

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 595**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/08** (2006.01)

**C07K 14/16** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2011 E 11701678 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2531518**

54 Título: **Compuestos oligopeptídicos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**01.02.2010 GB 201001602**

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

**06.10.2016**

73 Titular/es:

**CYTOVATION AS (100.0%)  
Møllendalsveien 65 C  
5008 Bergen, NO**

72 Inventor/es:

**PRESTEGARDEN, LARS**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 585 595 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

Compuestos oligopeptídicos y usos de los mismos

5 La presente invención se refiere a nuevos agentes, a composiciones farmacéuticas que los contienen y a su uso en terapia, particularmente terapia antimicrobiana y carcinoterapia. En particular, la presente invención se refiere a nuevos compuestos basados en péptidos que, sorprendentemente, han mostrado tener efectos inhibidores sobre el crecimiento y/o la viabilidad de las células, particularmente, células bacterianas y cancerosas. Los nuevos péptidos de la invención han mostrado que tienen efectos citotóxicos sobre células bacterianas y cancerosas y que inhiben el crecimiento de tumores. Dichos péptidos, o miméticos de los mismos, pueden por tanto usarse en carcinoterapia como agentes antimicrobianos, más particularmente, como agentes antitumorales o antibacterianos. También se proporcionan métodos terapéuticos y no terapéuticos que comprenden el uso de péptidos de la invención.

15 El cáncer es una afección en la que las células presentan crecimiento incontrolado e intrusión sobre y destrucción de tejidos adyacentes. En algunos casos las células cancerosas metastatizan y se desplazan a otros lugares, formando sitios secundarios de cáncer. El cáncer afecta a personas de todas las edades, aumentando el riesgo con la edad en la mayoría de los tipos de cáncer. El cáncer causó aproximadamente el 13 % de todas las muertes humanas en el 2007 (7,6 millones). De hecho, anualmente, 600.000 personas mueren por cáncer solo en los Estados Unidos.

20 Los cánceres están causados por anomalías en el material genético de las células. Estas anomalías pueden deberse a los efectos de carcinógenos, tales como el humo del tabaco, radiación, productos químicos y agentes infecciosos. Otras anomalías genéticas promotoras del cáncer pueden ocurrir al azar a través de errores en la replicación del ADN, o son hereditarias, y por tanto están presentes en todas las células desde el nacimiento. La heredabilidad de los cánceres normalmente está afectada por interacciones complejas entre los carcinógenos y el genoma del hospedador.

25 Se sabe que el sistema inmunitario humano puede reconocer y destruir células cancerosas, principalmente a través de mecanismos mediados por receptores (1-3). Sin embargo, a pesar de la vigilancia inmunitaria, las células cancerosas pueden evadir el control inmunológico del hospedador, y por tanto habitualmente es necesaria la intervención quirúrgica o el tratamiento del cáncer.

30 Debido a la investigación y a los avances en medicina, la mayoría de los cánceres pueden tratarse de alguna forma, y un número más pequeño de cánceres pueden curarse, dependiendo del tipo, localización y fase, específicos. Una vez diagnosticado, el cáncer se trata normalmente con una combinación de cirugía, quimioterapia y radioterapia. Sin embargo, una gran cantidad de cánceres no puede curarse actualmente con métodos tradicionales, y por tanto se necesitan tratamientos alternativos para los pacientes con cáncer. El control inmunológico del hospedador está, a menudo, mediado por polipéptidos catiónicos citolíticos procedentes de las defensas del hospedador y esto, entre otras cosas, ha llevado a proponer el uso de péptidos anticancerosos en el tratamiento del cáncer. Dichos péptidos se descubrieron inicialmente debido a su papel en la eliminación de bacterias (4-7). Sin embargo, parece que los tumores doblan estos mecanismos de control hospedador mediante mecanismos, aún desconocidos, no mediados por receptores (8-13). El documento US74307143 describe la proteína Conductina y un agente relacionado para el diagnóstico y el tratamiento de dolencias tumorales. En particular, el documento US74307143 desvela el uso del dominio RGS de Conductina/Axina 2 para combatir dolencias tumorales.

45 Se sabe que los péptidos que exhiben un efecto inhibitorio contra las células cancerosas ("péptidos inhibidores"), se unen con fuerza a membranas con carga negativa (4, 5, 14-18) y que puede suceder la lisis de la membrana (19, 20). Típicamente, muchos péptidos anticancerosos son catiónicos. La membrana plasmática de las células cancerosas contiene pequeñas cantidades de fosfatidilserina con carga negativa (3-9 %; refs. 21, 22), y las células cancerosas son por tanto ligeramente más negativas que la mayoría de las células eucariotas no neoplásicas. No obstante, esta pequeña diferencia en la composición de la membrana, que explica la capacidad de algunos péptidos catiónicos para destruir, preferentemente, células cancerosas, todavía no está clara (23-25).

50 Las fosfatidilserinas expuestas en la superficie también sirven como un marcador para la eliminación de células cancerosas de la corriente sanguínea mediante efectores de la inmunidad innata, tales como monocitos, aunque a través de mecanismos completamente diferentes (mediados por receptores) (26). En la técnica se ha propuesto que, la destrucción real de las células tumorales mediante péptidos catiónicos, es el resultado de uno de estos dos procesos: (i) inducción de necrosis resultante de la alteración de la membrana citoplasmática (20, 25) o (ii) inducción de la apoptosis desencadenada por la unión de los péptidos con la membrana mitocondrial (9, 27). Se piensa que muchos péptidos anticancerosos, descritos en la técnica, ejercen sus efectos mediante un mecanismo que implica la lisis celular.

60 A pesar de la fuerte actividad anticancerosa *in vitro* de determinados péptidos de este tipo, los estudios *in vivo* están limitados. Actualmente, solo se han realizado algunos estudios *in vivo* con péptidos capaces de alterar las membranas de las células cancerosas y posteriormente causar la muerte de las células cancerosas. Estos estudios incluyen (i) tratamientos sistémicos de tumores sólidos con péptidos líticos, pero solo cuando estén conjugados con dominios autoguiados (dirigidos) o cuando se usen como propéptidos (12, 27) ya que la entidad lítica está inactivada

en el suero y carece de especificidad tumoral; (ii) tratamiento de cáncer de ovario con magainina y su D-aminoácido enantiomérico, pero solo cuando se inyectan por vía i.p. a altas dosis (28); y (iii) una administración intratumoral de un péptido formador de poros de 69 aminoácidos contra xenoinjertos de cáncer de mama humano (11).

5 Todos estos tratamientos ejercen influencia solo ligeramente, o nada en absoluto, en metástasis diseminada (27) debido a su actividad local intrínseca o a su incapacidad para alcanzar metástasis de tamaño considerable en los animales intactos. Hasta ahora, la selectividad de los péptidos citotóxicos por las células cancerosas, y su toxicidad contra otros organismos sanos, no se ha estudiado de un modo intensivo. Sin embargo, en el caso de un péptido, en concreto D-K6L9, un péptido D,L-aminoacídico corto, de 15 meros, se ha mostrado que la inyección intratumoral  
10 inhibe el crecimiento de carcinomas de próstata humano primario sin afectar a las células adyacentes no neoplásicas (13). Se ha observado en ratones que el péptido D-K6L9 se dirige e inhibe específicamente el crecimiento de tumores primarios y metastásicos cuando se administra por vía sistémica. Este péptido parece actuar sobre la fosfatidilserina en la membrana plasmática mediante mecanismos líticos despolarizantes.

15 Por tanto, aunque se han hecho algunos progresos en el campo de los péptidos anticancerosos, aún se necesitan nuevos péptidos que sean eficaces destruyendo o inhibiendo el crecimiento de las células cancerosas y que no exhiban citotoxicidad contra células no cancerosas.

20 Como se ha mencionado anteriormente, los trabajos sobre el desarrollo de péptidos anticancerosos, se han enfocado principalmente sobre péptidos antimicrobianos citolíticos y se ha demostrado que diversos péptidos de este tipo actúan *in vitro* contra diferentes tipos de células cancerosas. Dichos péptidos tienen un papel principal en la inmunidad innata de organismos, incluyendo insectos, anfibios y mamíferos. Los ejemplos incluyen defensas humanas, cecropinas, híbridos de cecropina-magainina, magaininas y dichos péptidos conjugados con dominios autoguiados y propéptidos. Como se ha comentado anteriormente, estos péptidos se unen y alteran preferentemente  
25 membranas fosfolípídicas con carga negativa, el principal componente de la membrana citoplasmática bacteriana.

Microorganismos tales como bacterias son la causa de muchas enfermedades infecciosas, y son responsables de una gran cantidad de muertes cada año. Por ejemplo, bacterias patógenas causan enfermedades tales como tuberculosis. Como los microorganismos son responsables de muchas enfermedades infecciosas, y la resistencia de  
30 microorganismos patógenos es un problema grave al que se enfrenta la medicina moderna, son muy deseables tratamientos nuevos y alternativos contra los microorganismos.

La presente invención aborda estas necesidades y proporciona compuestos novedosos basados en péptidos como nuevos agentes anticancerosos y antimicrobianos, sorprendentemente eficaces.

35 Por tanto, se ha diseñado un nuevo péptido, y se ha mostrado que, péptidos basados en este, tienen sorprendentemente eficacia contra células tanto cancerosas como bacterianas *in vitro* y que inhiben el crecimiento de tumores *in vivo*. Como se describe más adelante en los ejemplos, los péptidos basados en esta nueva secuencia peptídica exhiben actividad citotóxica contra diversas líneas de células cancerosas, mostrando al mismo tiempo muy  
40 baja actividad contra células normales y baja toxicidad. También mostró un efecto citotóxico contra una variedad de especies bacterianas, incluyendo bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. Además, en modelos animales de cáncer, se observó un fuerte efecto antitumoral, con un efecto inhibidor significativo y notable sobre el crecimiento tumoral. Los animales tratados tuvieron una ventaja de supervivencia significativa en comparación con el grupo no tratado, y de hecho estudios realizados sugieren que los animales pueden curarse de sus tumores. Por  
45 tanto, se ha demostrado un efecto anticanceroso o antitumoral drástico (En este sentido "anticanceroso" se entiende que significa un efecto negativo sobre células cancerosas, más particularmente sobre el crecimiento y/o la viabilidad de células cancerosas, y más particularmente un efecto citotóxico sobre células cancerosas).

Inicialmente, los autores de la presente invención buscaron diseñar péptidos que tuviesen un efecto "supresor tumoral", basándose en las secuencias de aminoácidos de proteínas supresoras tumorales conocidas. Por tanto, se esperaba diseñar péptidos que pudiesen unirse a los receptores de proteínas supresoras tumorales y por lo tanto  
50 bloqueasen el crecimiento tumoral. Se preparó un panel de 96 péptidos y se exploró con respecto a la actividad anticancerosa y antimicrobiana. En esta exploración se identificó el péptido en cuestión de la presente invención, mostrando solo uno de tres péptidos niveles de actividad significativos. El péptido de la presente invención exhibió inesperadamente alta actividad citotóxica contra células tanto cancerosas como microbianas, tanto *in vitro* como *in vivo* en el caso de las células cancerosas. Sorprendentemente, dada la lógica del diseño de la peptidoteca, se descubrió que el péptido tenía actividad lítica, alterando la membrana plasmática de las células cancerosas y produciendo la lisis de bacterias. Adicionalmente, también se observó sorprendentemente un efecto apoptótico, lo que sugería que los péptidos podían desencadenar o inducir la apoptosis. Como se ha mencionado anteriormente,  
55 estudios adicionales han mostrado que este efecto anticanceroso puede ser selectivo para células cancerosas, dejando intactas a las células no cancerosas, lo cual es una ventaja significativa en el tratamiento del cáncer, donde los efectos secundarios negativos de los tratamientos, por ejemplo, tratamiento con quimioterapia, son a menudo sustanciales. Los compuestos de la invención, basados en péptidos, también han mostrado erradicar diversas cepas bacterianas, y podrían proporcionar una herramienta eficaz contra bacterias multi resistentes.

65

Basándose en estos resultados sorprendentes e impredecibles, los autores de la presente invención proponen ahora que los péptidos y los compuestos basados en péptidos basados en esta nueva secuencia peptídica, concretamente la secuencia de SEQ ID NO. 1:

5 KTLRVAKAIYKRYIE (SEQ ID NO: 1)

pueden usarse terapéuticamente en el tratamiento del cáncer y de infecciones microbianas, y más generalmente también como agentes antimicrobianos, incluyendo también usos no terapéuticos, por ejemplo, para combatir la contaminación o la colonización microbiana, por ejemplo, como un desinfectante, etc.

10 Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto oligopeptídico que comprende:

- 15 i) la secuencia de aminoácidos de YGRKRRRQRRRGKTLRVAKAIYKRYIE (SEQ ID NO: 40); o  
ii) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85 % con la secuencia de SEQ ID NO: 40;

en el que el compuesto de (i) o (ii) tiene actividad en la inhibición del crecimiento y/o viabilidad de células microbianas y cancerosas.

20 Como alternativa el compuesto puede tener actividad antitumoral y antimicrobiana, en el caso de la última, preferentemente actividad antibacteriana.

El compuesto oligopeptídico de SEQ ID NO: 40; corresponde a la secuencia TAT del VIH de SEQ ID NO: 36 (véase también más adelante) unida al extremo N terminal de SEQ ID NO: 1. La secuencia del TAT del VIH tiene actividad "penetradora de células" (como también se define más adelante). En los ejemplos indicados más adelante, se investigó un péptido diseñado sobre esta base, y ha mostrado ser particularmente eficaz.

30 Los compuestos oligopeptídicos de la invención tienen por tanto un efecto inhibitor sobre el crecimiento y/o la viabilidad de células cancerosas y microbianas, especialmente bacterias. Por tanto, los compuestos tienen actividad citostática o citotóxica, preferentemente actividad citotóxica, contra células cancerosas y microbianas, por ejemplo, contra tumores. En un aspecto, los compuestos son bacteriostáticos o bactericidas, preferentemente bactericidas.

35 La "inhibición del crecimiento" de una célula significa que cualquier aspecto del crecimiento de la célula, ya sea un aumento en el tamaño de una célula o en la cantidad y/o volumen de sus constituyentes, pero más particularmente un aumento en el número de una célula, se reduce, más particularmente se reduce considerablemente. El término "crecimiento" incluye por tanto explícitamente la replicación o reproducción de una célula. La tasa de crecimiento de una célula, por ejemplo, en términos de la tasa en el incremento del número de células, puede reducirse. Como ejemplo representativo, el crecimiento (por ejemplo, número de células o tasa de crecimiento) puede reducirse en al menos 50, 60, 70, 80, 90 o 95 %. En determinados casos, el crecimiento puede reducirse al 100 %, es decir el crecimiento cesa o se inhibe por completo. Por tanto, la replicación o reproducción de la célula puede reducirse o inhibirse. Por tanto, el término "inhibir" incluye cualquier grado de reducción del crecimiento (en comparación, por ejemplo, con el crecimiento que puede observarse en ausencia del compuesto oligopeptídico). La tasa de replicación o reproducción puede evaluarse o expresarse en términos de tiempo de generación, particularmente en el caso de las células microbianas (es decir, el tiempo que transcurre para que el microorganismo genere una copia de sí mismo). En términos de células cancerosas, el crecimiento puede evaluarse determinando el número de células o evaluando el tamaño de un tumor o su tasa de crecimiento.

