKLAK-NH ₂	>128	>128	>128
29*	P0714	KPWKFK-NH ₂	>128	>128	>128
30*	P0715	KPVWPW-NH ₂	>128	>128	>128
31*	P0716	KPVKFK-NH ₂	>128	>128	>128
32*	P0717	KFVWPW-NH ₂	>128	>128	>128
33*	P0718	LLKWPW-NH ₂	>128	>128	>128
34*	P0719	FPWKFK-NH ₂	>128	>128	>128
35*	P0720	KPVWPF-NH ₂	>128	>128	>128
36*	P0721	KFFWPF-NH ₂	>128	>128	>128
37*	P0738	KAKFPF-NH ₂	>128	>128	>128
38*	P0739	KFKPFW-NH ₂	>128	>128	>128
39*	P1030	KUKWPW-NH ₂	128	64	32
40*	P1013	KFKLPW-NH ₂	>128	>128	>128
41	P1014	KFKWPW-COOH	>128	>128	>128
42	P1016	KWKWPW-COOH	>128	>128	>128
43	P1017	KWKWFW-COOH	>128	>128	>128
44	P1018	KFKWFW-COOH	>128	>128	>128
45*	P1020	FAKWPW-COOH	>128	>128	>128
46*	P1022	VAKWPW-COOH	>128	>128	>128
47	P1023	KWKWPW-NH ₂	>128	>128	>128
48*	P1024	FAKWPW-NH ₂	>128	>128	>128
49*	P1025	VAKWPW-NH ₂	>128	>128	>128
50	P1026	KWKFPF-NH ₂	>128	>128	>128
51*	P1027	KWKWGW-NH ₂	>128	>128	>128
52*	P1028	KLKWPW-NH ₂	>128	>128	>128
53*	P1029	KWKLAL-NH ₂	>128	>128	>128
54*	P1031	OCT-FALLKL-NH ₂	>128	>128	>128
55	P1032	OCT-KFKWPW-NH ₂	32	32	32
56	P1033	OCT-KWKWFW-NH ₂	32	4	16
57	P1034	OCT-KFKWFW-NH ₂	>128	>128	>128
58*	P1035	BALLKL-NH ₂	>128	>128	>128
59*	P1036	KBKWPW-NH ₂	>128	>128	>128
60*	P1037	KWKWBW-NH ₂	128	32	64
61*	P1038	KBKWBW-NH ₂	>128	128	64

62	P1085	KWKWUW-NH ₂	16	8	64
63	P1087	KWKWZW-NH ₂	8	8	64
64*	P1007	KWKWLPW-NH ₂	128	64	128
65*	P1008	KWKWPPW-NH ₂	>128	>128	>128
66*	P1109	KWKWPGW-NH ₂	>128	>128	>128
67*	P1011	KPKWPPW-NH ₂	>128	>128	>128
68*	P1012	KFKWPPW-NH ₂	>128	>128	>128
69	P1145	Hep-KFKWPW-NH ₂	128	128	64
70	P1146	Non-KFKWPW-NH ₂	32-64	16	16
71	P1147	Cap-KFKWPW-NH ₂	>128	128	128
72	P1148	Lau-KFKWPW-NH ₂	32	4-8	8
73	P1149	Pal-KFKWPW-NH ₂	>128	128	32
74	P1150	Ste-KFKWPW-NH ₂	>128	>128	128
75	P1151	Ole-KFKWPW-NH ₂	>128	128	128
76	P1258	Aca-KFKWPW-NH ₂	>128	>128	>128
77	P1273	Myr-KFKWPW-NH ₂	64-128	8-16	4-8
78	P1274	Pen-KFKWPW-NH ₂	128	32-64	8
79	P1275	Und-KFKWPW-NH ₂	8-16	4	4-8
80	P1276	Tri-KFKWPW-NH ₂	32	2-4	4
81	P1205	Oct-kflcwpw-NH ₂	32	32	32
82	P1206	kfkwpw-NH ₂	>128	>128	>128
83	P1343	Lau-kfkwpw-NH ₂	4	2	2
84	P1304	Oct-KFKWPw-NH ₂	128	64	64
85	P1345	Deca-KFKWPW-NH ₂	ND	ND	ND

*indica hexapéptidos no XBBOB; ND – no determinado/no ensayado

5 SEC ID N°: 5 (RWRWRW) y SEC ID N°: 8 (RRRWWW) son hexapéptidos no XBBOB descritos por Strom *et al.* (2003). Ambos de estos hexapéptidos mostraron menos actividad que los de la familia de hexapéptidos XBBOB de la presente invención, tales como SEC ID N°: 1 (P0666). Se cree que la actividad mejorada de la familia de hexapéptidos XBBOB se debe, al menos en parte, a ciertos atributos estructurales beneficiosos para la actividad antimicrobiana. Los hexapéptidos que no se ajustan a la fórmula XBBOB, muestran poca o ninguna actividad antimicrobiana. Para actividad óptima dentro de la familia de XBBOB, los inventores han determinado a partir de estudios de estructura y actividad, que se prefieren una F en posición dos y una P en posición cinco dentro de este modelo. Los inventores han demostrado que la estructura de F en la posición dos puede ser importante sustituyendo con un aminoácido similar tal como W, que prácticamente eliminó la actividad, véanse los datos de MIC en la Tabla 9 para SEC ID N°: 47, (P1023). La sustitución de un hexapéptido XBBOB, que tiene una F en la posición dos, con un aminoácido no natural (tal como 1-naftil-L-alanina (indicado en este documento como "U"), es decir 1-Nal, que está más cercano en estructura a F que W), da como resultado actividad intermedia, (véanse datos en la Tabla 10 para SEC ID N°: 39 (P1030)).

15 **E. Unión Del Componente De Pared Celular Bacteriana Ácido Lipoteicoico**

20 El ácido lipoteicoico (LTA) es un componente de pared celular habitual de bacterias gram positivas incluyendo organismos tales como *S. aureus* y *P. acnes*. La liberación de LTA durante la infección puede conducir a la liberación de mediadores de la respuesta inflamatoria del hospedador que a su vez puede dar como resultado sepsis (choque séptico). Por ejemplo, cuando se inyecta a animales, LTA puede inducir muchos de los elementos

característicos del choque séptico, incluyendo producción de citocinas, leucocitopenia, insuficiencia circulatoria, síndrome de disfunción de órganos múltiples y mortalidad. Scott *et al.* (Infect. And Immun. 67: 6445-6453 (1999)) demostraron que la unión de LTA por péptidos catiónicos (26-29 restos de longitud) puede reducir la capacidad de LTA para transformar células en una respuesta inflamatoria. Como se demuestra en la Figura 7, los hexapéptidos pueden dividirse en dos grupos: (1) los péptidos que no se unen a LTA (SEC ID N°: 55) y (2) los péptidos que se unen a LTA (SEC ID N°: 72). Usando el ensayo de unión de LTA descrito por Scott *et al.* (Infect. And Immun. 67: 6445-6453 (1999)) puede demostrarse (Figura 7) que SEC ID N°: 72 se une a LTA en el mismo grado que un péptido anfipático alfa-helicoidal altamente cargado típico tal como P50 (VAKKLAKLAKLAKLAL-NH₂, SEC ID N°: 88)). Esto es inesperado para un péptido tan corto y proporciona valor terapéutico potencial para ciertos hexapéptidos. Por el contrario SEC ID N°: 83 y SEC ID N°: 55 no se unen a LTA (Figura 7).

F. Actividad Contra *P. Acnes*

Una aplicación muy prometedora para péptidos bioactivos cortos es para indicaciones dermatológicas tales como acné. Para determinar si la actividad de los lipohexapéptidos era uniforme a lo largo de una serie de cepas de *P. acnes* y si esa actividad era comparable con los péptidos antimicrobianos más largos tradicionales, se ensayaron diez cepas (cepas ATCC) del organismo contra SEC ID N°: 72, SEC ID N°: 55 y SEC ID N°: 81 y se compararon con P50. Los resultados (Tabla 11) demostraron equivalencia y en algunos caso mejora frente a los péptidos altamente cargados más largos.

TABLE 11

Actividad Contra Panel Extendido De *P. Acnes*

Péptido	ATCC 6921	ATCC 6922	ATCC 6923	ATCC 11828	ATCC 12930	ATCC 25746	ATCC 29399	ATCC 33179	ATCC 49929	ATCC 51277
P50	4	8	16	4	2	0,125	8	16	0,25	16
SEC ID N°: 72	ND	ND	1	1	ND	ND	1	2	1	ND
SEC ID N°: 55	4	4	8	8	8	8	1	16	16	0,125
SEC ID N°: 81	4	4	8	8	8	2	0,25	8	16	0,125

En referencia a la Figura 8, la lipidación no solamente mejora la actividad de hexapéptidos en suero sino que además mejora la actividad en un ambiente lipídico que es un mimético del ambiente de lesión de acné humana. La secreción de la glándula sebácea humana, también llamada sebo, contiene escualeno, colesterol, ésteres de colesterol, ésteres de ceras, y triglicéridos en los que una población folicular grande de *P. acnes* parece aprovechar este ambiente e hidroliza ciertos lípidos sebáceos. El aumento prepuberal y puberal de la secreción de sebo está casi con toda seguridad implicado en la patogénesis de acné adolescente. La actividad de SEC ID N°: 55 se estudió en este ambiente en comparación con P64, un péptido antimicrobiano catiónico tradicional. Debido al hecho de que la mayoría de los lípidos son insolubles en agua se usaron liposomas compuestos de fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol y colesterol en la relación molar de 7:2:1 en solución salina y se evaluó la cinética de muerte del péptido también en presencia o ausencia de suero. La bacteria usada fue MRSA de *S. aureus* y en ambas situaciones los péptidos se ensayaron a concentración de 0,5 mg/ml y se mostró que eran eficaces (Figura 8).

III. Estructura y Consideraciones de Actividad Antifúngica

A. Hexapéptidos XBXBOB

Los hexapéptidos que muestran actividad antifúngica se adhieren a la fórmula anterior en la que X está cargado (hidrófilo), O puede ser una serie de restos, pero puede preferentemente ser una naftilalanina, un esto alifático (tal como prolina) o un resto aromático (tal como fenilalanina) y B es un resto hidrófobo. Adicionalmente, parece que la amidación en el extremo C terminal mejora la actividad y en algunos casos se requiere para actividad. Los ejemplos representativos de tales hexapéptidos son como sigue:

- SEC ID N°: 1: KFKWPW *** más activo
- SEC ID N°: 2: KWRWPW ** activo
- SEC ID N°: 3: KWKWFW* activo

Resulta evidente a partir de la relación de actividad con la estructura (**SAR**) que los restos cargados positivamente en las posiciones 1 y 3 se requieren para actividad antimicrobiana deseada. También resulta evidente que la lisina (K) puede ser mejor que la arginina (R) en la posición 1 y opcionalmente 3. Otras combinaciones de restos no proporcionan el mismo perfil de actividad que se describe en más detalle a continuación.

A partir de los datos presentados en la Tabla 10 anterior, puede verse que la mayoría de los hexapéptidos ensayados muestran poca o ninguna actividad antimicrobiana. Sin embargo, todos los hexapéptidos de la estructura general XB_XBOB muestran algún nivel deseado de actividad antimicrobiana. Generalmente, dentro de la familia XB_XBOB de hexapéptidos, existen dos subgrupos que muestran actividad deseada.

5 Resulta interesante que ciertos hexapéptidos son especialmente activos y se consideran parte del subgrupo 1 de la familia general XB_XBOB. Un hexapéptido especialmente activo representativo es KFKWPW-NH₂ (SEC ID N°: 1). Resulta importante que SEC ID N°: 1 también es eficaz y activo en suero, como se muestra en la Tabla 12 posteriormente. Para hexapéptidos dentro del subgrupo 1, la actividad se reduce cuando la posición 2 es W, por ejemplo SEC ID N°: 47 (1023), cuando la posición cinco es F; por ejemplo SEC ID N°: 6 (0734), o cuando la posición dos está fluorada, por ejemplo SEC ID N°: 59; o si la posición es W mientras que las posiciones cuatro y seis se cambian a F, por ejemplo SEC ID N°: 50 (1026). Debería observarse que la letra "J" dentro de la lista de secuencias indica una fenilalanina fluorada.

15 Resulta interesante que añadir un lípido a un miembro representativo del subgrupo 1, tal como SEC ID N°: 1, no afecta a la MIC pero aumenta significativamente la actividad en ambientes biológicos tales como suero, véase por ejemplo SEC ID N°: 55 (1032) y Tabla 12. Todos los análogos de hexapéptidos del subgrupo 1 no XB_XBOB están principalmente inactivos (véase Tabla 12 posteriormente para ejemplos específicos).

20 Otro subgrupo de la familia del hexapéptido XB_XBOB, designado subgrupo 2, es ligeramente menos activo, pero muestra otros rasgos deseables; un miembro representativo de este subgrupo 2 es SEC ID N°: 3 (KW_KFW-NH₂; (0736)). La actividad de miembros del subgrupo 2 se aumenta mediante el aumento de la naturaleza aromática del resto 5 por ejemplo, SEC ID N°: 62 y 63 se han modificado mediante la adición de 1-Nal-OH (indicado como "U" en la presente lista de secuencias) (1-naftilalanina) o 2-Nal-OH (indicado como "Z" en la presente lista de secuencias) (2-naftilalanina), véase Tabla 10 para actividad. La abreviatura Nal se usa en este documento para indicar 1-Nal-OH o 2-Nal-OH.

30 Además, se adquiere actividad moderada en algunos casos lipidando miembros hexapeptídicos del subgrupo 2. Sin embargo, a diferencia de SEC ID N°: 55 (1032), SEC ID N°: 56 (1033) no rinde bien en ambientes biológicos.

35 En hexapéptidos del subgrupo 2 la actividad se reduce generalmente por un W en la posición 5, una F en la posición 2, fluoración de F en la posición 5 y cualquier alteración que tome la secuencia fuera de la fórmula XB_XBOB. Si la posición 5 es un resto cargado, entonces en la mayoría de los casos el péptido está relativamente inactivo, por ejemplo SEC ID N°: 9 (KFKFKF-NH₂), SEC ID N°: 10 (KYKYKY-NH₂) y SEC ID N°: 23 (KWKFKF-NH₂). Una excepción a esta afirmación es RWRWRW (SEC ID N°: 5) pero este péptido cuando se compara con las actividades de los péptidos más activos tales como SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 62, SEC ID N°: 63, muestra actividad muy baja.

40 Finalmente si un hexapéptido XB_XBOB no está amidado, entonces está inactivo, por ejemplo SEC ID N°: 41-46, en la Tabla 10.

TABLA 12A-B

Actividad De Péptidos Cortos y Versión Lipidada en Tampón Fosfato-Suero de Oveja 10 % Frente a MRSA

12A

	P0666-suero-1 mg/ml	P0666-suero-2 mg/ml	P0666-tampón-2 mg/ml	P1032-suero-0,5 mg/ml	P1032-tampón-1 mg/ml
0	6 ⁸	5 ⁷	5 ⁷	6 ⁸	5 ⁷
30 minutos	102300	9800	99200	10	100
1 hora	99600	3200	62800	10	100
2 horas	15110	630	99200	10	10
3 horas	12080	250	99200	10	10
4 horas	5020	70	99200	10	10
5 horas	2570	50	99200	10	10

12B

	P1032-suero-1 mg/ml	P1032-suero-2 mg/ml	Control de Suero	P50-0,5 mg/ml
0		5 ⁷	6 ⁸	6 ⁸
30 minutos		3900	1000000	6 ⁸
1 hora		1100	1000000	6 ⁸

2 horas	100	1000000	6 ⁸	13340
3 horas	30	1000000	6 ⁸	12410
4 horas	20	1000000	6 ⁸	13920
5 horas	60	1000000	6 ⁸	11970

Aunque los hexapéptidos XBBOB generalmente son activos contra una serie de dianas microbianas, no todos los hexapéptidos son igualmente eficaces contra todos los microorganismos. Se observa que SEC ID N°: 32-33 tuvieron baja actividad contra *P. aeruginosa*, *C. albicans*, y *S. aureus* como se muestra en las Tablas 10 y 13.

5 Resulta interesante que la adición de un lípido a SEC ID N°: 1 (KFKWPW-NH₂), que forma SEC ID N°: 55 (Oct-KFKWPW-NH₂) potenció la actividad del hexapéptido en suero, como se muestra en las Figuras 5-6 y Tablas 9 y 12. Adicionalmente, SEC ID N°: 55 es eficaz contra una amplia serie de aislados clínicos resistentes a azol tales como *C. albicans*, y *S. aureus*, como se muestra en la Tabla 9, Figuras 2-3 y Figuras 5-6. Resulta interesante que SEC ID
10 N°: 55 también está activa en ambientes fisiológicos tales como estimulante vaginal y en suero, como se muestra en las Figuras 2-3.

B. Investigación de la Estructura De SEC ID N°: 1 (P0666)

15 Se registraron los espectros de CD, mostrados en la Figura 1, en un espectropolarímetro modelo J-810 (Jasco) usando una celda de cuarzo con una longitud de camino de 1 mm. Los espectros se midieron a temperatura ambiente entre 190 nm y 250 nm a una velocidad de exploración de 50 nm/minuto y un total de 10 exploraciones por muestra. Los espectros se registraron a una concentración de péptidos de 100 µg/ml en tres ambientes: tampón Tris 10 mM, pH 7,5; TFE en agua 50 %; y en liposomas de POPC:POPG (1:1 p:p, 2 mM). En todos los casos, los
20 espectros de péptidos se obtuvieron restando los espectros de los componentes de la solución en ausencia del péptido.

SEC ID N°: 1 (P0666) parece experimentar un cambio significativo en la estructura tras la interacción con un ambiente liposomal, como se ilustra en la Figura 1. Esto se diferencia del cambio significativo pequeño observado en el tampón que contiene TFE 50 %. Una estructura específica inducida en un péptido relativamente corto probablemente tenga relación significativa con la actividad.

Se han obtenidos resultados interesantes cuando se sustituye naftilalanina, un mimético de alanina en algunos de los hexapéptidos. Por ejemplo, la sustitución de la F en SEC ID N°: 1 con 1-Nal-OH (indicado como "U" en las presentes listas de secuencias) (1-naftilalanina) reduce la actividad de SEC ID N°: 1. De forma similar, la sustitución de la F en SEC ID N°: 1 con 2-Nal-OH (indicado como "Z" en las presentes listas de secuencias, es el estereoisómero 2-naftilalanina) también reduce la actividad de SEC ID N°: 1. Sin embargo, la sustitución de la F en SEC ID N°: 3 con 1-Nal-OH (naftilalanina) da como resultado actividad potenciada y un nuevo hexapéptido SEC ID N°: 62 (KWKWUW-NH₂) en el que la U es 1-Nal-OH. También se obtuvieron resultados similares sustituyendo la F en SEC ID N°: 3 con 2-Nal-OH (un isómero diferente de naftilalanina), creando SEC ID N°: 63 (KWKWZW-NH₂), en la que Z es 2-Nal-OH. Se ha planteado la hipótesis de que las sustituciones de 1-Nal-OH y 2-Nal-OH añaden físicamente volumen al hexapéptido en forma de un anillo aromático fusionado extra, que también añade hidrofobicidad y aromaticidad a las estructuras, cuando se compara con la fenilalanina sustituida. Por lo tanto, parece que el volumen y/o hidrofobicidad son importantes en la posición 5 en SEC ID N°: 3 y las SEC ID N°: 62 y 63
40 sustituidas, mientras que tiene un efecto adverso en la posición 2 de SEC ID N°: 1.

La estructura de solución del péptido central KFKWPW-NH₂ (SEC ID N°: 1) se determinó en micelas DPC por ¹H-NMR. La estructura con la RMSD (desviación de valor cuadrático medio) menor con respecto a la media se muestra en la Figura 9 representándose la carga en azul y la hidrofobicidad en blanco. Debe observarse que el péptido
45 asume una estructura que consiste en una parte hidrófoba bien ordenada y una región cargada menos ordenada. Esta anfipatía puede tener relación significativa con la actividad del péptido y el mecanismo de acción. La prolina claramente desempeña un papel crítico en el mantenimiento de la estructura en el dominio hidrófobo.

En el proceso de desarrollar y estudiar los hexapéptidos de la presente invención, se identificaron muchos ejemplos de hexapéptidos no XBBOB, se evaluaron y se descubrió que mostraban poca o ninguna actividad antimicrobiana; estos hexapéptidos se consideraron generalmente "no activos". Se muestran ejemplos representativos de los hexapéptidos no activos no XBBOB en la Tabla 13.