45 La "inhibición de la viabilidad" de una célula incluye cualquier efecto que reduzca la viabilidad de una célula, o que haga que probablemente sobreviva menos o que no sea viable. La viabilidad de una célula puede considerarse como la capacidad de una célula para sobrevivir en condiciones determinadas. En particular incluye la muerte o destrucción de una célula, es decir, causando su muerte. La muerte puede evaluarse por anomalías en el crecimiento, incluyendo replicación, o en la utilización o asimilación de nutrientes, o por cambios morfológicos en la célula, o en el tejido que contiene la célula, por ejemplo, el tumor, por ejemplo, puede manifestarse la necrosis. Típicamente, puede considerarse que una célula está muerta si se pierde la integridad de la membrana celular.

55 Los términos "citostático" y "citotóxico" pueden interpretarse de manera análoga.

60 En la técnica se conocen bien métodos para determinar la viabilidad o el crecimiento de las células cancerosas o microbianas. Se dispone de muchos ensayos habituales para determinar si una célula está viva (viable) o muerta. Una opción es poner la célula en condiciones que normalmente soportan el crecimiento de esa célula y monitorizar el crecimiento de la célula a través de medios convencionales apropiados, por ejemplo, monitorizando el tamaño de la célula, la morfología de la célula, el número de células a lo largo del tiempo, el consumo de nutrientes en el medio de cultivo, etc. Otra opción es evaluar la célula con respecto a las morfologías características de la muerte celular, por ejemplo cuerpos necróticos o apoptóticos, ampollas membranosas, condensación nuclear y escisión de ADN en fragmentos de tamaño regular, rotura de paredes celulares o membranas y filtración del contenido celular en el medio extracelular.

65

Otros métodos aprovechan la pérdida característica de la integridad de la membrana celular en las células muertas. Habitualmente se usan colorantes impermeables a la membrana (por ejemplo azul de tripano y yoduro de propidio) para evaluar la integridad de la membrana. Las células intactas excluyen estos colorantes y en dichas células no se produce la tinción. Si la integridad de la membrana celular está comprometida, estos colorantes pueden acceder a las células y teñir componentes intracelulares. Como alternativa, o además, los colorantes que solo tiñen células con membranas intactas se usan para dar una indicación de la viabilidad de la célula. El ensayo de células Vivas/Muertas (*Live/Dead*) de Invitrogen Ltd es un ensayo que utiliza dos colorantes, uno para teñir células muertas, el otro para teñir células vivas. Otra estrategia para evaluar la integridad de la membrana es detectar la liberación de componentes celulares en el medio de cultivo, por ejemplo, lactato deshidrogenasa.

Una opción adicional más es medir el metabolismo de la célula. Esto puede realizarse habitualmente de diversas maneras. Por ejemplo pueden medirse los niveles de ATP. Únicamente las células vivas con membranas intactas pueden sintetizar ATP y dado que el ATP no se almacena en las células, los niveles de ATP disminuyen rápidamente tras la muerte celular. Por lo tanto, la monitorización de los niveles de ATP proporciona una indicación del estado de la célula. Una opción adicional más es medir el potencial reductor de la célula. Las células viables que metabolizan nutrientes usan reacciones reductoras y por consiguiente aplicando a la célula un marcador que proporcione diferentes rendimientos tanto en forma reducida como oxidada (por ejemplo, un colorante fluorescente), el potencial reductor de la célula puede evaluarse. Las células que no poseen la capacidad de reducir el marcador pueden considerarse muertas. Los ensayos MTT y MTS son ejemplos convenientes de este tipo de ensayo.

Un efecto o actividad "antitumoral" puede observarse como un efecto sobre el crecimiento y/o la viabilidad en el tumor. El término incluye cualquier efecto o actividad negativo sobre el tumor. Las células del tumor pueden morir o destruirse. El crecimiento del tumor puede inhibirse, por ejemplo, el tumor puede dejar de crecer o la tasa de crecimiento del tumor puede reducirse (por ejemplo, en comparación con el tumor antes del tratamiento con el compuesto, o con un tumor no tratado equivalente o correspondiente). El tamaño del tumor puede reducirse, o en situaciones ventajosas el tumor puede desaparecer del todo (es decir, extirparse o destruirse). Un efecto antitumoral puede, en determinados casos, incluir un efecto en la reducción de la propagación de células cancerosas desde el tumor, por ejemplo el potencial metastásico del tumor puede reducirse. Otras propiedades patogénicas o conductuales del tumor también pueden reducirse, por ejemplo, su capacidad para invadir o infiltrar tejidos adyacentes.

Con referencia a las definiciones dadas anteriormente, una actividad "antimicrobiana" significa cualquier efecto en la muerte o destrucción, o inhibición del crecimiento de un microorganismo, y por analogía una actividad antibacteriana es cualquier efecto en la muerte o destrucción, o inhibición del crecimiento de bacterias.

Ventajosamente, los compuestos oligopeptídicos de la invención actúan directamente en las células, es decir, pueden inhibir directamente el crecimiento y/o la viabilidad de las células. "Directamente" significa que los compuestos no reúnen sistemas o mecanismos fisiológicos (por ejemplo, el sistema inmunitario) para impartir sus efectos (por ejemplo, sus efectos citotóxicos o citostáticos). En lugar de ello, los compuestos actúan directamente en la célula.

Para ayudar a un compuesto oligopeptídico a ejercer sus efectos, o para facilitar, o en determinados casos para permitir estos efectos, el compuesto puede proporcionarse con medios para facilitar, mejorar o permitir su suministro en las células (suministro intracelular).

Por consiguiente, el compuesto oligopeptídico puede comprender adicionalmente una secuencia penetradora de células (péptido penetrador de células). De acuerdo con la presente invención el compuesto oligopeptídico comprende una secuencia penetradora de células que está basada en la secuencia de TAT del VIH, particularmente los aminoácidos 47-58.

Por lo tanto, puede observarse que los compuestos oligopeptídicos pueden adoptar la forma de una construcción que contenga (es decir, que comprenda) un compuesto oligopeptídico junto con una secuencia penetradora de células o péptido penetrador de células. Como se usa en el contexto de un "péptido penetrador de células" el término "péptido" no se limita exclusivamente a un péptido que tiene enlaces peptídicos, sino que incluye también otros compuestos basados en péptidos o similares a péptidos, por ejemplo, estructuras peptidomiméticas, como se comenta adicionalmente más adelante. En otras palabras, un "péptido penetrador de células" puede incluir cualquier compuesto oligopeptídico que tenga actividad penetradora de células.

Por tanto el péptido penetrador de células puede ser una secuencia que actúe transportando el compuesto oligopeptídico al interior de una célula, o a través de una membrana celular (es decir, hacia el interior de una célula). Por tanto, esto también puede denominarse secuencia "penetradora de células" (o más particularmente "péptido penetrador de células") también conocido en la técnica como dominio de transducción de proteína (DTP) o secuencia de transducción de proteína.

La tecnología de péptido penetrador de células (PPC) se ha desarrollado enormemente durante los últimos años y en la técnica se conoce y describe una amplia diversidad de péptidos penetradores de células y por supuesto, en el

comercio, se dispone de una gama de dichos péptidos. Los péptidos penetradores de células pueden variar enormemente en cuanto a su tamaño, secuencia y carga, y por supuesto, en cuanto a su mecanismo de funcionamiento (que actualmente no se conoce para algunos péptidos y no está del todo claro para otros), pero comparten capacidad común de translocarse a través de la membrana plasmática y suministrar un resto o resto asociado (lo que se denomina "cargamento") en el citoplasma, o incluso en algunos casos, en el núcleo, de una célula. Los PPC son por tanto vectores de suministro basados en péptidos.

Los PPC pueden proceder de proteínas de origen natural que tienen la capacidad de translocarse a través de las membranas celulares, tales como la proteína con caja homeótica Antennapedia de *Drosophila* (un factor transcripcional), proteínas víricas tales como el factor transcripcional TAT del VIH-1 y la proteína de cápside VP22 del VHS-1, y o pueden proceder sintéticamente, por ejemplo, de proteínas químicas o polipéptidos sintéticos tal como poliarginina. Como se ha indicado anteriormente, no hay un solo mecanismo responsable del efecto de la transducción y por tanto el diseño de los PPC puede basarse en diferentes estructuras y secuencias. Los péptidos penetradores de células se revisan en Jarver et al. 2006 *Biochimica et Biophysica Acta* 1758, páginas 260-263 y la siguiente Tabla 1 enumera diversos péptidos representativos. Adicionalmente el documento US 6.645.501 describe diversos péptidos penetradores de células que pueden usarse.

TABLA 1

PPC	SECUENCIA	REFERENCIA
<i>Clase Antp</i>		
Penetratina	RQIKIWFQNRMMKWKK (SEQ ID NO: 3)	Bolton (2000) Eur. J. Neuro. 12: 287
Derivados de penetratina	RRMKWKK (SEQ ID NO: 4) NRRMKWKK (SEQ ID NO: 5) QNRMMKWKK (SEQ ID NO: 6) FQNRMMKWKK (SEQ ID NO: 7) RREKWKK (SEQ ID NO: 8) RRQKWKK (SEQ ID NO: 9) KRMKWKK (SEQ ID NO: 10) RKMKWKK (SEQ ID NO: 11) RROKWKK (SEQ ID NO: 12) RRMKQKK (SEQ ID NO: 13) RRMKWFK (SEQ ID NO: 14) RORKWKK (SEQ ID NO: 15) RRMWKKK (SEQ ID NO: 16)	US 6472507 EP4855781 WO 97/12912
	RRMKKWK_ (SEQ ID NO: 17) (usando la notación de un solo aminoácido convencional, ornitina (O), ácido diaminobutírico (B), norleucina (N))	
D-Penetratina	rqikiwfnrmmkwkk (SEQ ID NO: 18)	Rouselle, C. et al. (2000) Mol. Pharm 57: 679
<i>Clase Protegrina</i>		
Pegelina (SynB)	RGGRLSYSRRRFSTSTGR (SEQ ID NO: 19)	Rouselle, C. et al. (2000) Mol. Pharm 57:679
<i>Clase TAT del VIH</i>		
TAT-VIH	GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 20)	Vives E.J Biol, Chem 1997, 272: 16010 Snyder (2004) PLOS 2: 186
TAT-VIH 47-57 OF	YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 21)	Potocky et al. (2003) JBC
VP22	DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRRRVD (SEQ ID NO: 22)	Elliott g. Cell 1997,88:223-233
<i>Péptidos anfipáticos</i>		
MAP	KLALKLALKALKAALKLA (SEQ ID NO: 23)	Morris MC., Nat Biotechnol. 2001, 19: 1173-1176
Transportan	GWTLNSAGYLLGKI N LKALAALAKKI L (SEQ ID NO: 24)	Pooga M, FASEB J 1998,12: 67-77

PPC	SECUENCIA	REFERENCIA
Transportan-10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 25)	Soomets U, Biochim
		Biophys Acta 2000, 1467: 165-176
KALA	WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA (SEQ ID NO: 26)	Oehike J., Biochim Biophys Acta 1998, 1414:127-139
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 27)	Wyman Biochemistry 1997, 36: 3008-3017
Pep-2	KETWFETWFTEWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 28)	
MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV (SEQ ID NO: 29)	13:1371-1387
Péptidos Vectocell	VKRGLKLRHVRPRVTRMDV (SEQ ID NO: 30) SRRARRSPRHLGSG* (SEQ ID NO: 31) LRRERQSRLRRERQSR* (SEQ ID NO: 32) GAYDLRRRERQSRLRRRERQSR (SEQ ID NO: 33) *indica adición de cys para conjugación con cargamento	Coupade (2005) Biochem. J. 407
Transportador Wr-T	KETWWETWWTEWWTEWSQ-GPG-rrrrrrr (SEQ ID NO: 34) r = D-enantiómero de arginina	Kondo (2004) Mol. Can. Thera 1623
Otros péptidos		
R7	RRRRRRR (SEQ ID NO: 35)	Rothbard et al., Nat. Med 6 (2000) 1253-1257

Las secuencias basadas en la secuencia TAT del VIH, y fragmentos de las mismas, representan una clase de PPC. En el documento US 5.656.122 se describen diversos PPC basados en TAT. Un péptido TAT-VIH ejemplar, como el que se usa en los Ejemplos más adelante, es YGRKKRRQRRRG (SEQ ID NO: 36). La secuencia de aminoácidos de TAT-VIH puede modificarse y/o truncarse, o el péptido puede modificarse químicamente o pueden prepararse análogos retro-, inversos- o retroinversos, conservando al mismo tiempo la actividad penetradora de células.

Otro grupo péptidos penetradores de células son los PPC derivados de Antennapedia (clase Antp) que se basan en la secuencia de Penetratina de aproximadamente 16 aminoácidos, como se muestra en la Tabla 1, que corresponde al tercer bucle de la proteína antennapedia y se observó que era responsable de la translocación de la proteína. La penetratina se ha desarrollado ampliamente como un vehículo de suministro, que se incluye particularmente para uso farmacéutico, y se ha propuesto y descrito una amplia gama de derivados de Penetratina y secuencias modificadas. Puede hacerse referencia en particular a los documentos WO 91/1891, WO 00/1417, WO 00/29427, WO 2004/069279 y US 6.080.724. Por tanto, la secuencia de 16 aminoácidos de la Penetratina puede modificarse y/o truncarse, o el péptido puede modificarse químicamente o pueden prepararse análogos retro-, inversos- o retroinversos, conservando al mismo tiempo la actividad penetradora de células.

Como se ha mencionado anteriormente, ninguna de las características estructurales particulares o motivos de secuencia son comunes en todos los PPC. Sin embargo, pueden identificarse diversas clases de PPC mediante características particulares, tales como, por ejemplo, péptidos que son antipáticos y que tienen carga positiva neta. Otros grupos de PPC pueden tener una estructura que presente alto contenido  $\alpha$ -helicoidal. Otro grupo pueden ser péptidos característicos por un alto contenido de aminoácidos básicos. Por tanto, los PPC pueden ser o pueden comprender oligómeros de aminoácidos básicos tales como arginina, por ejemplo, de 5 a 20, de 6 a 15 o de 6 a 12 restos R, por ejemplo R<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 35), R<sub>8</sub> (SEQ ID NO: 37) o R<sub>11</sub> (SEQ ID NO: 38) o QSR<sub>8</sub> (SEQ ID NO: 39).

Los péptidos anfipáticos ricos en prolina son otra clase de PPC y dichos péptidos se caracterizan por la presencia de anillos de pirrolidina de prolinas como se describe en Pujals et al. 2008 Advanced Drug Delivery Reviews 60, páginas 473-484.

Otros PPC desarrollados satisfactoriamente incluyen pVEC (Elmqvist et al. 2003 Biol. Chem 384, págs. 387-393; Holm et al. 2005 Febs Lett. 579, págs. 5217-5222) y péptidos derivados de calcitonina (Krauss et al. 2004 Bioorg. Med. Chem. Lett., 14, páginas 51-54).

Los PPC disponibles en el comercio incluyen Chariot, basado en el péptido Pep-1 (Active Motif, Francia), los vectores Syn-B basados en el péptido protegrina PG-1 (Syntem, Francia) y Express-si Delivery basado en el péptido MPG de Genospectra, USA.