TABLA 13

Hexapéptidos No XBBOB que Muestran Actividad Antimicrobiana Baja o Ausente			
Péptido (SEC ID N°:)	<i>E. coli</i> UB1005	<i>S. typhimurium</i> 14028S	<i>P. aeruginosa</i> H374
SEC ID N°: 12	>128	>128	>128
SEC ID N°: 13	>128	>128	>128
SEC ID N°: 14	>128	>128	>128
SEC ID N°: 15	>128	>128	>128
SEC ID N°: 16	>128	>128	>128
SEC ID N°: 17	>128	>128	>128
SEC ID N°: 18	>128	>128	>128
SEC ID N°: 19	>128	>128	>128
SEC ID N°: 20	>128	>128	>128
SEC ID N°: 21	>128	>128	>128
SEC ID N°: 22	>128	>128	>128
SEC ID N°: 23	>128	>128	>128
SEC ID N°: 24	>128	>128	>128
SEC ID N°: 25	>128	>128	>128
SEC ID N°: 26	>128	>128	>128
SEC ID N°: 27	>128	>128	>128
SEC ID N°: 28	>128	>128	>128
SEC ID N°: 29	>128	>128	>128
SEC ID N°: 30	>128	>128	>128
SEC ID N°: 31	>128	>128	>128
SEC ID N°: 32	>128	>128	>128
SEC ID N°: 33	>128	>128	>128
SEC ID N°: 34	>128	>128	>128
SEC ID N°: 35	>128	>128	>128
SEC ID N°: 36	>128	>128	>128

C. Relación de la Actividad con la Estructura de Acilación

- 5 Se ha demostrado previamente que la acilación de péptidos antimicrobianos puede mejorar su actividad. Esa mejora de la actividad depende del péptido central, longitud del lípido unido y en algunos casos el tipo de lípido unido como se describe por Radzishovsky *et al.* (Antimicrob. Agents Chemother. 49: 2412-2420 (2005)). Al tomar el péptido central SEC ID N°: 1 los inventores unieron una serie de lípidos de 6 carbonos de longitud a 18 incluyendo el ácido aminocaprílico de grupo aminoacilo. Se realizó unión por métodos de química de péptidos convencional. A partir de este trabajo se demostró que la longitud óptima de un lípido unido, en relación con actividad antimicrobiana está entre 8 y 14 carbonos (Tabla 14). Debería observarse que la adición de un grupo de aminoacilo tal como ácido aminocaprílico en el caso de SEC ID N°: 76 no mejoró la actividad a diferencia de péptidos modificados de esta manera descritos por Radzishovsky *et al.* (Antimicrob. Agents Chemother. 49: 2412-2420 (2005)).

15

TABLA 14

SEC ID	Modificación de Lípido	Longitud de Lípido	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	MRSA	<i>C. albicans</i>
Nº: 1	No lipidado	0	32	Nd	16	32
Nº: 71	Cap-KFKWPW-NH2	6 carbonos	>128	128	128	128
Nº: 69	Hep-KFKWPW-NH2	7 carbonos	128	128	128	64
Nº: 55	Oct- KFKWPW-NH2	8 carbonos	32	32	16	32
Nº: 70	Non-KFKWPW-NH2	9 carbonos	32-64	16	16	16
Nº: 79	Und-KFKWPW-NH2	11 carbonos	8-16	8-16	4	4-8
Nº: 72	Lau-KFKWPW-NH2	12 carbonos	32	32	4-8	8
Nº: 80	Tri- KFKWPW-NH2	13 carbonos	32	32-64	2-4	4
Nº: 77	Myr-KFKWPW-NH2	14 carbonos	64-128	>128	8-16	4-8
Nº: 78	Pen- KFKWPW-NH2	15 carbonos	128	>128	32-64	8
Nº: 73	Pal- KFKWPW-NH2	16 carbonos	>128	>128	128	32
Nº: 75	Ole- KFKWPW-NH2	17 carbonos	>128	>128	128	128
Nº: 74	Ste- KFKWPW-NH2	18 carbonos	>128	>128	>128	128

Debería observarse que además de los datos de MIC, los lipohexapéptidos también pueden distinguirse por su capacidad para matar bacterias en presencia de constituyentes biológicos tales como suero. En estas circunstancias puede verse que tanto SEC ID Nº: 79 (P 1275) como SEC ID Nº: 83 (P1343) rinden muy bien (Figura 10). Esta actividad, un indicador de potencial terapéutico, no es evidente a partir de los datos de MIC solamente.

D. Mecanismo de Acción de Lipohexapéptidos

El mecanismo tradicional de acción para péptidos antimicrobianos ha sido su capacidad para romper membranas celulares. La capacidad de los hexapéptidos y lipohexapéptidos para interaccionar con membranas lipídicas compuestas de lípidos que se asemejan a células bacterianas o humanas se evaluó usando los péptidos representativos SEC ID Nº: 1 (P0666) y SEC ID Nº: 55 (P1032) como representantes. En estos ensayos los péptidos antimicrobianos convencionales (15-40 aminoácidos de longitud) confieren muerte mediante la rotura de bicapas de membrana que provoca filtración citoplasmática dando como resultado muerte celular. Para determinar si el hexapéptido P0666 y su análogo lipidado P1032 siguen un mecanismo similar de acción, se sometieron a un ensayo de reactivación de fluorescencia de DiSC35. Ensayo de reactivación de fluorescencia de DiSC35. DiSC35 es un colorante sensible a potencial de membrana que se capta por células energizadas de acuerdo con el gradiente de potencial de membrana y se concentra en la membrana celular lo que conduce a interrupción de la fluorescencia del colorante. Cuando el potencial de membrana se interrumpe el colorante se libera y ya no está inactivado y por lo tanto aumenta la fluorescencia. En este caso se usaron células bacterianas *S. aureus* vivas como el organismo diana. Se midió la capacidad de cada péptido para despolarizar el potencial de membrana citoplasmático dando como resultado pérdida de DiSC₃₅ de células al tampón y un aumento correspondiente de la fluorescencia. A diferencia de P50 (VAKKLA-LAKEXAKLAL-NH₂, SEC ID Nº: 88), un péptido de rotura de membrana tradicional, ni P0666 ni P 1032 fue capaz de provocar permeabilización de la membrana celular de *S. aureus*.

La falta de rotura de membrana observada en *S. aureus* se correlaciona bien con datos generados de ensayos de liposomas. Los liposomas se construyeron para imitar la composición lipídica de células bacterianas (POPC:POPG, 3:1) o células eucariotas (POPC:colesterol, 3:1). Ni el hexapéptido ni el lipohexapéptido a 4 µg/ml provocaron que el colorante (calceína) se liberara de los liposomas (POPC:POPG, 3:1) a diferencia de P50 a 2 µg/ml. Ninguno de los hexapéptidos provocó cantidad significativa de liberación de calceína incluso a 128 µg/ml de los liposomas (POPC:colesterol, 3:1).

E. Aparición de Resistencia

Con un nuevo mecanismo de acción la aparición de resistencia debería ser siempre una preocupación. Se transfirieron de forma seriada MRSA (cepa SAP001 7) y *S. aureus* (cepa ATCC 21923) diariamente en presencia de concentraciones de media MIC de P 1032 y P1032d. Después de 30 pases en serie los cambios de MIC estaban dentro de dos diluciones 2 de la MIC de partida. Se demostró que dicha resistencia era una adaptación transitoria, puesto que un pase sencillo de cada cepa resistente en ausencia de péptido dio como resultado reversión a MIC original.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Debería apreciarse por los expertos en la materia que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por los INVENTORES que actúan bien en la práctica de la invención y por lo tanto puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deberían, a la luz de la presente descripción, apreciar que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y aún obtener un resultado similar o parecido sin separarse del alcance de la invención.

F. Evaluación de Concentración Inhibidora Mínima (MIC) de Hexapéptidos Antimicrobianos contra Dermatofitos *Trychophyton rubrum* y *Trychophyton mentagrophytes*

Para comparar la actividad de diversos péptidos antimicrobianos, incluyendo hexapéptido SEC ID N°: 1 (P0666), se determinaron las MIC contra los dermatofitos *Trychophyton rubrum* y *Trychophyton mentagrophytes*. La concentración de muestras investigadas fueron: 2000, 1000, 500, 250 y 125 µg/ml, respectivamente. El medio usado fue medio de Sabouraud modificado sin agar. Para un medio de Sabouraud modificado de 100 ml: se mezclaron 3 g de caldo de dextrosa de Sabouraud (Difco) en 100 ml de agua desionizada. El pH se ajustó a 7,0 con NaOH 0,1 N. La solución se esterilizó por autoclave durante treinta minutos. Se vertieron 940 µl de medio a tubos de ensayo de 20 ml estériles con tapones de plástico y se permitió que se enfriara.

Se añadieron 50 µl de solución salina a cada tubo de ensayo de 20 ml para obtener la concentración requerida. Se compuso un tubo de control de 50 µl de solución salina sin muestra. Para los experimentos de MIC, se añadieron 10 µl de organismo suspendido en solución salina a cada tubo de ensayo de 20 ml y se agitó en vórtex suavemente. Cada uno de los tubos de ensayo se cubrió con parafilm y se mantuvo en un agitador a 27 °C a una velocidad de aproximadamente 100 rpm.

El crecimiento/inhibición del organismo se observó diariamente. El crecimiento de los organismos se observó el quinto y décimo día y se muestra en la Tabla 12. El experimento de MIC se repitió a 125 ppm, puesto que el crecimiento de la mayoría de los organismos se inhibió el quinto día a 250 ppm, la concentración inhibidora mínima (MIC₁₀₀) para compuestos F1 a F10 contra los hongos *Trychophyton rubrum* y *Trychophyton mentagrophytes* a 10 días.

TABLA 15

MIC109 (µg/ml)		Péptido
<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	
1000	250	P153 FALKALKKLLKALKKAL-NH ₂ SEC ID N°: 86
500	500	P55 FAKLLAKALKKLL-NH ₂ SEC ID N°: 87
500	500	P50 VAKKLAKLAKLAKLAL-NH ₂ SEC ID N°: 88
500	500	P43 FAKLLAKLAKKLL-NH ₂ SEC ID N°: 89
1000	500	P64 FAKALKALLKALKAL-NH ₂ SEC ID N°: 90
250	250	P0666 (SEC ID N°: 1) KFKWPW-NH ₂

Se descubrió que SEC ID N°: 1 (P0666 KFKWPW-NH₂) era la más activa contra *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*. Hubo solamente un ligero crecimiento a 125 ppm el día diez.