Además de los PPC disponibles al público y descritos, pueden diseñarse y sintetizarse nuevos péptidos PPC o derivados basándose en criterios conocidos o publicados (por ejemplo, secuencias PPC conocidas o características tales como contenido de aminoácidos básicos, contenido  $\alpha$ -helicoidal, etc. como se ha comentado anteriormente). Adicionalmente, los péptidos diseñados al azar u otros péptidos pueden explorarse con respecto a su actividad PPC,

por ejemplo, acoplado o uniendo dicho péptido que contiene una molécula indicadora, por ejemplo, un marcador o una etiqueta detectable, tal como una etiqueta fluorescente en el cargamento deseado y ensayar para ver si la construcción se transloca a través de la membrana celular, por ejemplo, añadiendo estos péptidos a células vivas seguido de examen de importación celular, por ejemplo, usando microscopía confocal.

Por supuesto, aunque generalmente sea este el caso de que un PPC penetre o entre prácticamente en cualquier tipo de célula, en algunos casos puede observarse que el suministro satisfactorio o eficaz puede depender, o puede variar dependiendo, de la naturaleza exacta del cargamento (por ejemplo, secuencia peptídica de cargamento) y/o del PPC usado. Estaría bien dentro de la habilidad de un experto en la técnica, determinar secuencias peptídicas y combinaciones óptimas, etc., y ensayar y/o modificar secuencias o estructuras de cargamento y/o de PPC etc.

Por tanto, un compuesto oligopeptídico (o construcción) representativo puede comprender:

(a) una primera secuencia oligopeptídica que comprende:

(ii) toda o parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 1; o

(ii) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85 % con la SEQ ID NO: 1; o

(iii) una secuencia de aminoácidos que es toda o parte de la secuencia inversa de la SEQ ID NO. 1 (concretamente toda o parte de la SEQ ID NO. 1: EIYRKYIAKAVRLTK) o que es la secuencia inversa de una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85 % con la SEQ ID NO: 1; y

(b) una segunda secuencia oligopeptídica que es una secuencia peptídica penetradora de células.

El componente (b) puede seleccionarse de cualquiera de los PPC expuestos anteriormente, y más particularmente de cualquiera de las secuencias derivadas o basadas en TAT del VIH.

El PPC (es decir componente (b) en la definición anterior) puede unirse o proporcionarse en cualquier extremo N o C terminal del compuesto oligopeptídico, por ejemplo, en el extremo N terminal. Por tanto, los componentes (a) y (b) pueden unirse o ligarse en cualquier orden, pero preferentemente en el orden (a)-(b).

Los componentes o elementos del compuesto oligopeptídico (o construcción) pueden unirse o ligarse entre sí de cualquier manera deseada o conveniente de acuerdo con técnicas bien conocidas en la materia. Por tanto, los componentes o partes individuales pueden ligarse o conjugarse químicamente, usando, por ejemplo, tecnologías de acoplamiento químico o las construcciones pueden formarse como un todo único usando técnicas de modificación por ingeniería genética, por ejemplo, técnicas para formar proteínas de fusión o, simplemente pueden sintetizarse como un todo, por ejemplo, usando técnicas de síntesis peptídica.

Las partes o componentes individuales pueden ligarse directamente entre sí o pueden ligarse indirectamente mediante una o más secuencias enlazadoras (o espaciadoras). Por tanto, una secuencia enlazadora puede espaciar o separar las dos partes del compuesto (o los dos componentes separados en un compuesto oligopeptídico). La naturaleza exacta de la secuencia enlazadora no es crítica y puede tener cualquier longitud y/o secuencia variable, por ejemplo, puede tener 0-15, 0-12, 0-10, 0-8, 0-6, 0-4 o 0-3 restos, por ejemplo, 1, 2 o 3 o más restos. Como ejemplo representativo la secuencia enlazadora, si está presente, puede tener 1-15, 1-12, 1-10, 1-8, 1-6 o 1-4 restos, etc. La naturaleza de los restos no es crítica y estos pueden ser, por ejemplo, cualquier aminoácido, por ejemplo, un aminoácido neutro, o un aminoácido alifático, o como alternativa pueden ser un aminoácido hidrófobo o polar o con carga o formar una estructura, por ejemplo, prolina. Las secuencias enlazadoras ejemplares por tanto incluyen cualquier resto de aminoácido sencillo, por ejemplo, A, I, L, V, G, R, Q, T o W, o un di-, tri- tetra- penta- o hexapéptido compuesto por dichos restos.

Cuando el compuesto oligopeptídico comprende una secuencia que es la secuencia inversa de SEQ ID NO: 1 (o una variante funcionalmente equivalente de la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos 85 %), entonces se prefiere que la secuencia del PPC (por ejemplo, del componente (b)) también sea inversa, y que esté unida en orden inverso. En otras palabras, se prefiere que la secuencia de todo el compuesto (o construcción) que comprende las dos partes esté invertida. Sin embargo, no se excluye que solo esté invertida una de las partes, o que ambas partes estén invertidas, pero unidas en orden "no inverso".

Un compuesto preferido representativo de la invención tiene la secuencia:

YGRKKRRQRRGKTLRVAKAIYKRYIE (SEQ ID NO: 40)

Una célula cancerosa de acuerdo con la invención puede ser una célula de cualquier cáncer, por ejemplo, de cualquiera de los cánceres descritos más adelante. Puede ser una célula tumoral. La célula puede ser una célula en o de un tumor clínico o de tejido canceroso o puede ser una célula de una línea de célula cancerosa.

La expresión “célula microbiana”, como se usa en el presente documento, incluye cualquier microorganismo. Por tanto, la célula puede ser eucariota o procariota e incluye bacterias, hongos, algas, arqueas y protistas. La expresión por tanto incluye organismos que son típicamente unicelulares, pero que también pueden tener la capacidad de organizarse en colonias cooperativas o estructuras sencillas, tales como filamentos, hifas o micelios (pero no tejidos verdaderos) en determinadas condiciones. El microorganismo puede ser de cualquier clase, género o especie de microorganismo. Los ejemplos de microorganismos procariotas incluyen, pero sin limitación, bacterias, incluyendo micoplasmas (por ejemplo bacterias Gram positivas, Gram negativas o bacterias no sensibles a ensayos Gram) y arqueobacterias. Los microorganismos eucariotas incluyen hongos, algas y otros que están, o que se han clasificado, en el reino taxonómico de Protista, o que se considera que son protistas, e incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, protozoos, diatomeas, protófitos y mohos de tipo fúngico. El microorganismo puede ser aerobio o anaerobio. El microorganismo puede ser patógeno o no patógeno, o puede ser un microorganismo de descomposición o indicador. En realizaciones preferidas particulares el microorganismo es patógeno.

Generalmente, los organismos resistentes a múltiples fármacos (MDRO, por sus siglas en inglés) son bacterias que no se ven afectadas por las dosis clínicas de los antibióticos clásicos. Las bacterias que son resistentes a tres o a más clases de antibióticos pueden considerarse generalmente como MDRO. Los compuestos oligopeptídicos de la presente invención pueden usarse en el tratamiento o en la prevención de infección por MDRO, por ejemplo, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus* y *Enterococcus* spp que son MDR. La bacteria *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), es un ejemplo de una bacteria resistente a múltiples fármacos. En una realización de la invención las células microbianas son bacterias resistentes a múltiples fármacos.

Las bacterias u hongos representan clases preferidas de células microbianas, particularmente bacterias.

Los ejemplos de géneros o especies de bacterias incluyen, pero sin limitación, *Abiotrophia*, *Achromobacter*, *Acidaminococcus*, *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Actinobacillus*, *Actinobaculum*, *Actinomadura*, *Actinomyces*, *Aerococcus*, *Aeromonas*, *Afiplia*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Alloiococcus*, *Alteromonas*, *Amycolata*, *Amycolatopsis*, *Anaerobospirillum*, *Anaerorhabdus*, *Arachnia*, *Arcanobacterium*, *Arcobacter*, *Arthrobacter*, *Atopobium*, *Aureobacterium*, *Bacteroides*, *Balneatrix*, *Bartonella*, *Bergeyella*, *Bifidobacterium*, *Bilophila Branhamella*, *Borrelia*, *Bordetella*, *Brachyspira*, *Brevibacillus*, *Brevibacterium*, *Brevundimonas*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Buttiauxella*, *Butyrivibrio*, *Calymmatobacterium*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Cardiobacterium*, *Catonella*, *Cedecea*, *Cellulomonas*, *Centipeda*, *Chlamydia*, *Chlamydomyces*, *Chromobacterium*, *Chryseobacterium*, *Chryseomonas*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Collinsella*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Coxiella*, *Cryptobacterium*, *Delftia*, *Dermabacter*, *Dermatophilus*, *Desulfomonas*, *Desulfovibrio*, *Dialister*, *Dichelobacter*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Edwardsiella*, *Eggerthella*, *Ehrlichia*, *Eikenella*, *Empedobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Erwinia*, *Erysipelothrix*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Ewingella*, *Exiguobacterium*, *Facklamia*, *Filifactor*, *Flavimonas*, *Flavobacterium*, *Francisella*, *Fusobacterium*, *Gardnerella*, *Globicatella*, *Gemella*, *Gordona*, *Haemophilus*, *Hafnia*, *Helicobacter*, *Helococcus*, *Holdemania*, *Ignavigranum*, *Johnsonella*, *Kingella*, *Klebsiella*, *Kocuria*, *Koserella*, *Kurthia*, *Kytococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lautropia*, *Leclercia*, *Legionella*, *Leminorella*, *Leptospira*, *Leptotrichia*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Listonella*, *Megasphaera*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Mitsuokella*, *Mobiluncus*, *Moellerella*, *Moraxella*, *Morganella*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Myroides*, *Neisseria*, *Nocardia*, *Nocardiosis*, *Ochrobactrum*, *Oeskovia*, *Oligella*, *Orientia*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Parachlamydia*, *Pasteurella*, *Pediococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Photobacterium*, *Photorhabdus*, *Plesiomonas*, *Porphyrimonas*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Pseudonocardia*, *Pseudoramibacter*, *Psychrobacter*, *Rahnella*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Rickettsia Rochalimaea*, *Roseomonas*, *Rothia*, *Ruminococcus*, *Salmonella*, *Selenomonas*, *Serpulina*, *Serratia*, *Shewenella*, *Shigella*, *Simkania*, *Slackia*, *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, *Spirillum*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Stomatococcus*, *Streptobacillus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Succinivibrio*, *Sutterella*, *Suttonella*, *Tatumella*, *Tissierella*, *Trabulsiella*, *Treponema*, *Tropheryma*, *Tsakamurella*, *Turicella*, *Ureaplasma*, *Vagococcus*, *Veillonella*, *Vibrio*, *Weeksella*, *Wolinella*, *Xanthomonas*, *Xenorhabdus*, *Yersinia*, y *Yokenella*; por ejemplo, bacterias Gram positivas tales como *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. typhimurium*, *M. bovis* cepa BCG, subcepas BCG, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. africanum*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. avium* subespecie *paratuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus equi*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Bacillus anthracis*, *B. subtilis*, *Nocardia asteroides*, *Actinomyces israelii*, *Propionibacterium acnes*, y especies de *Enterococcus* y bacterias Gram negativas tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhi*, *Brucella abortus*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Coxiella burnetii*, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *E. hirae*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Francisella tularensis*, *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Cowdria ruminantium*.

Por tanto, solo a modo de ejemplo representativo, la célula microbiana puede ser una bacteria de los géneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Fusobacterium* u otras bacterias entéricas o coliformes.

5 La célula microbiana también puede ser un hongo, o proceder de un hongo, incluyendo, por ejemplo, hongos que pueden ser, o que pueden haberse clasificado como protistas, por ejemplo, hongos de los géneros *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis*, *Penicillium* y *Fusarium*. Como especies representativas de hongos se incluyen, pero sin limitación, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatidis*, *Pneumocystis carinii*, *Penicillium marneffi*, *Alternaria alternata*.

10 La célula microbiana también puede ser un alga, o proceder de un alga, incluyendo, por ejemplo, algas que pueden ser, o que pueden haberse clasificado como protistas. Especies representativas de algas incluyen *Chaetophora*, *Chlorella protothecoides*, *Coleochaete scutata*, *Coleochaete soluta*, *Cyanidioschyzon merolae*, *Aphanochaete*, *Gloeotaenium*, *Oedogonium*, *Oocystis*, *Oscillatoria*, *Paradoxia multisitita*, *Phormidium*, *Chroococcus*, *Aphanothece*, *Fragillaria*, *Cocconis*, *Navicula*, *Cymbella*, *Phaeodactylum* así como cianobacterias (algas verdiazules) y diatomeas tales como *Nitzschia palea*.

15 La célula microbiana puede también ser un protozoo, por ejemplo, un miembro de los grupos Amoeboae, Sporozoa, Ciliates y Flagellates. Los protozoos representativos incluyen especies de *Toxoplasma*, por ejemplo, *Toxoplasma gondii*, especies de *Plasmodium* tales como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, especies de *Trypanosoma*, por ejemplo, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, especies de *Leishmania*, tales como, *Leishmania major*, y especies de *Entamoeba*, tales como, *Entamoeba histolytica*.

20 Preferentemente la célula microbiana se selecciona de los siguientes géneros: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Serratia*, *Yersinia*, *Peptostreptococcus*, *Bacteriodes*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Candida*, *Proteus*, *Burkholderia*, *Fusobacterium* y *Mycobacterium*, por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Legionella pneumophila*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* y *Streptococcus pyogenes*.

25 En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido como se define anteriormente con respecto al compuesto oligopeptídico de la invención como se define en el presente documento. También se proporciona el complemento de dicha molécula de ácido nucleico. En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico también codifica un péptido penetrador de células como se ha definido anteriormente.

30 La molécula de ácido nucleico de la invención comprende preferentemente al menos 30 nucleótidos y preferentemente no más de 800 nucleótidos, más preferentemente no más de 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 o 50. La molécula de ácido nucleico es preferentemente una molécula aislada.

35 Un aspecto adicional se refiere a un vector que comprende una molécula de ácido nucleico como se define en el presente documento. El vector también puede contener elementos adicionales típicamente encontrados en un vector tales como un origen de replicación, un marcador de selección, tal como uno de resistencia a antibióticos y/o un sitio de clonación múltiple. El vector puede ser adicionalmente un vector de expresión y puede comprender elementos adicionales, por ejemplo, elementos transcripcionales y/o traduccionales de control o reguladores para la expresión de las moléculas de ácido nucleico. Dichos elementos de control, por ejemplo, promotores, sitios de unión al ribosoma, potenciadores, terminadores, etc. son muy conocidos y ampliamente descritos en la técnica.

40 El vector puede ser, por ejemplo, un plásmido o un virus, preferentemente este se selecciona de un retrovirus, un adenovirus y un virus adenoasociado.

45 En otro aspecto, se proporciona una célula hospedadora recombinante que contiene una molécula de ácido nucleico y/o un vector como se describe anteriormente. La célula hospedadora puede ser una célula de animal, por ejemplo, una célula de mamífero, por ejemplo, una célula de rata, de origen murino o humano, o puede ser una célula microbiana, por ejemplo, una célula bacteriana.

“Recombinante” significa que la molécula de ácido nucleico y/o vector se han introducido en la célula hospedadora.

50 En un aspecto adicional, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto oligopeptídico como se define en el presente documento, una molécula de ácido nucleico como se define en el presente documento y/o un vector como se define en el presente documento, junto con un excipiente farmacológicamente (o farmacéuticamente) aceptable.

55 El excipiente puede incluir cualquiera de los excipientes conocidos en la técnica, por ejemplo, cualquier transportador o diluyente o cualquier otro ingrediente o agente, tal como un tampón, antioxidante, quelante, aglutinante, recubrimiento, disgregante, relleno, saporífero, colorante, emoliente, lubricante, conservante, absorbente y/o edulcorante, etc.