G. Ensayos de toxicidad

Para evaluar los efectos tóxicos potenciales de la administración sistémica de los hexapéptidos de la presente invención, se introdujo una serie de péptidos que mostraban actividad antifúngica en el sistema sanguíneo de un ratón por inyección en la vena de la cola a una dosificación de 20 mg/kg. Como se ha visto a partir de los datos posteriores en la Tabla 13, SEC ID N°: 1 (Referencia P0666; KFKWPW-NH₂), a diferencia de los otros péptidos ensayados, no indujo toxicidad sistémica.

TABLA 16

SEC ID N° (nombre de ref)	Dosis de Compuesto	Disolvente	Vía	Resultado
SEC ID N°: (P0666) KFKWPW-NH2	20 mg/kg	Agua	IV	Sin efectos adversos
SEC ID N°: 55 (P01032) Oct- KFKWPW-NH2	80 mg/kg	Solución Salina	IV	Sin efectos adversos
SEC ID N°: 86(P153) FALKALKKLLKALKKAL-N H2	20 mg/kg	Agua	IV	Actividad motora reducida
SEC ID N°: 91 (P650) FAKALLKALLKALK-NH2	20 mg/kg	ringer	IV	1/3 muertos, problemas clínicos
SEC ID N°: 92 (P146) KYKALKKLLAKLL-NH2	20 mg/kg	ringer	IV	3/3 muertos

H. Estudios de citotoxicidad

5 1. Actividad *in vivo* de P01032

Se ensayaron muestras de SEC ID N°: 55 (S35-2) a una concentración de 0,1 mg/ml y a 0,5 mg/ml con respecto a citotoxicidad y se descubrió que no eran citotóxicos en ensayos de 24 y 48 horas, cuando se evaluaron confluencia celular, crenación, vacuolización e histólisis.

10 Estudios previos han documentado que el péptido antimicrobiano P-50 (un 17-mer) proporciona beneficio profiláctico en la reducción de contaminación bacteriana por *S. aureus* de la superficie de heridas de grosor parcial. SEC ID N°: 55 (P-1032) también ha demostrado actividad antimicrobiana similar *in vitro*.

15 Se realizó un estudio para evaluar la actividad antimicrobiana *in vivo* de SEC ID N°: 55 (P-1032) en comparación con P-50 con los siguientes parámetros. Todos los agentes de ensayo se proporcionaron por Helix BioMedix, Inc. En este estudio se evaluaron dos grupos de tratamiento:

- 20 I. péptido P-50 1 % contenido en una solución de HEC 4 %; y
II. péptido de SEC ID N°: 55 (P-1032) 1 % contenido en un gel de HEC 4 %.

25 Ambos agentes de ensayo se transfirieron a jeringas de 3 ml usando técnica aséptica. Durante el estudio se distribuyeron 0,5 ml del agente apropiado a cada herida. Esta cantidad cubrió la superficie de la herida completa con una capa fina de solución o gel. Las bacterias de ensayo fueron *S. aureus* (ATCC 12600). Los resultados de estos estudios se muestran en las Tablas 14-16.

30 Se anestesiaron doce ratas hembra Sprague-Dawley (250-280 g) y se prepararon para cirugía. En la espalda de cada rata se creó una herida cutánea de grosor parcial de 2,54 cm x 2,54 cm con un Dermatomo Brown. Cada herida se contaminó con $3,1 \times 10^5$ / 0,05 ml de *S. aureus* (LOG 5,49). Se permitió que las heridas se secaran durante 30 minutos antes de que los animales se dividieran de forma equitativa en cuatro grupos de tratamiento. Las heridas en cada grupo recibieron 0,5 ml del agente de ensayo apropiado. Cada herida se cubrió con un apósito de película transparente, se cubrió con una almohadilla de gasa y se aseguró con cinta adhesiva.

35 Veinticuatro horas después del primer tratamiento se anestesió a los animales y se retiraron sus vendajes. La superficie de la herida se limpió suavemente con gasa húmeda y se aplicó una nueva alícuota (0,5 ml) de agente tópico. Se volvió a vendar a los animales como se ha descrito previamente.

40 Se realizó un cambio de apósito y nueva aplicación del agente tópico de nuevo a las 48 horas. Por lo tanto cada animal recibió 3 tratamientos tópicos.

45 Setenta y dos horas después de la cirugía las ratas se sacrificaron y se obtuvo una biopsia de punzón de 8 mm de grosor completo del centro de la herida. La biopsia se situó en un tubo pesado previamente que contenía 5 ml de solución salina estéril y pesado de nuevo para determinar el peso de la muestra. Usando una picadora de tejido la biopsia se homogeneizó y se diluyó en series y se sembró en placas para determinar el número de bacterias por gramo de tejido.

Dieciocho horas antes de la cirugía, se transfirió una colonia sencilla de *S. aureus* por un asa estéril de una placa de reserva a caldo de soja de tripticasa. El caldo de cultivo se agitó en un baño de agua de 37 °C durante 18 horas antes de recoger las bacterias por centrifugación a 3200 rpm durante 10 minutos. El sedimento bacteriano se lavó

dos veces en una solución salina 0,9 % estéril y se recogió de nuevo en un sedimento por centrifugación. El sedimento se resuspendió en 2 ml de solución salina estéril y se mezcló minuciosamente para producir una solución madre. Se preparó después una serie de diluciones 1:10, variando de 10^{-1} a 10^{-8} a partir de la solución madre. Se usaron técnicas de siembra en placas convencional para cuantificar el número de bacterias en la solución madre y posteriormente cada dilución 1:10. Se calculó que el inóculo usado era $3,1 \times 10^5$ UFC/0,05 ml (LOG 5,49). El tubo del inóculo se mantuvo en hielo y se agitó suavemente y se extrajo en una punta de pipeta estéril inmediatamente antes de su uso.

Se usaron doce ratas hembra Sprague-Dawley (250-280 g). Se anestesiaron por vía intramuscular con una mezcla de ketamina (50 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg). El vello dorsal se cortó con esquiladora eléctrica y la piel se depiló con Nair. Se marcó un molde de 2,54 cm x 2,54 cm en el centro de la espalda usando un marcador resistente a alcohol. La piel se preparó después con limpiador de yodóforo, seguido de un alcohol isopropílico 70 %, solución de yodóforo y alcohol 70 %. Se pasó Shur-Cleans sobre el área de injerto y dermatoma para lubricación. Después se retiró un injerto de piel de grosor parcial convencional (grosor de 0,04 cm) en el área marcada de 2,54 cm x 2,54 cm, usando un Dermatomo de Brown de aire comprimido.

Después de que se consiguiera la hemostasis con gasa seca, se usó un pipeteador Eppendorf para aplicar exactamente 0,05 ml del inóculo a cada herida. Se permitió que las heridas se secaran durante 30 minutos antes de que cada herida recibiera 0,5 ml de agente tópico. Cada herida se cubrió después con un apósito transparente (Teqaderm, 3M, St. Paul, MN). Se vendó a los animales con gasa estéril y 2 envolturas en circunferencia de cinta de tela de 7,62 cm. Se les proporcionó analgesia de Buprenorfina y se recuperaron de la anestesia y se devolvieron al alojamiento y los cuidados convencionales.

A las 24 y 48 horas después de la cirugía, se volvió a anestesiarse a todas las ratas por inhalación de isoflurano y sus vendas se retiraron. Los apósitos se retiraron cuidadosamente y se retiró por transferencia cualquier fluido presente con gasa estéril. Se aplicó después una alícuota de 0,5 ml del gel de tratamiento designado uniformemente a la superficie de herida completa y los animales se vendaron de nuevo y se recuperaron igual que en cirugía.

2. Análisis de Apariencia de las Heridas

Se observó cada herida en cada cambio de apósito y se evaluó la superficie de herida y la reacción del tejido. Hubo 5 parámetros de estado de herida que se comprobaron:

- i. Seguridad de Película de la Herida - ¿Estaba la película adhesiva usada para cubrir la herida aún completamente adherente a la piel alrededor de la herida?
- ii. Superficie de la Herida - ¿Cuál era la apariencia visual exacta de la superficie de la herida?
- iii. Cantidad de Exudado - ¿Cuánto exudado estaba atrapado bajo la película? En muchos casos, el exudado acumulado provoca que la película pierda adherencia y los exudados escapen.
- iv. Gravedad de la Reacción Tisular - Una clasificación subjetiva del alcance de la reacción del tejido en una escala de 1 (mínima), 2 (moderada), 3 (extensiva).
- v. % de Tejido Implicado - En algunas situaciones, la superficie de la herida contenía tejido quebradizo desnaturalizado que podría retirarse con presión aplicada a la gasa. Este ensayo se usó para diferenciar mejor tejido desnaturalizado de exudados viscosos.

3. Evaluación de Conteos Bacterianos

A las 72 horas después de la cirugía, las ratas se sacrificaron, sus apósitos se retiraron y se tomó una biopsia de punzón de grosor completo de 8 mm del centro de cada herida y se situó en un tubo pesado previamente que contenía 5 ml de solución salina estéril. Los tubos que contenían las muestras se volvieron a pesar y se determinaron los pesos de la muestra. Las muestras se homogeneizaron y después se diluyeron en serie 4 veces y se sembraron en agar de soja de tripticasa. Las placas se incubaron durante una noche y las colonias se contaron, y los contenidos bacterianos por gramo de tejido se calcularon y convirtieron a logaritmo en base 10. Se calculó la media y la desviación típica de cada grupo y se usó un ANOVA (Análisis de Varianza) para determinar cualquier diferencia significativa entre los tres grupos de tratamiento.

4. Complicaciones Postoperatorias

Todos los animales sobrevivieron al estudio sin complicaciones.

No se detectaron bacterias en 11 de 12 heridas tratadas (Tabla 17-18). En una herida tratada con P-50 1 %, se detectaron varias *S. aureus* (Tabla 18).

5. Reacción Tisular

En general, la reacción tisular al péptido SEC ID N°: 55 (P-1032) fue suave, mientras que la del P-50 fue de suave a moderada (como se muestra en los resultados de la Tabla 19).

6. Sumario de los Resultados

SEC ID N°: 55 (P-1032) 1 % en HEC 4 % parece proporcionar el mismo nivel de acción antimicrobiana contra *S. aureus* (ATCC 12600) que P-50 1 % (Tablas 17-18).