60 El excipiente puede seleccionarse, por ejemplo, de ácido láctico, dextrosa, metabisulfato de sodio, alcohol bencílico, polietilenglicol, propilenglicol, celulosa microcristalina, lactosa, almidón, quitosano, almidón pregelatinizado,

carbonato de calcio, sulfato de calcio, dextratos, dextrina, dextrosa, dihidrato fosfato de calcio dibásico, fosfato de calcio tribásico, carbonato de magnesio, óxido de magnesio, maltodextrina, manitol, celulosa en polvo, cloruro de sodio, sorbitol y/o talco.

5 Los compuestos oligopeptídicos pueden por tanto suministrarse por diferentes vías, dependiendo de la afección que se desee tratar o prevenir y/o del efecto que se desee obtener, del paciente que se vaya a tratar, etc. Por lo tanto, por ejemplo, la vía de suministro o modo de administración puede seleccionarse para proporcionar un efecto sistémico o local. Por tanto, por ejemplo, los compuestos oligopeptídicos pueden administrarse al sujeto de tal manera que puedan suministrarse por vía sistémica, por ejemplo, mediante una vía administración oral o parenteral.  
10 Como alternativa, y en algunos casos preferentemente, los compuestos oligopeptídicos pueden suministrarse o administrarse por vía local en el sitio de infección o cáncer, por ejemplo, localmente en un tumor. Por tanto, por ejemplo, pueden suministrarse por vía tópica o por administración directa, por ejemplo, por inyección o infusión, o por inhalación, etc. en el sitio del cáncer (por ejemplo, tumor), dependiendo de la evolución del sitio del cáncer (tumor). En el tratamiento del cáncer se prefiere la administración local.

15 La composición farmacéutica puede proporcionarse de cualquier forma conocida en la técnica, por ejemplo como un comprimido, cápsula, cápsula recubierta, líquido, suspensión, tableta, sobrecito, implante, inhalante, polvo, gránulo, emulsión, liofilizado, pastilla efervescente, pulverización, loción, emulsión, bálsamo, parche o cualquiera de sus mezclas. Puede proporcionarse, por ejemplo, como una preparación resistente a los fluidos gástricos y/o en una forma de acción sostenida. También puede tener una forma adecuada para administración oral, parenteral, tópica, 20 rectal, genital, subcutánea, transuretral, transdérmica, intranasal, intraperitoneal, intramuscular y/o intravenosa y/o para administración por inhalación.

25 La composición farmacéutica puede estar en una forma adecuada para la administración liposomal, de tal manera que puedan proporcionarse los liposomas que contienen la composición farmacéutica. Cuando se usan liposomas, no es necesario incluir un excipiente adicional, de tal manera que también se proporcionan liposomas que contienen un compuesto oligopeptídico como se define en el presente documento, una molécula de ácido nucleico como se define en el presente documento y/o un vector como se define en el presente documento.

30 Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para combatir el cáncer y/o una infección microbiana, particularmente infección bacteriana, comprendiendo dicho método administrar (particularmente administrar una cantidad eficaz de) un compuesto oligopeptídico como se define en el presente documento, o una molécula de ácido nucleico como se define en el presente documento, a un sujeto que lo necesite.

35 En otro aspecto, se proporciona un compuesto oligopeptídico como se define en el presente documento, o una molécula de ácido nucleico como se define en el presente documento, para su uso en terapia, particularmente para su uso para en combatir el cáncer y/o una infección microbiana, particularmente infección bacteriana.

40 En otro aspecto, se proporciona el uso de un compuesto oligopeptídico como se define en el presente documento o, de una molécula de ácido nucleico como se define en el presente documento, en la fabricación de un medicamento para su uso en combatir el cáncer y/o una infección microbiana, particularmente infección bacteriana.

45 El término "combatir" como se usa en el presente documento incluye tratamiento tanto terapéutico como prevención. Más particularmente, por lo tanto la invención proporciona métodos y usos para el tratamiento del cáncer, por ejemplo en el tratamiento de tumores y/o combatir infecciones microbianas, particularmente infecciones bacterianas.

50 Por lo tanto, los compuestos oligopeptídicos (incluyendo construcciones) de acuerdo con la invención, tienen una utilidad terapéutica en el tratamiento o gestión del cáncer y/o de infecciones microbianas. Por tanto pueden usarse como agentes anticancerosos, o más particularmente, como agentes antitumorales y/o antimicrobianos, más particularmente como agentes antibacterianos.

55 Los compuestos oligopeptídicos pueden por tanto usarse en el tratamiento de cualquier afección (usada ampliamente en el presente documento para incluir cualquier enfermedad o trastorno o cualquier situación clínica) que se beneficiaría del efecto citotóxico de los compuestos de la presente invención. Los compuestos oligopeptídicos por consiguiente encuentran utilidad en cualquier terapia (o tratamiento) que actúe sobre células, y particularmente sobre células cancerosas, por ejemplo, células tumorales, y/o microorganismos, particularmente bacterias.

60 El término "tratamiento" como se usa en el presente documento se refiere en general a cualquier efecto o etapa (o intervención) que resulta ser beneficioso en la gestión de una afección clínica. El tratamiento puede incluir reducir, aliviar, mejorar, ralentizar el desarrollo de, o eliminar la afección o uno o más de sus síntomas, que se esté tratando, con respecto a la afección o síntoma antes del tratamiento, o de algún modo mejorar el estado clínico del sujeto. Un tratamiento puede incluir cualquier etapa clínica o intervención que contribuya a, o que sea parte de, un programa o régimen de tratamiento.  
65

“Prevención” o “profilaxis” puede incluir retraso, limitación, reducción o prevención de la afección o la aparición de la afección, o de uno o más de sus síntomas, por ejemplo con respecto a la afección o síntomas antes de la administración del compuesto. La profilaxis por tanto incluye explícitamente la prevención tanto absoluta de la aparición o desarrollo de la afección, o de sus síntomas, y cualquier retraso de la aparición o desarrollo de la afección o síntoma, o reducción o limitación sobre el desarrollo o progresión de la afección o síntoma.

Tratamiento, de acuerdo con la presente invención, incluye por tanto la muerte, la inhibición o la disminución del crecimiento de las células, o el aumento del tamaño de un cuerpo o población de células (por ejemplo, en un tejido, tumor o crecimiento), reducir el número de células o prevenir la propagación de las células (por ejemplo a otro lugar anatómico), reducir el tamaño de un crecimiento celular, etc. El término “tratamiento” no implica curación o anulación o eliminación completa del crecimiento celular, o de un crecimiento de células.

Se incluye el tratamiento de todos los tipos de cánceres, incluyendo, por ejemplo, tumores sólidos y cánceres hematológicos. El término “cáncer” se usa por lo tanto en términos generales en el presente documento para incluir cualquier afección neoplásica; maligna, premaligna o no maligna. Los tipos representativos de cáncer incluyen cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de riñón, cáncer de vesícula biliar, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas, cáncer gastrointestinal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de pulmón, cáncer pulmonar no microcítico, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia (tal como leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda y leucemia mielógena crónica), cáncer de cerebro (por ejemplo astrocitoma, glioblastoma, meduloblastoma), neuroblastoma, sarcomas, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de estómago, cáncer anal, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer endometrial, plasmacitoma, linfomas, retinoblastoma, tumor de Wilms, sarcoma de Ewing, melanoma y otros cánceres de piel.

Puede hacerse mención también a tumores de senos, cánceres uretrales y genitourinarios, cáncer esofágico, mieloma, cánceres endocrinos, osteosarcoma, angiosarcoma y fibrosarcoma, y cualquier tumor del sistema nervioso periférico o central, maligno o benigno, incluyendo gliomas y neuroblastomas.

Los cánceres de particular interés incluyen cáncer de cerebro, de pulmón, de mama y de colon y melanoma.

Como se muestra en los ejemplos más adelante, los compuestos de la invención pueden tener efectos citotóxicos, particularmente contra células cancerosas, o tumores, y/o contra células microbianas, particularmente bacterias.

Más particularmente, los compuestos pueden dirigirse selectivamente a células cancerosas. En otras palabras los compuestos de la invención son selectivos hacia células cancerosas y por consiguiente pueden no tener efectos o si los tienen son mínimos sobre las células normales (no cancerosas). De esta manera, ventajosamente, pueden impedirse efectos citotóxicos no deseables en células no cancerosas. Los compuestos de la presente invención por lo tanto exhiben preferentemente selectividad hacia células cancerosas. Dichas células pueden estar dentro de un tumor sólido, o pueden ser células metastásicas. Los compuestos de la invención no exhiben preferentemente citotoxicidad hacia células no cancerosas.

Adicionalmente, en el contexto de carcinoterapia, los compuestos de la invención son preferentemente eficaces en la mejora o ampliación de la supervivencia, por ejemplo, como se evalúa en un modelo animal experimental, por ejemplo, en un animal en el que se ha inducido un tumor o en el que se ha introducido un tumor o células tumorales. Dicho modelo animal se describe en los ejemplos más adelante. Adicionalmente, los compuestos son preferentemente eficaces en la inhibición del crecimiento tumoral, por ejemplo, en la erradicación de tumores o en la reducción del tamaño del tumor o en la detención o reducción del crecimiento de un tumor, por ejemplo en un modelo animal como se ha comentado anteriormente. Como alternativa o adicionalmente, los compuestos también son preferentemente eficaces en la prevención o reducción de la propagación de un tumor, o del potencial metastásico de un tumor. De nuevo esto puede evaluarse en un modelo animal como se ha indicado anteriormente.

Los compuestos de la invención pueden ocasionar lisis y/o apoptosis de las células cancerosas. Los Ejemplos más adelante demuestran que se observaron efectos tanto líticos como apoptóticos cuando los compuestos de acuerdo con la invención se aplicaron a diversos tipos de células. Por tanto, los compuestos de la invención pueden ocasionar la lisis de células cancerosas (tumores). La lisis se produce como resultado de la desintegración de la membrana celular, que produce la muerte celular. Los expertos en la técnica conocen métodos de determinación de lisis celular. Los Ejemplos a continuación ilustran cómo podría llevarse a cabo esto.

Como alternativa o adicionalmente los compuestos de la invención pueden ocasionar la apoptosis de células cancerosas. La apoptosis es el proceso de muerte celular programada (MCD) que puede producirse en organismos multicelulares. La muerte celular programada implica una serie de acontecimientos bioquímicos que conducen a una morfología celular característica y a la muerte; incluyendo formación de ampollas, cambios en la membrana celular tal como pérdida de asimetría y unión de la membrana, contracción celular, fragmentación nuclear, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN cromosómico. En la técnica se conocen bien experimentos para determinar si una célula está sufriendo o no, o ha sufrido apoptosis (y véanse los Ejemplos más adelante). Los compuestos de la invención pueden ser líticos y/o apoptóticos hacia células cancerosas, preferentemente ambas cosas.

5 En un aspecto preferido de la invención, los compuestos oligopeptídicos de la invención son citotóxicos contra bacterias, es decir son bactericidas. La lisis de diversos tipos de bacterias por los compuestos de la invención se demuestra en los Ejemplos. Los compuestos de la invención pueden usarse en el tratamiento o prevención de infección por cualquier microorganismo, incluyendo cualquiera de los microorganismos indicados anteriormente, pero preferentemente bacterias, incluyendo cualquiera de las bacterias indicadas anteriormente. En particular, la infección puede ser una infección por patógenos. Cabe destacar las infecciones causadas por *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Serratia*, *Yersinia*, *Peptostreptococcus*, *Bacteriodes*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Candida*, *Proteus*, *Burkholderia*, *Fusobacterium* y *Mycobacterium*, por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Legionella pneumophila*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* y *Streptococcus pyogenes*.

10 La infección puede ser aguda, o como alternativa crónica, por ejemplo una infección que ha persistido durante al menos 5 o durante al menos 10 días, particularmente durante al menos 20 días, más particularmente durante al menos 30 días, más particularmente durante al menos 40 días.

15 En una realización, este aspecto de la invención puede comprender una etapa en la que el sujeto se diagnostica como un candidato que está en riesgo de desarrollar una infección o que podría beneficiarse de haberse tratado de una infección existente.

20 Se incluye el tratamiento de septicemia, choque séptico, asepsia, meningitis o envenenamiento por toxinas microbianas, por ejemplo, toxina del cólera y toxina botulínica, así como el tratamiento de más infecciones localizadas, por ejemplo de sitios, tejidos u órganos particulares.

25 Una infección puede producirse en cualquier sujeto, pero algunos sujetos serán más susceptibles que otros a las infecciones. Los sujetos que son susceptibles a infecciones incluyen, pero sin limitación, sujetos cuya barrera epitelial y/o endotelial está debilitada o comprometida, sujetos cuyas defensas basadas en secreciones contra infección microbiana se han anulado, alterado, debilitado o menoscabado, y sujetos que están inmunocomprometidos, que son inmunodeficientes o inmunosuprimidos (por ejemplo, un sujeto en el que alguna parte del sistema inmunitario no está funcionando normalmente, o que funciona por debajo de lo normal, en otras palabras, en el que alguna parte de la respuesta inmunitaria, o una actividad inmunitaria, esta reducida o alterada, ya sea debido a una enfermedad o a una intervención clínica o a otro tratamiento, o de cualquier tipo).

30 Los ejemplos representativos de sujetos que son susceptibles a infección incluyen, pero sin limitación, sujetos con una infección preestablecida (por ejemplo, con bacterias, virus, hongos o parásitos tales como protozoos), especialmente sujetos con VIH, sujetos con asepsia y sujetos con choque séptico; sujetos con inmunodeficiencia, por ejemplo, sujetos preparados para someterse o recuperarse de quimioterapia y/o radioterapia, sujetos con trasplante de órgano (por ejemplo, médula ósea, hígado, pulmón, corazón, válvula cardiaca, riñón, etc.) (incluyendo pacientes con autoinjerto, aloinjerto y xenoinjerto), sujetos con SIDA; sujetos que residen en una institución sanitaria, por ejemplo, en un hospital, especialmente sujetos en cuidados intensivos o cuidados críticos (es decir, aquellas unidades relacionadas con el suministro de soporte vital o sistemas de soporte de órganos a pacientes); sujetos que padecen traumatismo; sujetos con quemaduras, sujetos con heridas agudas y/o crónicas; neonatos, ancianos; sujetos con cáncer, especialmente aquellos con cánceres del sistema inmunitario (por ejemplo leucemias, linfomas y otros cánceres hematológicos); sujetos que padecen afecciones autoinmunitarias tales como artritis reumatoide, diabetes mellitus de tipo I, enfermedad de Crohn, especialmente aquellos que se someten a tratamiento inmunosupresor para aquellas enfermedades; sujetos con secreción epitelial o endotelial (por ejemplo, mucosa, lágrimas, saliva) reducida o anulada y/o eliminación de secreción (por ejemplo, sujetos con mal funcionamiento de cilios en el tejido de la mucosa y/o pacientes con mucosa hiperviscosa (por ejemplo, fumadores y sujetos con EPOC, bronquitis, fibrosis quística, enfisema, cáncer de pulmón, asma, neumonía o sinusitis) y sujetos que llevan un dispositivo médico.

35 40 45 50 Por lo tanto, sujetos en los que particularmente pueden combatirse infecciones de acuerdo con la presente invención, incluyen pacientes discapacitados, ya sea debido a una mala perfusión, a un traumatismo repetitivo, a una mala nutrición, mala oxigenación o a una disfunción leucocitaria.

55 Cabe destacar a sujetos que han sufrido traumatismo físico. El propio traumatismo podría ocasionar un debilitamiento en, o comprometer, la barrera epitelial y/o endotelial del sujeto o el sujeto puede volverse inmunocomprometido en respuesta al traumatismo (una respuesta de choque). El término "traumatismo" se refiere en general, a un ataque celular por cuerpos extraños y/o lesión física de células. Entre los cuerpos extraños se incluyen microorganismos, particularmente materia, agentes químicos y similares. Entre las lesiones físicas se incluyen lesiones mecánicas; lesiones térmicas, tales como las resultantes de calor o frío excesivo; lesiones causadas por electricidad, tales como las causadas por contacto con fuentes de potencial eléctrico; y daños por radiación causados, por ejemplo, por exposición prolongada, extensiva, a radiaciones de infrarrojo, ultravioleta o ionizantes.

60 65 También cabe destacar, en particular, sujetos que tienen una quemadura. Cualquier quemadura, en particular una quemadura grave, tiene un impacto significativo sobre la integridad de la barrera epitelial y/o endotelial del sujeto y el

sujeto a menudo se volverá inmunocomprometido en respuesta a la quemadura (una respuesta de choque).

Los agentes típicos causantes de quemaduras son extremos de temperatura (por ejemplo fuegos y líquidos y gases a temperatura extrema), electricidad, productos químicos corrosivos, rozamiento y radiación. El grado y la duración de la exposición, junto con la intensidad/fuerza del agente, dará como resultado quemaduras de diversa gravedad. El escaldado (es decir, traumatismo asociado con líquidos y/o gases a alta temperatura) se considera que es una quemadura.

La invención también puede usarse para el tratamiento o la prevención de infección de heridas, ya sea agudas o crónicas. Las heridas agudas son heridas que sistemáticamente avanzan a través de las tres fases reconocidas del proceso de curación (es decir, la fase inflamatoria, la fase proliferativa y la fase de remodelación) sin una evolución prolongada. Las heridas crónicas sin embargo, son aquellas heridas que no completan la secuencia sistemática de los eventos bioquímicos del proceso de curación porque la herida se ha estancado en una de las fases de curación. Comúnmente, las heridas crónicas se estancan en la fase inflamatoria. Una herida crónica puede definirse como una herida que no se ha curado al cabo de al menos 40 días, particularmente de al menos 50 días, más particularmente de al menos 60 días, más particularmente de al menos 70 días. Las heridas están en un entorno ideal para la infección, particularmente infección crónica, debido a que carecen de una barrera epitelial y a la disponibilidad de un sustrato y una superficie para la unión y colonización microbiana. Problemáticamente, la infección de una herida a menudo retrasa la curación posterior y por tanto hace que la herida sea más susceptible a una infección establecida.

Los compuestos pueden por tanto usarse para tratar infecciones dondequiera que puedan producirse en el interior, o sobre, el cuerpo. Por tanto, en otra realización, la infección puede deberse a una infección por un dispositivo médico, particularmente un dispositivo médico permanente.

Los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden usarse como agentes de asistencia sanitaria oral, por ejemplo, en el control de placa dental, por ejemplo, para reducirla o prevenirla, para reducir o retrasar su desarrollo, causando la muerte de los microorganismos de la placa o inhibiendo la replicación o el crecimiento de dichos microorganismos. También pueden usarse oligómeros de alginato en el tratamiento y prevención de infecciones o enfermedades infecciosas que pueden producirse en la cavidad oral, por ejemplo, gingivitis y periodontitis.

Los compuestos de la invención pueden usarse como un tratamiento profiláctico, por ejemplo, para prevenir, o al menos minimizar el riesgo de infección o contaminación (por ejemplo por un patógeno). Esto puede ser de utilidad en el cuidado de pacientes hospitalizados ya que el riesgo de contraer una infección nosocomial (comúnmente conocida como infección relacionada con/adquirida en un hospital, o una infección asociada con el cuidado sanitario), por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Enterococcus* resistente a vancomicina, puede minimizarse con un régimen profiláctico de los compuestos definidos en el presente documento. Este aspecto de la invención es también de particular utilidad en el cuidado de los sujetos que padecen traumatismo, sujetos con una quemadura y sujetos con heridas, todos ellos, como se comentado anteriormente, son más susceptibles a infección microbiana que un sujeto que no está afectado de modo similar.

Una cantidad "farmacéuticamente eficaz" del compuesto oligopeptídico es la cantidad que proporciona un efecto cuantificable (por ejemplo un efecto citotóxico o citostático) en la célula diana y/o un efecto cuantificable en la afección a la cual se va a dirigir. Preferentemente es una cantidad suficiente para ocasionar directamente la muerte de la célula o inhibir su crecimiento. Esta cantidad puede determinarse con referencia a prácticas convencionales para decidir las cantidades de dosificación y el experto podría detectar pruebas de tratamiento satisfactorio a partir de su experiencia y con la ayuda de ensayos rutinarios que se encuentran a su disposición.

El sujeto puede ser cualquier sujeto humano o un sujeto animal no humano, pero más particularmente puede ser un vertebrado, por ejemplo, un animal seleccionado de mamíferos, aves, anfibios, peces y reptiles. El animal puede ser un animal de granja o un animal doméstico o un animal de valor comercial, incluyendo animales de laboratorio o un animal de zoológico o reserva. Los animales representativos por lo tanto incluyen perros, gatos, conejos, ratones, cobayas, hámsters, caballos, cerdos, ovejas, cabras, vacas, pollos, pavos, pintadas, patos, gansos, loros, periquitos, palomas, salmón, trucha, bacalao, abadejo, lubina y carpa. Los usos veterinarios de la invención están por tanto cubiertos. El sujeto puede considerarse como un paciente. Preferentemente el sujeto es un ser humano.

Como se ha indicado anteriormente, en cuanto a los efectos antimicrobianos de los compuestos de la invención, estos no están limitado a usos médicos (es decir, el tratamiento o la prevención de infecciones) y también quedan cubiertos usos no médicos, por ejemplo, para combatir contaminación o colonización microbiana (por ejemplo, en, dentro o sobre sitios o lugares inanimados) por ejemplo, con fines de desinfección o limpieza.

Por tanto, más generalmente, la invención incluye un método para inhibir la viabilidad y/o el crecimiento de una célula microbiana (o como alternativa, de un microorganismo, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula (o microorganismo) con un compuesto oligopeptídico como se ha indicado anteriormente en el presente documento. En particular, el método es un método *in vitro*. Por tanto, este aspecto puede considerarse como

alternativa como un método para inhibir la viabilidad y/o el crecimiento de un microorganismo, o para combatir la contaminación o colonización microbiana, en un sitio inanimado, comprendiendo dicho método poner en contacto dicho sitio con un compuesto oligopeptídico como se ha definido anteriormente en el presente documento. "Combatir", como se usa en este contexto, incluye inhibir (es decir reducir o prevenir) la contaminación o colonización microbiana, así como tratar una contaminación o colonización existente.

El término "poner en contacto" incluye cualquier medio de suministro del compuesto al microorganismo o al sitio, ya sea directa o indirectamente, y por tanto cualquier medio de aplicación del compuesto al microorganismo o al sitio o de exposición del microorganismo o del sitio al compuesto, por ejemplo, la aplicación del compuesto directamente en el microorganismo o sitio.

Más particularmente el microorganismo o el sitio se pondrá en contacto con una cantidad eficaz del compuesto alginato, más particularmente una cantidad eficaz del compuesto, para inhibir directamente la viabilidad (por ejemplo, causar la muerte) del microorganismo o para inhibir directamente el crecimiento del microorganismo.

El sitio o lugar del microorganismo no está limitado. El microorganismo puede estar presente en una superficie. El sitio no está limitado e incluye cualquier sitio sobre el cual, o en el que, puede aparecer un microorganismo o puede exponerse a un contacto o contaminación microbiana. Por tanto particularmente se incluyen (sitios en) maquinaria, en concreto, maquinaria industrial o equipo médico o cualquier sitio expuesto a un entorno acuático (por ejemplo, equipo marino o barcos o embarcaciones o sus partes o componentes), o cualquier sitio expuesto a cualquier parte del entorno, por ejemplo, tuberías o en construcciones. Dichos sitios inanimados expuestos a contacto o contaminación microbiana incluyen, en particular, cualquier parte de: equipos o maquinaria de procesamiento, preparación, conservación o dispensación de alimentos y bebidas, aparatos de aire acondicionado, maquinaria industrial, por ejemplo, en plantas de procesamiento químico o biotecnológico, tanques de almacenamiento, equipo médico o quirúrgico y equipo de cultivo de células y tejidos. Cualquier aparato o equipo para llevar o transportar o suministrar materiales es susceptible a contaminación microbiana. Dichas superficies incluirán particularmente tuberías (cuyo término se usa generalmente en el presente documento para incluir cualquier conducto o línea). Como superficies representativas inanimadas o abióticas se incluyen, pero sin limitación, equipos o superficies de procesamiento, conservación, dispensación o preparación de alimentos, tanques, cintas transportadoras, pisos, tubos de drenaje, refrigeradores, congeladores, superficies, paredes, válvulas, cintas, tuberías de equipos, conductos de aire acondicionado, refrigeradores, líneas de dispensación de alimentos o bebidas, intercambiadores térmicos, cascos de embarcaciones o cualquier parte de una estructura de embarcación que está expuesta al agua, líneas de agua dentales o conductos perforadores, lentillas y cajas de almacenamiento.

Como se ha indicado anteriormente, el equipo médico o quirúrgico o dispositivos representan una clase particular de superficie sobre la cual puede formarse contaminación microbiana. Esto puede incluir cualquier tipo de línea, incluyendo catéteres (por ejemplo, catéteres venoso central y urinarios), dispositivos protésicos, por ejemplo, válvulas cardíacas, articulaciones artificiales, dientes postizos, coronas dentales, fundas dentales e implantes de tejido blando (por ejemplo implantes de mama, glúteo y labios). Se incluye cualquier tipo de dispositivo médico implantable (o "permanente") (por ejemplo, estents, dispositivos intrauterinos, marcapasos, conductos de intubación, prótesis o dispositivos protésicos, líneas o catéteres). Un dispositivo médico "permanente" puede incluir un dispositivo cuya cualquier parte del mismo está incluida dentro del cuerpo, es decir, el dispositivo puede ser completa o parcialmente permanente.

El sitio también puede ser un alimento, por ejemplo, carne, ave de corral, cerdo, verduras, frutas, pescado, marisco, combinaciones de los mismos y similares, productos de higiene personal, artículos de tocador, cosméticos, etc.; productos químicos o industriales y reactivos, etc.; materiales de residuos clínicos, científicos o industriales, etc. Por tanto los compuestos pueden usarse como agentes conservantes o descontaminantes en materiales, especialmente líquidos y soluciones.

En determinadas realizaciones ventajosas de la invención los compuestos pueden usarse junto con, o en combinación con, un segundo o agente antimicrobiano adicional (en lo sucesivo en el presente documento "agente antimicrobiano adicional").

En el contexto de un uso médico, dicho agente antimicrobiano puede ser cualquier agente antimicrobiano clínicamente útil y particularmente un antibiótico o un agente antivírico o antifúngico. En el contexto de usos no clínicos, el agente antimicrobiano puede ser de nuevo cualquier agente antimicrobiano usado para dichos propósitos, por ejemplo, cualquier agente desinfectante o antiséptico o limpiador o agente esterilizante. Los agentes pueden usarse por separado, o juntos en la misma composición, de manera simultánea o secuencial o por separado, por ejemplo, a cualquier intervalo de tiempo deseado.

La elección del agente antimicrobiano requerirá, por supuesto, ser apropiada para el tratamiento o uso en cuestión, pero pueden usarse, por ejemplo, agentes antimicrobianos, por ejemplo antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antisépticos y/o condiciones esterilizantes tales como radiación (por ejemplo UV, rayos X, gamma), extremos de temperatura y extremos de pH.

El agente antimicrobiano adicional puede aplicarse convenientemente antes, simultáneamente con o después del compuesto. Convenientemente, el agente antimicrobiano adicional se aplica sustancialmente al mismo tiempo que el compuesto o después de este. Para optimizar el efecto antimicrobiano del agente antimicrobiano adicional este puede proporcionarse (por ejemplo administrarse o suministrarse) repetidamente a momentos apropiados para el agente usado. El experto en la técnica será capaz de concebir una dosificación adecuada o un régimen de uso adecuado. En tratamientos prolongados el compuesto también puede usarse repetidamente. La frecuencia requerida dependerá del microorganismo, del sitio, de la enfermedad, de la utilidad, de la composición y del agente antimicrobiano que se utilice, etc. y el experto en la materia será capaz de optimizar los patrones de dosificación o uso para optimizar los resultados.

De manera similar o análoga, en el contexto de la carcinoterapia descritas en el presente documento, los compuestos de la invención pueden usarse en combinación o junto con otros agentes anticancerosos, por ejemplo agentes quimioterapéuticos o antineoplásicos o cualquier agente que pueda estar indicado para una indicación oncológica o hematológica.

Por tanto, los compuestos de la invención pueden usarse en combinación con otros agentes terapéuticos, por ejemplo, administrarse conjuntamente, en una sola formulación o composición farmacéutica, o por separado (es decir, administración por separado, secuencial o simultánea). Por tanto, los compuestos de la invención pueden combinarse con un segundo (o adicional) agente terapéuticamente activo, por ejemplo, en un kit farmacéutico o como un producto combinado ("combinación").

Por tanto un aspecto adicional de la presente invención proporciona un producto que contiene un compuesto oligopeptídico o una molécula de ácido nucleico como se define en el presente documento y un segundo agente activo (por ejemplo agente anticanceroso o antimicrobiano) como una preparación combinada para un uso por separado, simultáneo o secuencial (por ejemplo aplicación a un microorganismo o sitio y/o administración a un sujeto) en la inhibición de la viabilidad y/o del crecimiento de una célula cancerosa o microbiana, o más particularmente en el tratamiento de un cáncer o para combatir una infección microbiana o contaminación o colonización microbiana de un sitio, o por supuesto, cualquiera de los usos descritos o definidos en el presente documento.

El experto en la materia tendrá en cuenta métodos adecuados para introducir el compuesto oligopeptídico o la molécula de ácido nucleico en las células. Como ejemplo, algunos métodos adecuados se analizan brevemente más adelante. Como se comentó con detalle anteriormente, pueden usarse métodos de suministro mediados por péptidos, en concreto, péptidos penetradores de células (PPC), que como se ha comentado anteriormente, son secuencias cortas, en algunos casos policatiónicas, que pueden facilitar la captación celular de péptidos, proteínas o moléculas nucleotídicas que contienen los PPC o a los que se unen los PPC, por ejemplo, potenciando la captación en endosomas de células de mamífero. La microencapsulación proporciona un modo sencillo y rentable para incorporar materiales bioactivos dentro de una membrana polimérica semipermeable, buscando la protección de los materiales bioactivos y la liberación de las sustancias incorporadas o sus productos de una manera controlada. En la internalización fotoquímica (IFQ) tanto la molécula de interés como el compuesto fotosensibilizador son captados por la célula en un lisosoma o en un endosoma. Las células se exponen después a la luz de longitudes de onda adecuadas para activar el compuesto fotosensibilizador, haciendo que el compuesto fotosensibilizador altere la membrana del lisosoma o endosoma, liberando de este modo la molécula de interés en el citosol de la célula.

Otros métodos incluyen la microinyección, la fusión mediada por eritrocitos fantasmas, fusión de liposomas, lisis osmótica de pinosomas, carga de raspaduras, electroporación, transfección mediada por fosfato de calcio y virus y el uso de transportadores copoliméricos.