5

TABLA 17

INÓCULO LOG = 5,49 <i>S. aureus</i> (ATCC 12600)			
I. P-50 1 % en HEC 4 %			
N° de An	LOG/cm²	peso tisular (g)	LOG/g
1	1,70	0,1886	2,42
3	1,70	0,1821	2,44
5	1,70	0,1694	2,47
7	1,70	0,2000	2,40
9	2,81	0,1428	3,66
11	1,70	0,1905	2,42
MEDIA	1,89	0,1789	2,64
d.t.	0,45	0,0204	0,50

TABLE 18

II. SEC ID N°: 55 (P-1032) 1 % en HEC 4 %			
N° de An	LOG/cm²	peso tisular (g)	LOG/g
2	1,70	0,1493	2,53
4	1,70	0,1859	2,43
6	1,70	0,1889	2,42
8	1,70	0,1956	2,41
10	1,70	0,1905	2,42
12	1,70	0,1422	2,55
	1,70	0,1754	2,46
	0,00	0,0233	0,06

Nota: todas las muestras excepto la N° 9 tuvieron conteos logarítmicos que no indican crecimiento visible para esa muestra o el límite mínimo de detección de bacterias. N° de An = número de animal.

10

TABLA 19

GRUPO	Nº DE ANIMAL	REACCIÓN TISULAR														
		Película no sellada			Cantidad de exudado			Aspecto de la herida			Gravedad de la reacción tisular			% de tejido retirado		
I. P-50 1 %	1	S	-	-	-	-	P/a	2/a	2/a	2/a		2	2	-	-	-
	3	-	-	-	P/a	P/a	P/a	2/a	2/a	2/a		2	2	-	-	-
	5	-	-	-	P/a	P/a	P/a	2/a	2/a	2/a		2	2	-	-	-
	7	-	-	-	P/a	-	P/a	2/a	2/a	2/a		2	1	-	-	-
	9	-	-	-	-	P/a	P/a	2/a	2/a	2/a		2	2	-	-	-
	11	S	-	-	P/a	P/a	P/a	1	1	1				-	-	-
II. SEC ID Nº: 55 (P-1032) 1 %	2	-	-	-	-	P/a	P/a	1	1	2/a				-	-	-
	4	S	-	-	-	P/a	P/a	1	1	1				-	-	-
	6	-	-	-	G/m	P/a	P/a	1	2/w	2/a				-	-	-
	8	-	-	-	-	P/a	P/a	1	1	2/a				-	-	-
	10	-	-	-	-	P/a	P/a	1	1	1				-	-	-
	12	-	-	-	-	P/a	P/a	1	1	1				-	-	-
DÍA		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Clave de Observación:																
Película no sellada: S= sí; - =no																
Aspecto de la Herida: 1= normal; 2= algunas áreas muestran reacción tisular; 3= tejido desnaturalizado notable; a=amarillento; r = rojizo; m = marrón																
Cantidad de exudado: - =nada; P= pequeña; L= grande																
Gravedad de la reacción tisular: 1 = mínima; 2 = media; 3= grande																

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Falla, TImonthy J
Zhang, Licuan
Harris, Scott M.
- 10 <120> Hexapéptidos antimicrobianos
- <130> 11181.0032.NPUS00
- <140> US 11/350.192
- <141> 08-02-2006
- 15 <150> 60/651.270
- <151> 09-02-2005

<160> 92
<170> PatentIn versión 3.5
5 <210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

<220>
15 <221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 1

Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

20

<210> 2
<211> 6
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

35 <400> 2

Lys Trp Arg Trp Pro Trp
1 5

40 <210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintética

<220>
50 <221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 3

Lys Trp Lys Trp Phe Trp
1 5

55 <210> 4
<211> 6
<212> PRT

ES 2 378 242 T3

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Sintética
5
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN
10
<400> 4

Arg Trp Arg Trp Pro Trp
1 5

15 <210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
20 <220>
<223> Sintética
<220>
<221> MOD_RES
25 <222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN
<400> 5

Arg Trp Arg Trp Arg Trp
1 5

30 <210> 6
<211> 6
<212> PRT
35 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Sintética
40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN
45 <400> 6

Lys Phe Lys Trp Phe Trp
1 5

50 <210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
55 <220>
<223> Sintética
<220>
<221> MOD_RES

ES 2 378 242 T3

<222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN

 5 <400> 7

 Arg Phe Lys Trp Phe Trp
 1 5

 <210> 8
 <211> 6
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética
 15

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN
 20

 <400> 8

 Arg Arg Arg Trp Trp Trp
 1 5

 25 <210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Sintética

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN
 35

 <400> 9

 40

 Lys Phe Lys Phe Lys Phe
 1 5

 <210> 10
 <211> 6
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética
 50

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN
 55

 <400> 10

 Lys Tyr Lys Tyr Lys Tyr
 1 5

ES 2 378 242 T3

5
<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

10
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

15
<400> 11

Phe Lys Phe Lys Phe Lys
1 5

20
<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

25
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

30
<400> 12

Phe Lys Phe Lys Pro Val
1 5

Phe Ala Leu Lys Lys Leu
1 5

35
<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

40
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

45
<400> 13

50
Val Lys Val Lys Pro Val
1 5

55
<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 378 242 T3

<220>
<223> Sintética

5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

10 <400> 14

Phe Ala Leu Lys Lys Leu
1 5

15 <210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintética

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 15

Arg Lys Thr Trp Pro Trp
1 5

30 <210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sintética

40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 16

Phe Lys Leu Ala Pro Trp
1 5

45

50 <210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

55 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

60 <400> 17

ES 2 378 242 T3

Lys Trp Lys Lys Pro Val
1 5

5 <210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 18

Phe Arg His Phe Arg Trp
1 5

20 <210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sintética

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 19

Val Ala Lys Leu Ala Lys
1 5

35 <210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintética

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

50 <400> 20

Phe Ala Lys Leu Ala Lys
1 5

55 <210> 21
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 378 242 T3

<220>
 <223> Sintética

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN

10 <400> 21

Lys Phe Lys Ser Phe Lys
1 5

15 <210> 22
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 22

Lys Trp Lys Lys Leu Ala
1 5

30 <210> 23
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sintética

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 23

Lys Trp Lys Phe Lys Phe
1 5

45 <210> 24
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sintética

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN

ES 2 378 242 T3

<400> 24

Lys Trp Lys Val Phe Lys
1 5

5

<210> 25
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Sintética

15

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

20

<400> 25

Val Ala Lys Lys Trp Lys .
1 5

25

<210> 26
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Sintética

35

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 26

Phe Ala Lys Leu Ala Lys
1 5

40

<210> 27
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Sintética

50

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 27

Lys Leu Ala Lys Leu Leu
1 5

55

<210> 28
<211> 6

ES 2 378 242 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Sintética

10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 28

Leu Ala Lys Leu Ala Lys
1 5

15 <210> 29
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintética

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

30 <400> 29

Lys Pro Trp Lys Phe Lys
1 5

35 <210> 30
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintética

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 30

Lys Pro Val Trp Pro Trp
1 5

50 <210> 31
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Sintética

60 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)

ES 2 378 242 T3

<223> AMIDACIÓN

<400> 31

Lys Pro Val Lys Phe Lys
1 5

5

<210> 32

<211> 6

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> AMIDACIÓN

20

<400> 32

Lys Phe Val Trp Pro Trp
1 5

25

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Sintética

35

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> AMIDACIÓN

<400> 33

Leu Leu Lys Trp Pro Trp
1 5

40

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

50

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> AMIDACIÓN

55

<400> 34

Phe Pro Trp Lys Phe Lys
1 5

<210> 35

ES 2 378 242 T3

<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

5 <400> 38

Lys Phe Lys Pro Phe Trp
1 5

<210> 39
<211> 6
10 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Sintética

<220>
<221> MISC_FEATURE
20 <222> (2)..(2)
<223> Xaa es 1-Nal-OH, en la que Nal es naftilalanina

<220>
25 <221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 39

Lys Xaa Lys Trp Pro Trp
1 5

30 <210> 40
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sintética

<220>
40 <221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 40

Lys Phe Lys Leu Pro Trp
1 5

45 <210> 41
<211> 6
50 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> Sintética

<400> 41

Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

ES 2 378 242 T3

5 <210> 42
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

10 <400> 42

Lys Trp Lys Trp Pro Trp
1 5

15 <210> 43
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

20 <400> 43

Lys Trp Lys Trp Phe Trp
1 5

25 <210> 44
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintética

<400> 44

Lys Phe Lys Trp Phe Trp
1 5

35 <210> 45
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

40 <400> 45

Phe Ala Lys Trp Pro Trp
1 5

45 <210> 46
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

50 <400> 46

55 <210> 46
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 46

ES 2 378 242 T3

Val Ala Lys Trp Pro Trp
1 5

5 <210> 47
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 47

Lys Trp Lys Trp Pro Trp
1 5

20 <210> 48
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sintética

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 48

Phe Ala Lys Trp Pro Trp
1 5

35 <210> 49
<211> 6
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

50 <400> 49

Val Ala Lys Trp Pro Trp
1 5

55 <210> 50
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 378 242 T3

<220>
<223> Sintética

5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

10 <400> 50

Lys Trp Lys Phe Pro Phe
1 5

15 <210> 51
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintética

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 51

Lys Trp Lys Trp Gly Trp
1 5

30 <210> 52
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sintética

40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 52

Lys Leu Lys Trp Pro Trp
1 5

45

50 <210> 53
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

55 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

ES 2 378 242 T3

<400> 53

Lys Trp Lys Leu Ala Leu
1 5

5

<210> 54
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Sintética

15

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> adición de ácido octanoico mediante un enlace amida al péptido

20

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

25

<400> 54

Phe Ala Leu Leu Lys Leu
1 5

30

<210> 55
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Sintética

40

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> adición de ácido octanoico mediante un enlace amida al péptido

45

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 55

Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

50

<210> 56
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> Sintética

60

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)

<223> Sintética
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = fenilalalanina fluorada
 <220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 59
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = fenilalalanina fluorada
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 59
 Lys Xaa Lys Trp Pro Trp
 1 5
 <210> 60
 <211> 6
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = fenilalalanina fluorada
 <220>
 <221> MOD_RES
 30 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 60
 Lys Trp Lys Trp Xaa Trp
 1 5
 <210> 61
 <211> 6
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 50 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = fenilalalanina fluorada
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 55 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = fenilalalanina fluorada
 <220>
 <221> MOD_RES
 60 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 61

ES 2 378 242 T3

Lys Xaa Lys Trp Xaa Trp
1 5

5 <210> 62
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = 1-Nal-OH, en la que Nal es naftilalanina

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 62

Lys Trp Lys Trp Xaa Trp
1 5

25 <210> 63
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintética

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa =2-Nal-OH, en la que Nal es naftilalanina

40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

45 <400> 63

Lys Trp Lys Trp Xaa Trp
1 5

50 <210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Sintética

60 <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> AMIDACIÓN

<400> 64

ES 2 378 242 T3

Lys Trp Lys Trp Leu Pro Trp
1 5

5 <210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> AMIDACIÓN

<400> 65

Lys Trp Lys Trp Pro Pro Trp
1 5

20 <210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sintética

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> AMIDACIÓN

<400> 66

Lys Trp Lys Trp Pro Gly Trp
1 5

35 <210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintética

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> AMIDACIÓN

50 <400> 67

Lys Pro Lys Trp Pro Pro Trp
1 5

55 <210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 378 242 T3

<220>
<223> Sintética

5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> AMIDACIÓN

10 <400> 68

Lys Phe Lys Trp Pro Pro Trp
1 5

15 <210> 69
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintética

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> adición de ácido heptanoico mediante un enlace amida al péptido.