El quitosano y los derivados de quitosano solubles en agua, en particular glicol quitosano, están emergiendo como los transportadores de fármacos de elección debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad *in vivo*. Un ejemplo preferido es el glicol quitosano modificado hidrofólicamente con ácido 5  $\beta$ -colánico.

El "compuesto oligopeptídico" de la invención puede incorporar uno o más, por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, que poseen una cadena lateral, que no están codificados por el código genético estándar, denominados en el presente documento "aminoácidos no codificados". Estos pueden seleccionarse de aminoácidos que se forman a través de procesos metabólicos tales como ornitina o taurina y/o aminoácidos artificialmente modificados tales como aminoácidos protegidos con 9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonil (Fmoc), (*tert*)-(B)util (o)xi (c)arbonil (Boc), 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonil (Pmc) o aminoácidos que tienen el grupo benziloxi-carbonilo (Z).

La estabilidad *in vitro* y/o *in vivo* de los compuestos oligopeptídicos de la invención puede mejorarse o potenciarse a través del uso de medios estabilizadores o protectores conocidos en la técnica, por ejemplo en la adición de grupos protectores o estabilizadores, la incorporación de derivados o análogos de aminoácidos o modificación química de aminoácidos. Dichos grupos protectores o estabilizadores pueden añadirse, por ejemplo, en el extremo N y/o C. Un ejemplo de dicho grupo es un grupo acetilo y en la técnica se conocen otros grupos protectores o grupos que podrían estabilizar un péptido.

Los ejemplos indicados más adelante muestran que los compuestos oligopeptídicos modificados de la invención que se han modificado para incluir D-aminoácidos pueden conservar la actividad anticancerosa o antimicrobiana de la invención.

5 Por tanto, en una realización, los compuestos oligopeptídicos de la invención comprenden solo aminoácidos que tienen la configuración L, pero en una realización adicional están presentes uno o más aminoácidos que tienen la configuración D. El compuesto oligopeptídico puede contener al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 D-aminoácidos. Preferentemente, el compuesto oligopeptídico contiene todos los D- aminoácidos. Por tanto, se incluyen particularmente compuestos oligopeptídicos inversos o análogos inversos de los compuestos  
10 oligopeptídicos de la invención (y más particularmente péptidos inversos).

Los compuestos “retro” oligopeptídicos (o retro péptidos) son aquellos en los que los restos (por ejemplo, restos de aminoácido) se ensamblan en dirección opuesta al compuesto parental o de referencia (por ejemplo, péptido). Por ejemplo, cuando la secuencia de SEQ ID NO: 1 o de SEQ ID NO: 40 se invierte, se obtienen las secuencias  
15 expuestas en las SEQ ID NO: 2 y 41, respectivamente.

Los compuestos retro-inverso oligopeptídicos incluyen D-aminoácidos en orden inverso (opuestos) a la secuencia del compuesto parental o de referencia. Por tanto, un análogo retro-inverso ha invertido los extremos y ha invertido el orden de, por ejemplo, los enlaces peptídicos, al mismo tiempo que mantiene aproximadamente la topología de  
20 las cadenas laterales como en la secuencia de referencia o parental.

Los compuestos de la invención pueden incluir secuencias inversas parciales. En una realización preferida el compuesto es inverso. Por “compuesto oligopeptídico” se entiende un compuesto que está constituido por aminoácidos o subunidades equivalentes, que están ligadas entre sí mediante enlaces peptídicos o equivalentes.  
25 Por tanto, la expresión “compuesto oligopeptídico” incluye péptidos y peptidomiméticos.

Por “subunidad equivalente” se entiende una subunidad que es estructural y funcionalmente similar a un aminoácido. El resto estructural de la subunidad puede diferir de un aminoácido convencional, por ejemplo puede incorporar uno o más átomos de nitrógeno en lugar de uno o más átomos de carbono.  
30

Por “peptidomimético” se entiende un compuesto que es funcionalmente equivalente o similar a un péptido y que puede adoptar una estructura tridimensional similar a la de sus homólogos peptídicos, pero no está exclusivamente compuesto por aminoácidos ligados por enlaces peptídicos. Una clase preferida de peptidomiméticos son los peptoides, es decir, glicinas *N*-sustituidas. Los peptoides están muy relacionados con sus homólogos peptídicos  
35 naturales, pero difieren químicamente en que sus cadenas laterales están anexas a átomos de nitrógeno a lo largo del esqueleto de molécula, en lugar de a carbonos  $\alpha$ , como ocurre en los aminoácidos.

Los peptidomiméticos tienen típicamente una semivida más larga dentro del cuerpo del paciente, de manera que se prefieren en realizaciones en las que se desea un efecto más prolongado. Esto puede ayudar a reducir la frecuencia a la cual la composición debe volver a administrarse. Sin embargo, por razones de bioseguridad, en otras realizaciones puede preferirse una semivida más corta; en esas realizaciones se prefieren los péptidos.  
40

Más preferentemente, el compuesto oligopeptídico es un péptido. El compuesto oligopeptídico puede incorporar diaminoácidos y/o  $\beta$ -aminoácidos. Más preferentemente, el compuesto oligopeptídico consiste en  $\alpha$ -aminoácidos.  
45

El prefijo “oligo” se usa para designar un número relativamente pequeño de subunidades tales como aminoácidos, es decir, menos de 200, preferentemente menos de 100, 90, 80, 70, 60 o 50 subunidades. El compuesto oligopeptídico de la invención puede por tanto comprender no más de 50, 45, 40, 35, 30, 29, 28, 27, 26 o 25 subunidades. Los intervalos de subunidades representativas por tanto incluyen 25-50, 25-45, 25-40, 25-35, 25-32 y  
50 25-30.

Los compuestos oligopeptídicos de la presente invención pueden comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO 40.  
55

La identidad de secuencia puede evaluarse mediante cualquier método conveniente. Sin embargo, para determinar el grado de identidad de secuencia entre las secuencias, son útiles programas informáticos que hacen alineamientos de secuencias múltiples, por ejemplo, Clustal W (Thompson et al., (1994) *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680). Los programas que comparan y alinean pares de secuencias, como ALIGN (Myers et al., (1988) *CABIOS*, 4: 11-17), FASTA (Pearson et al., (1988) *PNAS*, 85: 2444-2448; Pearson (1990), *Methods Enzymol.*, 183: 63-98) y BLAST con huecos (Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402) también son útiles para esta finalidad. Adicionalmente, el servidor Dali en el European Bioinformatics institute ofrece alineamientos basados en estructuras de secuencias de proteínas (Holm (1993) *J. Mol. Biol.*, 233: 123-38; Holm (1995) *Trends Biochem Sci.*, 20: 478-480; Holm (1998) *Nucleic Acid Res.*, 26: 316-9).  
60  
65

Los cálculos de los alineamientos de secuencias múltiples y del porcentaje de identidad pueden determinarse usando los parámetros BLAST convencionales (usando secuencias de todos los organismos disponibles, la matriz Blosum 62, costes por hueco: existencia 11, extensión 1). Como alternativa, puede usarse, el siguiente programa y parámetros: Programa: Align Plus 4, versión 4.10 (Sci Ed Central Clone Manager Professional Suite). Comparación de ADN: comparación Global, matriz de Puntuación Lineal Convencional, penalización por emparejamiento erróneo = 2, penalización por apertura de hueco = 4, penalización por extensión de hueco = 1. Comparación de aminoácidos: Comparación Global, matriz de Puntuación BLOSUM 62.

Por tanto, en la presente divulgación se incluyen variantes de las secuencias indicadas o proporcionadas, siempre que la variante del compuesto oligopeptídico conserve la actividad funcional del parental, es decir, las variantes son funcionalmente equivalentes, en otras palabras, tienen o exhiben una actividad del compuesto parental, como se define en el presente documento, (por ejemplo, un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y/o viabilidad de las células cancerosas y/o microbianas, actividad citotóxica, actividad antitumoral o antibacteriana, etc.). Dichas variantes pueden comprender sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos (incluyendo truncamientos en uno o ambos extremos) de la secuencia parental, por ejemplo, de uno o más, por ejemplo, de 1 a 6, aminoácidos.

También se incluyen derivados funcionalmente equivalentes en los que uno o más de los aminoácidos están químicamente derivatizados, por ejemplo, sustituidos con un grupo químico.

Los compuestos oligopeptídicos pueden comprender fragmentos de SEQ ID NO: 1, 2, 40 o 41 siempre que el compuesto conserve la actividad requerida. Los fragmentos de SEQ ID NO: 1 o 2 pueden tener por ejemplo una longitud de 7 a 14 restos, por ejemplo, de 12 o 13 restos. Los fragmentos de SEQ ID NO: 40 o 41 pueden tener una longitud de 13 a 26 restos, por ejemplo, 13, 14, 15, 16 o 17 a 26 restos de longitud.

Como se describe más adelante en los Ejemplos, el péptido de SEQ ID NO: 40 es un péptido fuertemente catiónico que tiene, a un pH de 7,0, una carga neta de 12 y un elevado punto isoeléctrico ( $pI$ ) de 12,4. Se prefiere que los compuestos de la presente divulgación, y por tanto sus variantes funcionalmente equivalentes, incluyendo sus fragmentos, tengan propiedades similares. En otras palabras, se prefiere que las variantes, incluyendo los fragmentos, conserven las propiedades físico-químicas del compuesto parental. Dichas propiedades incluyen en particular que sean catiónicos. El péptido de SEQ ID NO: 40 tiene una estructura  $\alpha$ -helicoidal. En determinadas realizaciones, los compuestos de la invención pueden tener una estructura  $\alpha$ -helicoidal, pero esto no es una característica esencial; en otras realizaciones los compuestos tener una estructura de lámina  $\beta$ , o pueden tener otra estructura, o una estructura desordenada, por ejemplo una espiral, o el compuesto puede tener una estructura compuesta con dominios de estructura diferente.

En realizaciones representativas preferidas, los compuestos de la presente divulgación, incluyendo variantes funcionalmente equivalentes de SEQ ID NO: 40, pueden tener una o más de las siguientes propiedades:

- una carga neta, a un pH de 7,0, de 10-13, por ejemplo, de 11-12,5;
- un  $pI$  de 12 a 13;
- una hidrofiliidad promedio de 0,7 a 1,0, por ejemplo, de 0,8 a 1,0.
- una proporción de restos hidrófilos/número total de restos de 45-60 %, por ejemplo, 46-58 %, 48-58 %, o 50-56 %.

El compuesto oligopeptídico de la invención puede formar parte de una unidad más larga, por ejemplo, puede fusionarse con un polipéptido para formar una proteína de fusión recombinante o unirse a un armazón para formar un aptámero peptídico. Por tanto, las proteínas de fusión o aptámeros que incorporan el compuesto oligopeptídico de la invención forman aspectos adicionales de la presente invención. Otros aspectos adicionales incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden dichas proteínas de fusión o aptámeros y el uso de dichas proteínas de fusión o aptámeros en terapia o un método de tratamiento como se describe anteriormente.

También se contempla la administración *in vitro* de un compuesto oligopeptídico, de una molécula de ácido nucleico y/o de un vector, como se define en el presente documento, a una célula o a un cultivo celular. Dichos métodos *in vitro* pueden usarse para estudiar los efectos citotóxicos de los compuestos de la invención.

La invención se describirá ahora adicionalmente en los siguientes Ejemplos no limitantes, con referencia a las siguientes Figuras en las que:

La Figura 1 muestra el efecto sobre la supervivencia celular después de 24 horas de tratamiento con los 96 péptidos sintéticos diseñados para la exploración. El péptido de SEQ ID NO: 40, identificado como "Péptido 1", dio como resultado la menor absorbancia, indicando una menor supervivencia celular (el Péptido 1 se indica con una flecha cerca de la barra más corta del gráfico de la Figura 1).

La Figura 2 muestra los efectos morfológicos determinados con un microscopio óptico en células después de 20 minutos de cultivo con tres de los 96 péptidos.

La Figura 3 muestra los efectos en células en cultivo monocapa del Péptido 1 en forma de todos L-aminoácidos (SEQ ID NO: 40), el Péptido 1 en forma retroinversa (ri), es decir todos los D-aminoácidos en secuencia inversa (SEQ ID NO: 41) y el Péptido 1 (SEQ ID NO: 40) en forma de todos D-aminoácidos.

5 La Figura 4 muestra análisis MTT del Péptido 1 en HFF1 (fibroblastos de prepucio humano), T986 (neuroblastoma), GaMG (glioblastoma) y A172 (glioblastoma) a diferentes concentraciones peptídicas administradas a momentos diferentes. Se observó una fracción de supervivencia inferior para las líneas de células tumorales en comparación con las células HFF1.

10 La Figura 5 muestra los resultados del ensayo de viabilidad de células VIVAS/MUERTAS de dos líneas celulares normales (células 142 y células HFF1) así como de dos líneas celulares cancerosas, células de carcinoma 143 y una línea celular de sarcoma HOS) tratadas con 2,5 a 30  $\mu\text{g/ml}$  de péptido respectivamente. En comparación con las líneas celulares normales se observó una fuerte acción citotóxica para las dos líneas celulares cancerosas.

15 La Figura 6 (A) muestra imágenes de microscopía electrónica de barrido a alta resolución de células después de tratamiento con el Péptido 1. (B) muestra la parte N terminal marcada de los péptidos con tiocianato de fluoresceína.

La Figura 7 muestra que la inyección local del Péptido 1 en tumores 4T1 en ratones induce un fuerte efecto inhibitor del crecimiento del tumor 4T1.

20 La Figura 8 muestra los resultados de experimentos de supervivencia de Kaplan Meier, que compara animales tratados y no tratados a los que se inyecta por vía subcutánea células de cáncer 4T1. Los animales se sacrificaron cuando mostraron signos de enfermedad sistémica, basándose en una carga tumoral grave.

25 La Figura 9 muestra análisis histológicos de los tumores a partir de los experimentos de supervivencia de Kaplan Meier.

La Figura 10 muestra liposomas 200 nm que contiene diferentes composiciones de fosfolípidos en la bicapa lipídica. Los liposomas se cargaron con un colorante fluorescente y la salida del colorante se midió después del tratamiento del Péptido 1 (Péptido X en la Figura 10). El colorante se refiere a un fluoróforo ANTX, y a un desactivador, DPX, y la liberación de colorante se refiere al % de liberación total con detergente (Triton x100).

30 La Figura 11 muestra la microscopía confocal con tiempo de espera visualizando la alteración de la membrana y la liberación de ds Red de las células a diferentes momentos. Las flechas blancas destacan células que pierden rápidamente el contenido citoplasmático de ds Red producido por la alteración de la membrana.

La Figura 12 muestra una explicación teórica de los efectos observados de la alteración de la membrana.

La Figura 13 muestra los resultados sobre el crecimiento de tres cepas de bacterias cuando se incuban con y sin Péptido 1 durante dos horas.

La Figura 14 muestra que la carga neta, a un pH de 7,0, del Péptido 1 es de 12; el punto isoeléctrico es de 12,4; la hidrofobicidad promedio es de 1; y la proporción de restos hidrófilos/número total de restos es del 56 %.