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 69

Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

35 <210> 70
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintética

45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> adición de ácido nonanoico mediante un enlace amida al péptido.

50 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 70

55 Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

<210> 71
<211> 6

ES 2 378 242 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Sintética

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
10 <223> adición de ácido caproico mediante un enlace amida al péptido.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
15 <223> AMIDACIÓN

<400> 71

Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

20 <210> 72
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sintética

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
30 <223> adición de ácido laurico mediante un enlace amida al péptido.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
35 <223> AMIDACIÓN

<400> 72

40 <210> 73
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

45 <220>
<223> Sintética

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
50 <223> adición de ácido palmítico mediante un enlace amida al péptido

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
55 <223> AMIDACIÓN

<400> 73

60

ES 2 378 242 T3

Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

5 <210> 74
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

15 <220>
<221> MISCFEATURE
<222> (1)..(1)
<223> adición de ácido esteárico mediante un enlace amida al péptido

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 74

Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

25 <210> 75
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintética

35 <220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)
<223> adición de ácido oleico mediante un enlace amida al péptido

40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 75

Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

50 <210> 76
<211> .6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Sintética

60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> adición de ácido 8-aminocaprílico mediante un enlace amida al péptido

<220>

ES 2 378 242 T3

<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

5 <400> 76

Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

10 <210> 77
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintética

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> adición de ácido mirístico mediante un enlace amida al péptido

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 77

Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

30 <210> 78
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sintética

40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> adición de ácido pentadecanoico mediante un enlace amida al péptido

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

50 <400> 78

Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

55 <210> 79
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Sintética

ES 2 378 242 T3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> adición de ácido undecanoico mediante un enlace amida al péptido
 5

<220>
 <221> MOD RES
 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN
 10

Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

<210> 80
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15

<220>
 <223> Sintética
 20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> adición de ácido tridecanoico mediante un enlace amida al péptido
 25

<220>
 <221> MOD RES
 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN
 30

Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

<210> 81
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35

<220>
 <223> Sintética
 40

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> adición de ácido octanoico mediante un enlace amida al péptido
 45

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(6)
 <223> restos de forma D
 50

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN
 55

<400> 81
 60

ES 2 378 242 T3

Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

5 <210> 82
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(6)
<223> restos de forma D

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

20 <400> 82

Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

25 <210> 83
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintética

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> adición de ácido laurico mediante un enlace amida al péptido

40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(6)
<223> restos de forma D

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDACIÓN

<400> 83

Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

50 <210> 84
<211> 6
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

60 <220>

ES 2 378 242 T3

<221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> adición de ácido octanoico mediante un enlace amida al péptido
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> restos de forma D
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN
 15
 <400> 84

Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

<210> 85
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Sintética
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Adición de ácido decanoico mediante un enlace amida al péptido
 30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDACIÓN
 35
 <400> 85

Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

<210> 86
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Sintética
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> AMIDACIÓN
 50
 <400> 86
 55

Phe Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Leu Lys Lys Ala Leu Lys Lys Ala
1 5 10 15

Leu

ES 2 378 242 T3

<210> 87
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Sintética
10
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> AMIDACIÓN
15
<400> 87

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Ala Leu Lys Lys Leu Leu
1 5 10
20
<210> 88
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
25
<220>
<223> Sintética
30
<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> AMIDACIÓN
30
<400> 88

Val Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala
1 5 10 15
Leu
35
<210> 89
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
40
<220>
<223> Sintética
45
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> AMIDACIÓN
50
<400> 89

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Leu
1 5 10
55
<210> 90
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>

ES 2 378 242 T3

<223> Sintética

<220>
<221> MOD_RES
5 <222> (15)..(15)
<223> AMIDACIÓN

<400> 90

Phe Ala Lys Ala Leu Lys Ala Leu Leu Lys Ala Leu Lys Ala Leu
1 5 10 15

<210> 91
<211> 14
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<220>
20 <221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> AMIDACIÓN

<400> 91

Phe Ala Lys Ala Leu Leu Lys Ala Leu Leu Lys Ala Leu Lys
1 5 10

<210> 92
30 <211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Sintética

<220>
40 <221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> AMIDACIÓN

<400> 92

Lys Tyr Lys Lys Ala Leu Lys Lys Leu Ala Lys Leu Leu
1 5 10

45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un hexapéptido antimicrobiano que comprende restos cargados hidrófilos (X) en las posiciones uno y tres; restos hidrófobos (B) en las posiciones dos, cuatro y seis; y una naftilalanina (Nal), un resto alifático o uno aromático (O) en la posición cinco; estando representada la estructura del hexapéptido por la fórmula XBXBBOB, y seleccionándose el hexapéptido del grupo que consiste en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 56, SEC ID N°: 62, SEC ID N°: 63, SEC ID N°: 70, SEC ID N°: 72, SEC ID N°: 77, SEC ID N°: 78, SEC ID N°: 79, SEC ID N°: 80, SEC ID N°: 81, SEC ID N°: 83 y SEC ID N°: 85.
- 10 2. El hexapéptido de la reivindicación 1, en el que O se selecciona del grupo que consiste en 1-Nal-OH, 2-Nal-OH, prolina y fenilalanina; y seleccionándose el hexapéptido del grupo que consiste en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 56, SEC ID N°: 62, y SEC ID N°: 63.
- 15 3. El hexapéptido de la reivindicación 1, siendo el hexapéptido SEC ID N°: 1.
4. El hexapéptido de la reivindicación 1, modificándose dicho hexapéptido con un lípido.
- 20 5. El hexapéptido de la reivindicación 4, en el que el lípido se selecciona del grupo que consiste en ácido heptanoico, ácido nonanoico, ácido láurico, ácido mirfístico, ácido pentadecanoico, ácido undecanoico, ácido tridecanoico y ácido octanoico.
- 25 6. El hexapéptido de la reivindicación 4, seleccionándose el hexapéptido del grupo que consiste en SEC ID N°: 70, SEC ID N°: 72, SEC ID N°: 77, SEC ID N°: 78, SEC ID N°: 79, SEC ID N°: 80, SEC ID N°: 81, SEC ID N°: 83, y SEC ID N°: 85.
7. El hexapéptido de la reivindicación 1 siendo el hexapéptido SEC ID N°: 72.
8. El hexapéptido de la reivindicación 1 siendo el hexapéptido SEC ID N°: 79.
- 30 9. El hexapéptido de la reivindicación 1 siendo el hexapéptido SEC ID N°: 85.
10. Una composición que comprende el hexapéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 ó 6 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 11. La composición de la reivindicación 10, en la que dicho hexapéptido es soluble en una solución acuosa.
12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 10 para su aplicación a la piel o una herida.
- 40 13. Un hexapéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 ó 6 a 9 para su uso como un medicamento.
14. Un hexapéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 ó 6 a 9 para el tratamiento o prevención de una infección microbiana, estando causada la infección por bacteria u hongo.
- 45 15. El hexapéptido de la reivindicación 14, en el que la infección microbiana está causada por *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*.
16. El hexapéptido de la reivindicación 14, en el que la infección microbiana está causada por *Candida albicans*.