## 45 Ejemplos

### Ejemplo 1 – Diseño inicial y exploración de 96 péptidos y efectos sobre la supervivencia y morfología de células cancerosas

#### 50 *Diseño y producción del péptido*

Usando los motores de búsqueda Expasy y Swissprot, se identificaron posibles elementos conservados y sitios activos de supresores tumorales conocidos (véase la Tabla 2). Se identificaron 96 péptidos. La secuencia TAT se unió en el extremo N para el suministro intracelular. Los péptidos se sintetizaron en el Cambridge Peptides (Cambridge, UK) y en Genscript (NJ, USA). Todos se amidaron y acetilaron. Los péptidos sintetizados se disolvieron en agua a una concentración final de 1 mg/ml.

#### *Cultivo celular*

60 Las líneas celulares U87, MCF7, SF295, T47D y 4T1 se obtuvieron del banco de tumores de la Universidad de Bergen, Noruega. Los fibroblastos se obtuvieron de donantes sanos. Todas las líneas celulares se cultivaron en DMEM (Sigma, St. Louis, MO, USA) que contenía suero bovino fetal al 10 % complementado con NEAA, Pen/Estrep 100 U/ml y L-glutamina 400  $\mu\text{M}$ , todo ello de Cambrex (East Rutherford, NJ, USA). En todos los experimentos se distribuyeron  $1 \times 10^4$  células en una placa de 96 pocillos.

65

*Supervivencia celular*

En la figura 1 se muestran los resultados de supervivencia celular en la exploración inicial de la línea celular de glioma U87 después de 24 horas de cultivo con los 96 péptidos que se identificaron. Se observaron tres péptidos que tenían un efecto notable negativo sobre la viabilidad de las células cancerosas. De estos, se seleccionó el Péptido 1 (SEQ ID NO: 41) para estudios adicionales.

El "Péptido 1" corresponde a la secuencia peptídica de SEQ ID NO: 1 con la secuencia TAT del VIH de SEQ ID NO: 36 en su extremo N terminal.

*Morfología celular*

Después de 20 minutos de cultivo con tres de los 96 péptidos, la morfología celular se determinó por microscopía óptica y microscopía con tiempo de espera (*time-lapse*) y los resultados se muestran en la Figura 2. Los resultados muestran una contracción masiva de procesos celulares y la aparición de células picnóticas, indicando muerte celular.

*Estabilización de péptidos*

Un problema principal con los péptidos en general es que están sometidos a degradación proteolítica, particularmente por proteasas presentes en el suero. Por lo tanto los inventores diseñaron una estrategia para estabilizar los péptidos sustituyendo los L-aminoácidos con D-aminoácidos. Los estudios muestran que los péptidos no pierden su efecto en medios complementados con suero. De hecho, los péptidos también son resistentes a la degradación proteolítica en tripsina. La Figura 3 indica la eficacia de los péptidos sustituidos en cultivos monocapa indicando que los péptidos sustituidos funcionan incluso mejor que los péptidos originales.

Ejemplo 2 – Efectos *in vitro* del Péptido 1 sobre células cancerosas

*Viabilidad celular, comparación entre células normales y líneas de células cancerosas in vitro. Ensayo de viabilidad celular MTT:*

Se usó MTT (Azul Tiazolil Bromuro de Tetrazolio) en la medición de la proliferación celular en estudios que tradicionalmente usan la incorporación de radioisótopos como una medición de la división celular. El MTT es una solución amarillenta y se transforma en MTT-formazan insoluble en agua del color azul oscuro por deshidrogenasas mitocondriales de células vivas. Los cristales azules se solubilizan con isopropanol acidificado y la intensidad se mide colorimétricamente a una longitud de onda de 570 nm (se usó el protocolo para el ensayo MTT de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Usando un ensayo de viabilidad celular MTT, se realizó una comparación entre fibroblastos de prepucio humano (HFF1) normales y tres líneas celulares cancerosas T986 (células de neuroblastoma), GaMG (glioblastoma) y A172 (glioblastoma). A una concentración de 20 µg/ml la fracción de supervivencia estaba entre 19 y 43 % después de una exposición del Péptido 1 durante 90 minutos. En comparación, la fracción de supervivencia para las células HFF1 normales fue de 58 % lo que indica un efecto más fuerte del péptido en las células cancerosas (véase la Figura 4).

*Comparación de la viabilidad celular usando las Sondas Moleculares (kit live/dead)*

El kit de Viabilidad/Citotoxicidad LIVE/DEAD® emplea un colorante fluorescente para evaluar la viabilidad de células de mamífero. Se descubrió que la calceína AM y el homodímero-1 de etidio (EthD-1) eran colorantes óptimos para esta finalidad. Las células vivas se diferencian de las muertas por la presencia de actividad esterasa intracelular, determinada por la conversión enzimática de la calceína AM no fluorescente a calceína intensamente fluorescente. La calceína, que es un colorante polianiónico, se conserva bien dentro de las células vivas produciendo una fluorescencia verde uniforme intensa. El EthD-1 se excluye por membranas intactas de células viables, pero entrará en células con la membrana celular dañada y se unirá a ácidos nucleicos, produciendo una fluorescencia rojo brillante en las células muertas. El protocolo para el uso del kit live/dead lo proporciona el fabricante.

Para cuantificar la acción citotóxica del Péptido 1, 20.000 células se colocaron en discos multipocillo de 24 pocillos. Después de 48 horas, se añadió el péptido 1 a los pocillos a concentraciones que variaban de 0,1 a 35 µg/ml. Después de 1-3-6 horas la viabilidad celular se evaluó usando el kit LIVE/DEAD de Sondas Moleculares. Las células se lavaron brevemente en solución salina tamponada con fosfato (PBS) después de lo cual a las células se añadió EthD-1 10 µM y calceína 5 µM. Después, las células se incubaron en una incubadora de cultivo tisular a 37 °C durante 30 min.

Después, las células se observaron usando un microscopio de fluorescencia invertido (Nikon Eclipse 2000E, Tokio, Japón) dotado con filtros ópticos FITC (fluorescencia verde) y TRITC (fluorescencia roja). Después, las células fluorescentes se fotografiaron a un aumento de 100x. La proporción de células viables (células con fluorescencia verde) y la proporción de células muertas (fluorescencia roja) se evaluó contando 100 células.

Las células de control mostraron una monocapa confluyente que contenía células con una fluorescencia verde. No se observaron células con fluorescencia roja indicando una viabilidad del 100 % (Figura 5). Se observó la misma fluorescencia en células que recibían 0,1, 1, y 5 µg/ml de péptido. Sin embargo se observaron algunas células rojas en monocapas que recibían 10 µg/ml de péptido indicando una ligera acción citotóxica a esta concentración. En cambio, las células que recibían 15 µg/ml de péptido mostraron una proporción bastante grande de células muertas (Figura 5). Las monocapas que recibían 30 µg/ml de péptido mostraron una fuerte acción citotóxica indicando casi el 100 % de células muertas (véase la Figura 5).

Los porcentajes de células vivas y muertas a diferentes concentraciones se muestran en la Tabla 3. La acción lítica del péptido ocurrió después de 1 hora y no se observaron más cambios a las 3 y 6 horas.

#### *Morfología*

La microscopía electrónica de barrido a alta resolución mostró una desintegración total de la membrana plasmática después de tratamiento con péptido indicando que el péptido ejerce una fuerte acción citolítica que afecta a la membrana plasmática (Figura 6A). Mediante análisis morfológicos detallados *in vitro*, también hubo algunas pruebas de fragmentación celular lo que indica inducción de apoptosis. Por lo tanto, se marcó la parte N terminal de los péptidos con tiocianato de fluoresceína (FITC) y se trataron *in vitro*. La inmunofluorescencia poco después de tratamiento, indicó que los péptidos también se acumulaban en el núcleo. Por lo tanto hay algunas pruebas de que los péptidos también desencadenan la apoptosis a través de interacciones con proteínas nucleares. Como se observa en la Figura 6B, el Péptido 1 también se acumula en el núcleo. Basándose en las observaciones morfológicas realizadas en cultivos tisulares también hay algunas pruebas de que el péptido también desencadena la apoptosis.

#### Ejemplo 3 – Efectos *in vivo* del Péptido 1 sobre células cancerosas

El carcinoma mamario 4T1 es una línea celular de tumor trasplantable que es altamente tumorigénica e invasiva y, a diferencia de la mayoría de los modelos tumorales, puede metastatizar espontáneamente desde el tumor primario en la glándula mamaria a sitios distantes múltiples, incluyendo ganglios linfáticos, sangre, hígado, pulmón, cerebro y hueso. El tumor 4T1 tiene diversas características que hacen que sea un modelo animal experimental adecuado para el cáncer mamario humano. En primer lugar, células tumorales se trasplantan fácilmente en la glándula mamaria de tal manera que el tumor mamario crece en el sitio anatómicamente correcto. En segundo lugar, como en el cáncer de mama humano, la enfermedad metastásica 4T1 se desarrolla espontáneamente desde el tumor primario. Además, la propagación progresiva de metástasis 4T1 en los ganglios linfáticos de drenaje y otros órganos es muy similar a la del cáncer mamario humano. Por vía subcutánea se inyectaron  $1 \times 10^6$  células 4T1 en 12 ratones BALBc hembra. 6 animales en el grupo de tratamiento y 6 animales en el grupo de control recibieron una secuencia peptídica mezclada. Cuando los tumores habían alcanzado un tamaño de 0,8 cm (después de 10 días) los tumores recibieron tres inyecciones locales de péptido 400 µg administrado en 100 µl. La concentración total del péptido administrada fue de 1200 µg. Después, los tumores se registraron con calibradores cada 4 días.

#### *Crecimiento tumoral*

Como se muestra en la Figura 7, la inyección local del péptido en el tumor 4T1 indujo un fuerte efecto inhibitor del crecimiento del tumor 4T1 *in vivo*. Los puntos de datos representan valores promedio de seis animales en el grupo de control y grupo de tratamiento.

#### *Supervivencia de los animales*

Se realizaron experimentos de supervivencia de Kaplan Meier, comparando animales tratados y no tratados a los que se inyectaron, por vía subcutánea, células de cáncer 4T1. Los animales se sacrificaron cuando mostraron signos de enfermedad sistémica, basándose en una carga tumoral grave. Como se muestra en la Figura 8, el grupo de tratamiento tuvo una ventaja de supervivencia significativa en comparación con el grupo no tratado. Los tumores se recogieron para análisis histológico. Los tumores extirpados se fijaron en formaldehído tamponado al 4 %. Las secciones embebidas en parafina de 5 µm se tiñeron con H&E. Los cultivos celulares se fijaron en PFA al 4 % y se formaron imágenes con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE2000-E (Nikon, Tokio, Japón). Como se observa en la Figura 9, se observó una necrosis grave después de muerte celular masiva, indicando una fuerte acción citotóxica del péptido.

#### Ejemplo 4 – Experimentos de alteración de membrana *in vitro* e *in vivo*

Se prepararon liposomas 200 nm que contenían diferentes composiciones de fosfolípidos en la bicapa lipídica. Los liposomas se cargaron con un colorante fluorescente y la salida del colorante se midió después del tratamiento con el Péptido 1 (Péptido X en la Figura 10). El colorante se refiere a fluoróforo ANTX, y a un desactivador, DPX, y la liberación de colorante se refiere al % de liberación total con detergente (Triton x100). Como se muestra en la Figura 10, el Péptido 1 tuvo una función intensa como alterador de vesículas, en particular si los fosfolípidos tenían carga

negativa (PBPS:EYL; símbolos de color azul; S0,5 (para un efecto máximo al cincuenta por ciento) = 8,5 µg/ml; 2,46 µM). El péptido también tuvo algunos efectos sobre fosfolípidos neutros (polares) (EYL: símbolos de color verde) pero este efecto fue menor que el de los fosfolípidos con carga negativa. Se usó un péptido de control (péptido A) como una referencia que tenía el mismo tamaño pero diferente secuencia. El Péptido A no tuvo efectos a las concentraciones estudiadas.

Las células de carcinoma mamario 4T1 se transfectaron de manera estable, usando un vector lentiviral, para expresar el marcador fluorescente dsRed. Las células transfectadas acumularán dsRed en el citoplasma y pueden visualizarse fácilmente en el microscopio fluorescente (véase la Figura 11). Después las células se expusieron a 20 µg/ml de Péptido 1 y se realizó microscopía confocal con tiempo de espera durante un periodo de 3 h. Este estudio permite una visualización directa de la alteración de la membrana en células cancerosas.

La Figura 12 muestra una explicación teórica de los efectos observados. Se sabe que las células cancerosas frecuentemente tienen membranas celulares con carga negativa en comparación con las células normales. Un péptido catiónico tendrá escaso efecto sobre las células normales que tienen membranas celulares con menos carga en comparación con las membranas de las células cancerosas, que tienen fosfolípidos más ácidos y fosfatidilserina en la superficie externa, más probablemente debido a un actividad biestable (*flip-flop*) aumentada en la bicapa fosfolipídica. Más probablemente el Péptido 1 se une a fosfolípidos con carga negativa, creando orificios en la bicapa fosfolipídica. Dado que muchas membranas celulares bacterianas tienen carga negativa, también se evaluó la acción del péptido sobre diversas cepas bacterianas.

Ejemplo 5 – Efectos del Péptido 1 en bacterias

El Péptido 1 también mostró actividad bactericida, ocasionando la muerte bacterias al cabo de dos horas. Las cepas ensayadas fueron *E. coli*, *S. aureus* y *Enterococcus*. Esto indica que el péptido también muestra actividad lítica contra bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. La Figura 13 muestra los resultados cuando las cepas de las bacterias mencionadas anteriormente se incubaron con y sin Péptido 1 durante dos horas.

Ejemplo 6 – Propiedades físicas del Péptido 1

Se determinó que la carga neta, a un pH de 7,0, del Péptido 1, era de 12; el punto isoeléctrico de 12,4; la hidrofiliidad promedio de 1; y que la proporción de restos hidrófilos/número de total de restos era de 56 %. Por tanto el Péptido 1 es fuertemente catiónico y tiene un punto isoeléctrico elevado. Los resultados se muestran en la Figura 14.

TABLA 2

Supresores tumorales conocidos usados en la exploración de péptidos
PTEN
p15
p12
p27
par-4
P53BP1
PML
ATM
chd5
apc
smad4
puma
retinoblastoma
NF1
Patched
Numb
Axina
WT
SMAD2
SMAD3
P16

Tabla 3

Porcentajes de células vivas y muertas a diferentes concentraciones, comparación entre dos líneas celulares normales (142 y HFF1) y dos líneas celulares cancerosas (Carcinoma 143 y Sarcoma HOS)				
Concentración del péptido	Proporción de células vivas (%)			
	Células normales		Células tumorales	
	142	HFF1	Carcinoma 143	Sarcoma HOS
2,5 µg/ml	99	100	90	90
5 µg/ml	100	99	90	91
10 µg/ml	99	100	89	88
15 µg/ml	90	95	75	78
20 µg/ml	97	98	50	35
25 µg/ml	89	90	45	8
30 µg/ml	90	88	30	10
35 µg/ml	90	89	29	2

## Análisis

- 5 Los experimentos muestran que el Péptido 1, y los péptidos modificados basados en este, tienen efectos antitumorales sobre diversas líneas de células cancerosas *in vitro* así como *in vivo*. Además, los péptidos muestran muy poca toxicidad sobre fibroblastos humanos *in vitro* así como por inyección intraperitoneal en ratones. De hecho, no se observó toxicidad inyectando 1000 µg de los péptidos por vía subcutánea en ratones nod-scid de 18 g. Los péptidos detienen el crecimiento de diversas líneas celulares cancerosas *in vitro*, mientras que las células normales están menos afectadas por las mismas concentraciones. A través de inyección directa de los péptidos en tumores sólidos en ratones, se observó necrosis grave después de 24 h con una inhibición de crecimiento posterior. Además, esto conduciría a una supervivencia ampliada en los animales en comparación con los animales no tratados. La microscopía electrónica de barrido, así como estudios funcionales, muestran que el péptido afecta a las membranas plasmáticas de las células cancerosas causando la alteración de las membranas. Además, el péptido también se transloca al núcleo desencadenando mecanismos apoptóticos en las células cancerosas. Por tanto, el Péptido 1, y sus modificaciones, que tienen nuevas secuencias, representan moléculas terapéuticas que inhiben el crecimiento tumoral de diversos cánceres (por ejemplo, de cerebro, de pulmón, de mama y de colon). Los resultados también muestran, mediante una manipulación sencilla, que los péptidos pueden estabilizarse (hacerse resistentes) contra la degradación proteolítica, lo que aumenta adicionalmente su potencial como compuestos antitumorales. Además, los resultados muestran que los péptidos ejercen efectos bactericidas sobre bacterias gram positivas así como sobre las gram negativas. Por lo tanto, los péptidos pueden usarse contra una diversidad de infecciones bacterianas en seres humanos.