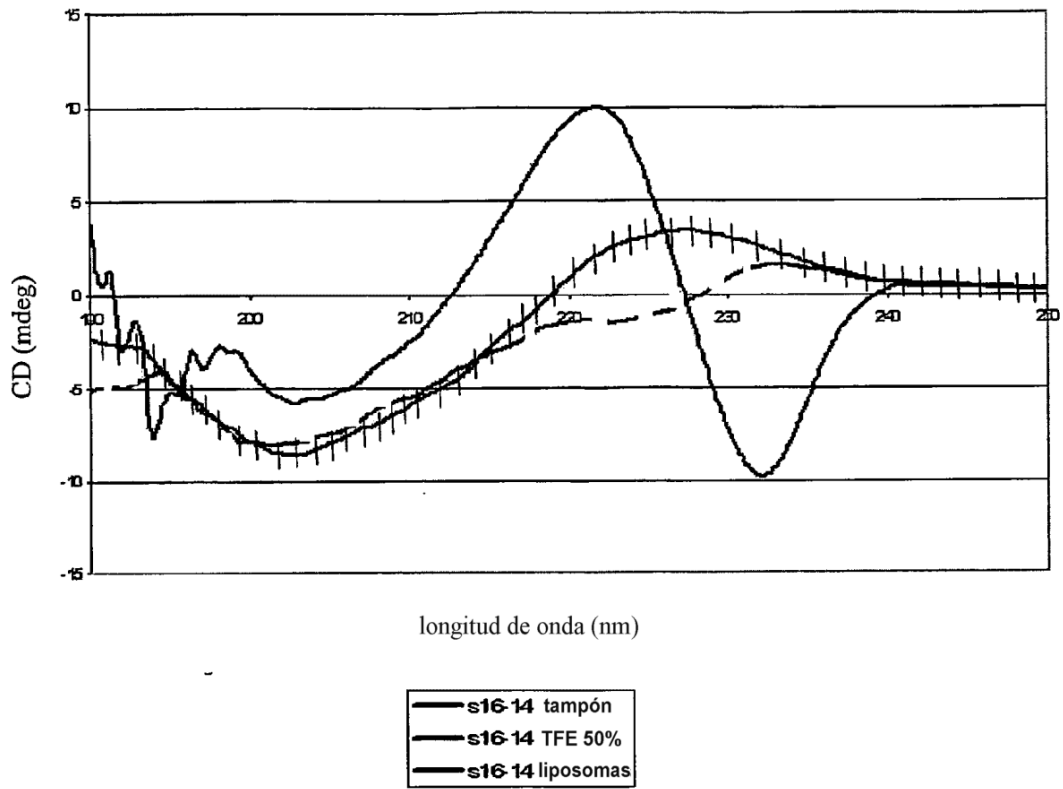


FIG. 1

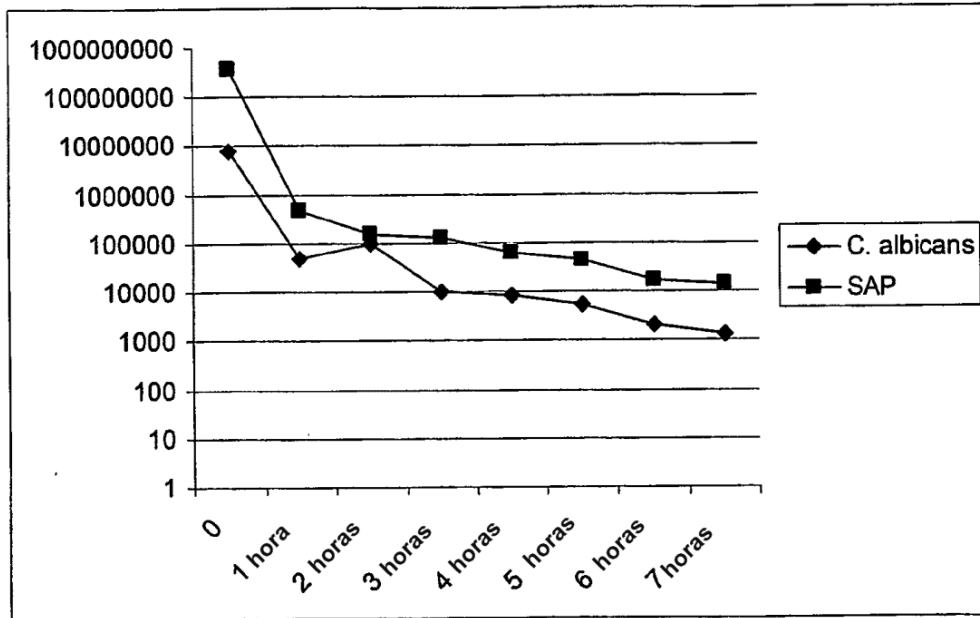


FIG. 2

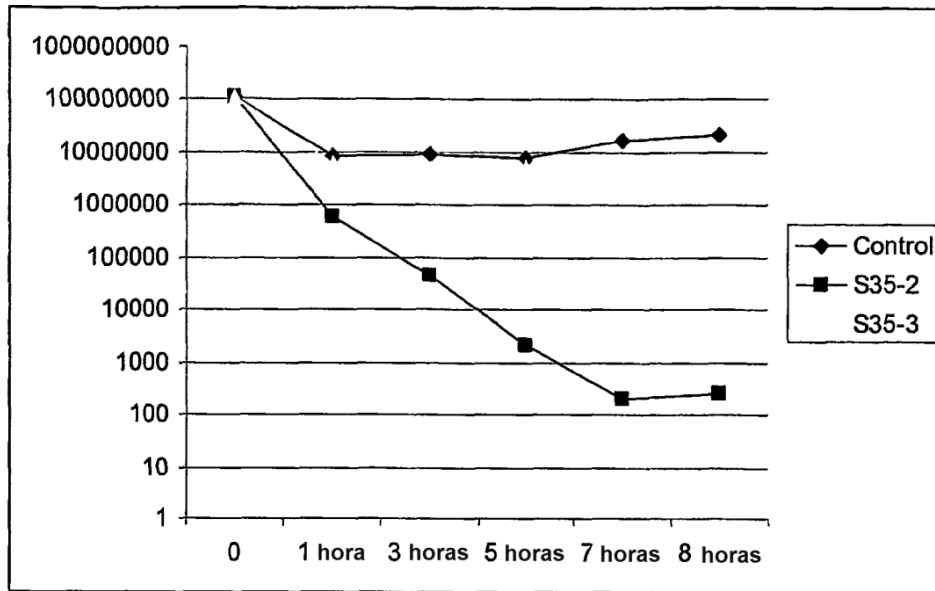


FIG. 3

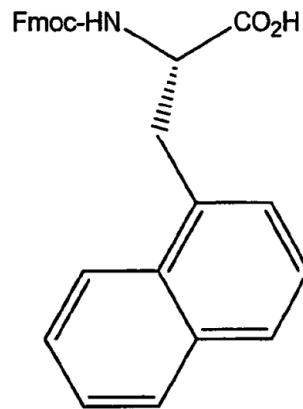


FIG. 4A

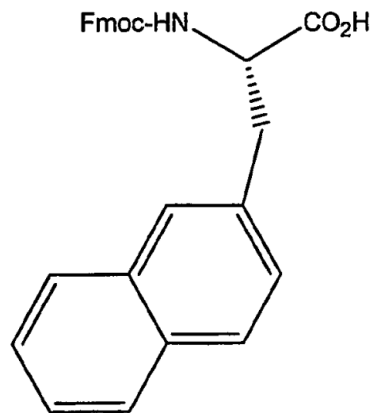


FIG. 4B

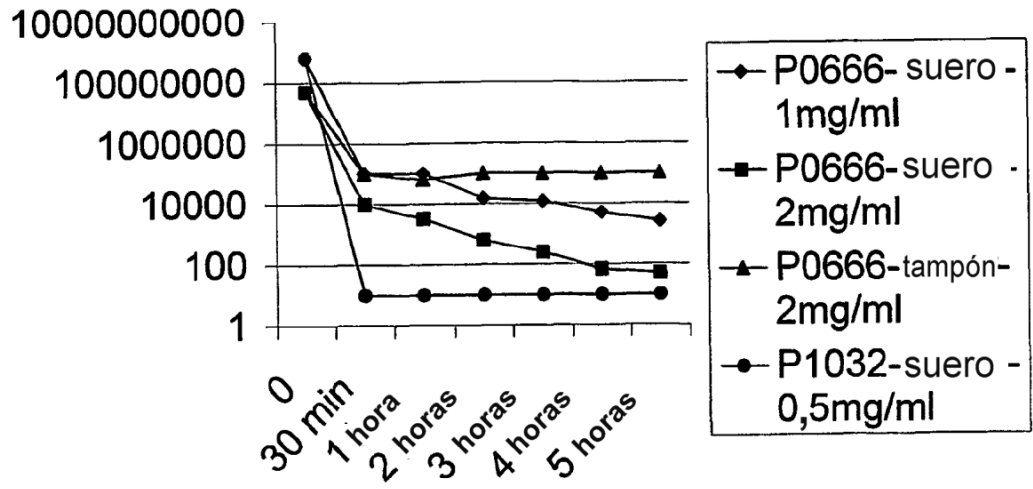


FIG. 5

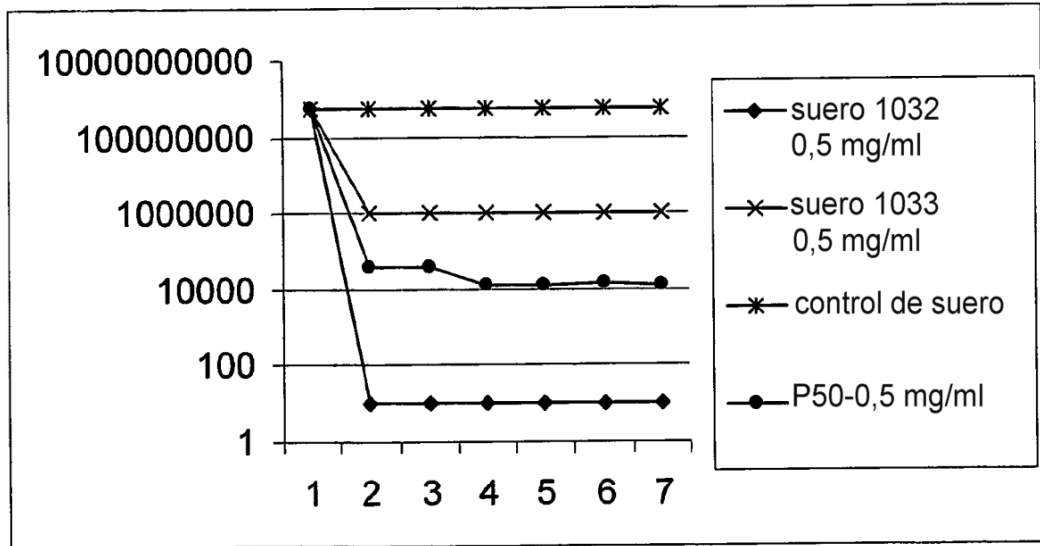


FIG. 6

Actividad de unión de LPA de péptidos

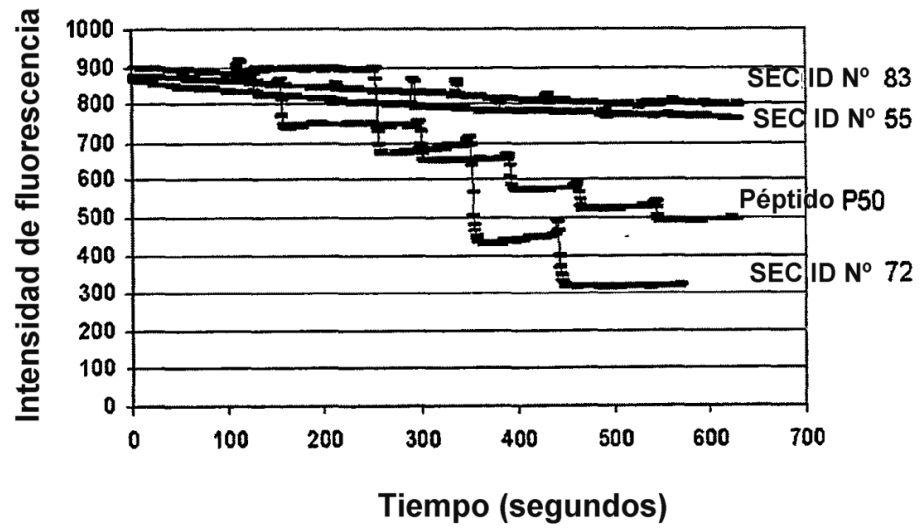


FIG. 7

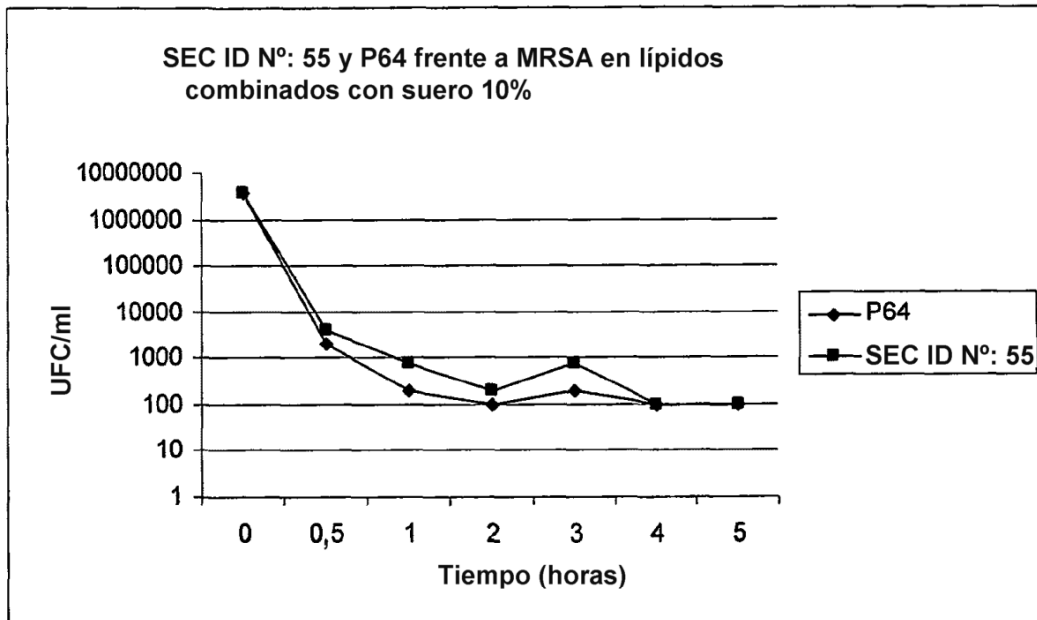


FIG. 8

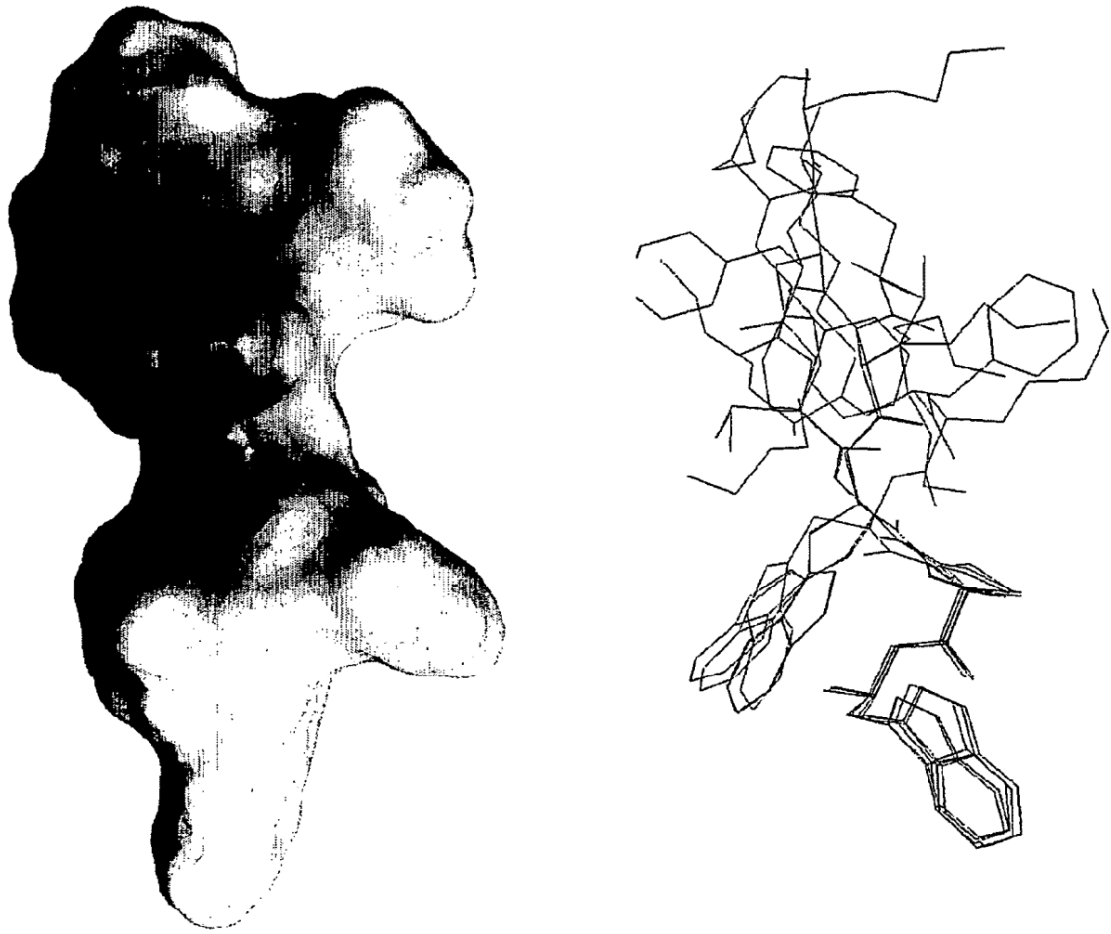


FIG. 9

Muerte de MRSA (SAP0017) por lipo-hexapéptidos seleccionados a 1 mg/ml

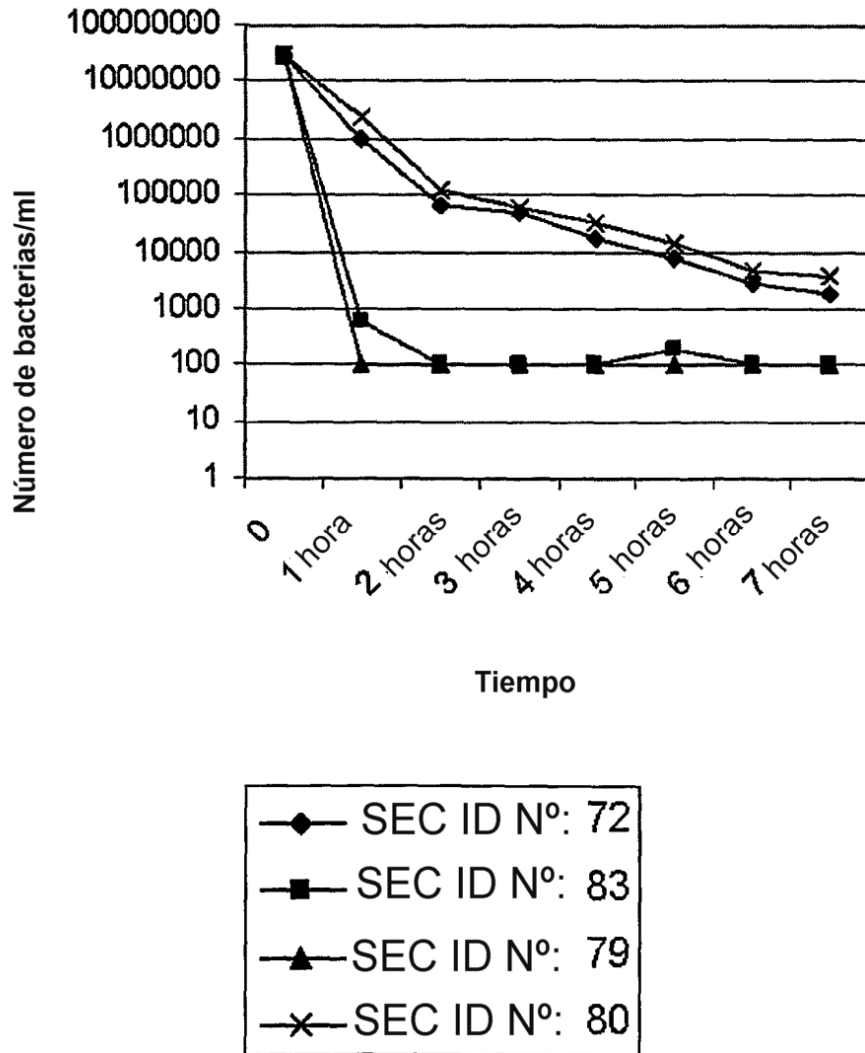


FIG. 10

Actividad de hexapéptidos SEC ID N°: 55 en ambiente de suero y lípido

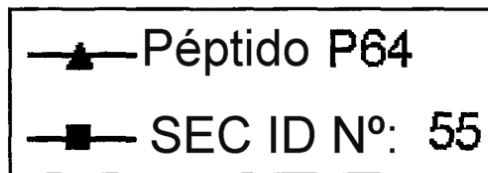
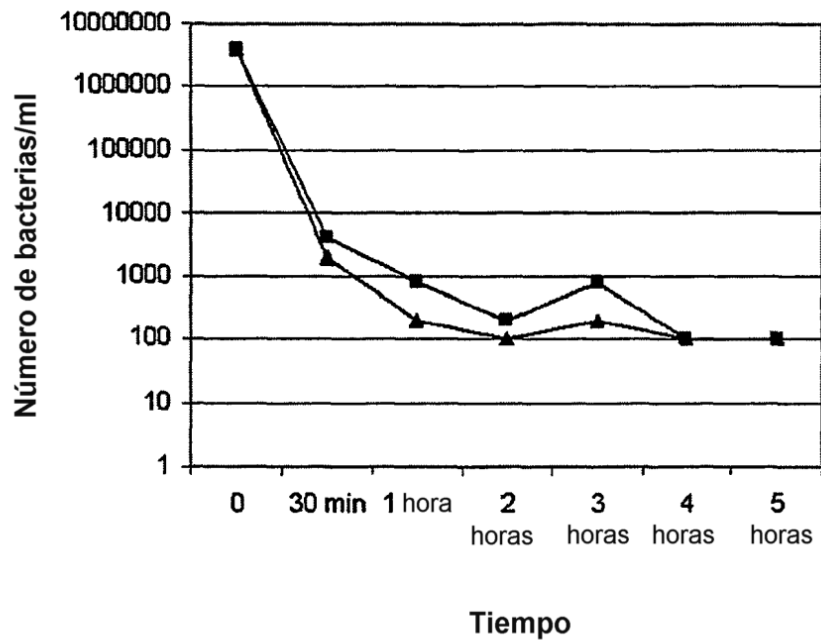


FIG. 11