## Referencias

- 25 1. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3: 991-8.
- 30 2. Mocellin S, Rossi CR, Nitti D. Cancer vaccine development: on the way to break immune tolerance to malignant cells. *Exp Cell Res* 2004; 299: 267-78.
3. Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science* 2004; 305: 200-5.
- 35 4. Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 61-92.
5. Hancock RE. Peptide antibiotics. *Lancet* 1997; 349: 418-22.
6. Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol* 1998; 10:41-4.
- 40 7. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002; 415: 389-95.
8. Ohsaki Y, Gazdar AF, Chen HC, Johnson BE. Antitumor activity of magainin analogues against human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1992; 52: 3534-8
- 45 9. Chen Y, Xu X, Hong S, et al. RGD-Tachyplesin inhibits tumor growth. *Cancer Res* 2001; 61: 2434-8.
10. Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-g activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 2001; 97: 192-7.
- 50 11. Ellerby HM, Lee S, Ellerby LM, et al. An artificially designed pore-forming protein with anti-tumor effects. *J Biol Chem* 2003; 278: 35311-6.

12. Leuschner C, Enright FM, Gawronska B, Hansel W. Membrane disrupting lytic peptide conjugates destroy hormone dependent and independent breast cancer cells in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 78: 17-27.
- 5 13. Papo N, Braunstein A, Eshhar Z, Shai Y. Suppression of human prostate tumor growth in mice by a cytolytic D-, L-amino acid peptide: membrane lysis, increased necrosis, and inhibition of prostate-specific antigen secretion. *Cancer Res* 2004; 64: 5779-86.
- 10 14. Ganz T, Lehrer RI. Defensins. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 584-9.
- 15 15. Epand RM, Vogel HJ. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* 1999; 15: 1-2.
16. Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by  $\alpha$ -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1462.
17. Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. Amphipathic,  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 2000; 55: 4-30.
18. Bulet P, Stocklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 2004; 198: 169-84.
19. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 2002; 66: 236-48.
20. Papo N, Shahar M, Eisenbach L, Shai Y. A novel lytic peptide composed of D, L amino acids selectively kills cancer cells in culture and in mice. *J Biol Chem* 2003; 278: 21018-23.
21. Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997; 89: 1121-32.
22. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 971-88.
23. Chen HM, Wang W, Smith D, Chan SC. Effects of the anti-bacterial peptide cecropin B and its analogs, cecropins B-1 and B-2, on liposomes, bacteria, and cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1336: 171-9.
24. Chan SC, Yau WL, Wang W, Smith DK, Sheu FS, Chen HM. Microscopic observations of the different morphological changes caused by anti-bacterial peptides on *Klebsiella pneumoniae* and HL-60 leukemia cells. *J Pept Sci* 1998; 4: 413-25.
25. Papo N, Shai Y. New lytic peptides based on the D, L amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells. *Biochemistry* 2003; 42: 9346-54.
26. Manno S, Takakuwa Y, Mohandas N. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 1943-8.
27. Ellerby HM, Arap W, Ellerby LM, et al. Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med* 1999; 5: 1032-8.
28. Baker MA, Maloy WL, Zasloff M, Jacob LS. Anticancer efficacy of magainin 2 and analogue peptides. *Cancer Res* 1993; 53: 3052.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Cytovation AS
- <120> Compuestos oligopeptídicos y usos de los mismos
- <130> 27.5.98441/02
- <150> GB 1001602.0
- <151> 01-02-2010
- <160> 41

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido  
 <400> 1

Lys Thr Leu Arg Val Ala Lys Ala Ile Tyr Lys Arg Tyr Ile Glu  
 1 5 10 15

15 <210> 2  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Péptido inverso  
 <400> 2

Glu Ile Tyr Arg Lys Tyr Ile Ala Lys Ala Val Arg Leu Thr Lys  
 1 5 10 15

25 <210> 3  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Penetratina  
 <400> 3

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
 1 5 10 15

40 <210> 4  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Derivado de penetratina  
 <400> 4

Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
 1 5

50 <210> 5  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>  
 <223> Derivado de penetratina

ES 2 585 595 T3

<400> 5

Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
1 5

5 <210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Derivado de penetratina

<400> 6

Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
1 5

15 <210> 7  
<211> 10  
<212> PRT  
20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Derivado de penetratina

25 <400> 7

Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
1 5 10

30 <210> 8  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> Derivado de penetratina

<400>8

Arg Arg Glu Lys Trp Lys Lys  
1 5

40 <210> 9  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Derivado de penetratina

<400> 9

50

Arg Arg Gln Lys Trp Lys Lys  
1 5

<210> 10  
<211>7  
55 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

ES 2 585 595 T3

<220>  
 <223> Derivado de penetratina  
  
 <400> 10  
 5  
  
**Lys Arg Met Lys Trp Lys Lys**  
**1 5**  
  
 <210> 11  
 <211> 7  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Derivado de penetratina  
 15  
 <400> 11  
  
**Arg Lys Met Lys Trp Lys Lys**  
**1 5**  
  
 20 <210> 12  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Derivado de penetratina  
  
 <220>  
 <221 > MOD\_RES  
 30  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Orn  
  
 <400> 12  
 35  
  
**Arg Arg Xaa Lys Trp Lys Lys**  
**1 5**  
  
 <210> 13  
 <211> 7  
 40 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Derivado de penetratina  
 45  
 <400> 13  
  
**Arg Arg Met Lys Gln Lys Lys**  
**1 5**  
  
 50 <210> 14  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 55 <220>  
 <223> Derivado de penetratina  
  
 <400> 14

ES 2 585 595 T3

**Arg Arg Met Lys Trp Phe Lys**  
**1 5**

5 <210> 15  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Derivado de penetratina

<220>  
<221 > MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Orn

15 <400> 15

**Arg Xaa Arg Lys Trp Lys Lys**  
**1 5**

20 <210> 16  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> Derivado de penetratina

<400> 16

**Arg Arg Met Trp Lys Lys Lys**  
**1 5**

30 <210> 17  
<211> 7  
<212> PRT  
35 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Derivado de penetratina

40 <400> 17

**Arg Arg Met Lys Lys Trp Lys**  
**1 5**

45 <210> 18  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

50 <220>  
<223> D-penetratina

<400> 18

**Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys**  
**1 5 10 15**

55

ES 2 585 595 T3

<210> 19  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

5

<220>  
<223> Pegelina

<400> 19

10

Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr  
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 20  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

15

<400> 20

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln  
1 5 10

20

<210> 21  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

25

<400>21

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1 5 10

30

<210> 22  
<211> 33  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

35

<220>  
<223>VP22

<400> 22

40

Asp Ala Ala Thr Ala Thr Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Arg Pro Thr  
1 5 10 15

Glu Arg Pro Arg Ala Pro Ala Arg Ser Ala Ser Arg Pro Arg Arg Val  
20 25 30

Asp

<210> 23  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45

ES 2 585 595 T3

<220>  
<223> MAP

5 <400> 23

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

Leu Ala

10 <210> 24  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> Transportan  
<400> 24

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu  
1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu  
20 25

20 <210> 25  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> Transportan-10  
<400> 25

Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu Lys Ala Leu Ala Ala Leu  
1 5 10 15

30 Ala Lys Lys Ile Leu  
20

35 <210> 26  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> KALA  
40 <400> 26

ES 2 585 595 T3

Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys His  
 1 5 10 15

Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Ala Cys Glu Ala  
 20 25 30

5 <210> 27  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Pep-1  
 <400> 27

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys  
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val  
 20

15 <210> 28  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Pep-2  
 <400> 28

Lys Glu Thr Trp Phe Glu Thr Trp Phe Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys  
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val  
 20

25 <210> 29  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> MPG

35 <400> 29

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly  
 1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Ser Lys Arg Lys Val  
 20 25

40 <210> 30  
 <211> 19  
 <212> PRT

ES 2 585 595 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido Vectocell

5

<400> 30

Val Lys Arg Gly Leu Lys Leu Arg His Val Arg Pro Arg Val Thr Arg  
1 5 10 15

Met Asp Val

10

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Péptido Vectocell

<400>31

Ser Arg Arg Ala Arg Arg Ser Pro Arg His Leu Gly Ser Gly  
1 5 10

20

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido Vectocel

30

<400> 32

Leu Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg Leu Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg  
1 5 10 15

35

<210> 33

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

40

<223> Péptido Vectocel

<400> 33

Gly Ala Tyr Asp Leu Arg Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg Leu Arg Arg  
1 5 10 15

Arg Glu Arg Gln Ser Arg  
20

45

<210> 34

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

ES 2 585 595 T3

<220>

<223> Transportador Wr-T

<400> 34

5

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Trp Thr Glu Trp  
1 5 10 15

Ser Gln Gly Pro Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
20 25

<210> 35

<211> 7

10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> R7

15

<400> 35

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5

20

<210> 36

<211> 12

<212> PRT

<213> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

25

<400> 36

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly  
1 5 10

<210> 37

<211> 8

30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> R8

35

<400> 37

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5

<210> 38

<211> 11

40

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> R11

45

<400> 38

Arg  
1 5 10

50

<210> 39

<211> 10

ES 2 585 595 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

5 <220>  
<223> QSR8  
<400> 39

Gln Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5 10

10 <210> 40  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> Péptido  
<400> 40

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Lys Thr Leu Arg  
1 5 10 15

20 Val Ala Lys Ala Ile Tyr Lys Arg Tyr Ile Glu  
20 25

<210> 41  
<211> 27  
<212> PRT  
25 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido inverso

30 <400> 41

Glu Ile Tyr Arg Lys Tyr Ile Ala Lys Ala Val Arg Leu Thr Lys Gly  
1 5 10 15

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Gly Tyr  
20 25

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto oligopeptídico que comprende:
- 5 (i) la secuencia de aminoácidos de YGRKKRRQRRRGKTLRVAKAIYKRYIE (SEQ ID NO: 40); o  
(ii) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85 % con la secuencia de SEQ ID NO: 40;
- 10 en el que el compuesto de (i) o (ii) tiene actividad en la inhibición del crecimiento y/o de la viabilidad de células microbianas y cancerosas, en el que preferentemente el compuesto oligopeptídico tiene la secuencia de SEQ ID NO: 40.
2. Un compuesto oligopeptídico de la reivindicación 1, en el que el compuesto comprende uno o más D-aminoácidos, en el que preferentemente el compuesto es un compuesto inverso que contiene todos los D-aminoácidos.
3. Un compuesto oligopeptídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en el que el compuesto tiene una o más de las siguientes propiedades:
- 20 a) una carga neta a un pH de 7,0 de 10-13,  
b) un pI de 12 a 13;  
c) una hidrofiliidad promedio de 0,7 a 1,0 y/o  
d) una proporción de restos hidrófilos/número total de restos de 45-60 %.
- 25 4. Un compuesto oligopeptídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el compuesto es antibacteriano y citotóxico.
5. Un compuesto oligopeptídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que es selectivamente citotóxico hacia células cancerosas y/o en el que el compuesto puede reducir el tamaño del tumor.
- 30 6. Una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, o el complemento de dicha molécula de ácido nucleico.
7. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6.
- 35 8. Una célula aislada que se ha modificado por la introducción de una molécula de ácido nucleico o un vector de la reivindicación 6 o 7.
9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto oligopeptídico o una molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 40 10. Un compuesto oligopeptídico, molécula de ácido nucleico o composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en terapia, preferentemente para su uso para combatir una infección microbiana o para su uso en el tratamiento del cáncer;
- 45 en los que cuando se usan en el tratamiento del cáncer, preferentemente el cáncer se selecciona de cáncer de cerebro, de pulmón, de mama o de colon o un melanoma y/o en el que el compuesto oligopeptídico, la molécula de ácido nucleico, la composición o el medicamento son para suministro local en el cáncer;  
o en los que cuando se usan para combatir una infección microbiana, la infección microbiana es preferentemente una infección bacteriana.
- 50 11. El uso del compuesto oligopeptídico o de la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la fabricación de un medicamento para combatir una infección microbiana y/o tratar un cáncer.
12. Un producto que comprende un compuesto oligopeptídico, una molécula de ácido nucleico o una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un segundo agente terapéuticamente activo como una preparación combinada para un uso por separado, simultáneo o secuencial en la inhibición de la viabilidad y/o del crecimiento de una célula cancerosa o microbiana.
- 55 13. Un kit que comprende un compuesto oligopeptídico, una molécula de ácido nucleico o una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un segundo agente terapéuticamente activo.
- 60 14. Un kit o producto de la reivindicación 12 o 13, en el que el segundo agente terapéuticamente activo, es activo contra una infección cancerosa o microbiana o un cáncer, y/o en el que el segundo agente terapéuticamente activo es un agente quimioterapéutico, un agente antineoplásico, un antibiótico o un agente antivírico o antifúngico.
- 65

15. Un método *in vitro* o *ex vivo* para inhibir la viabilidad y/o el crecimiento de un microorganismo o de una célula cancerosa, comprendiendo dicho método poner en contacto dicho microorganismo con un compuesto oligopeptídico, o poner en poner en contacto dicha célula de cáncer con un compuesto oligopeptídico o una molécula de ácido nucleico, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

5

Figura 1

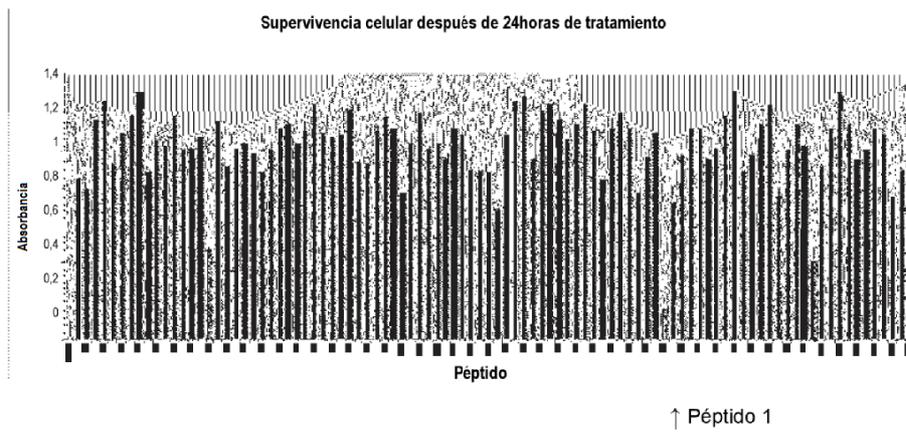


Figura 2

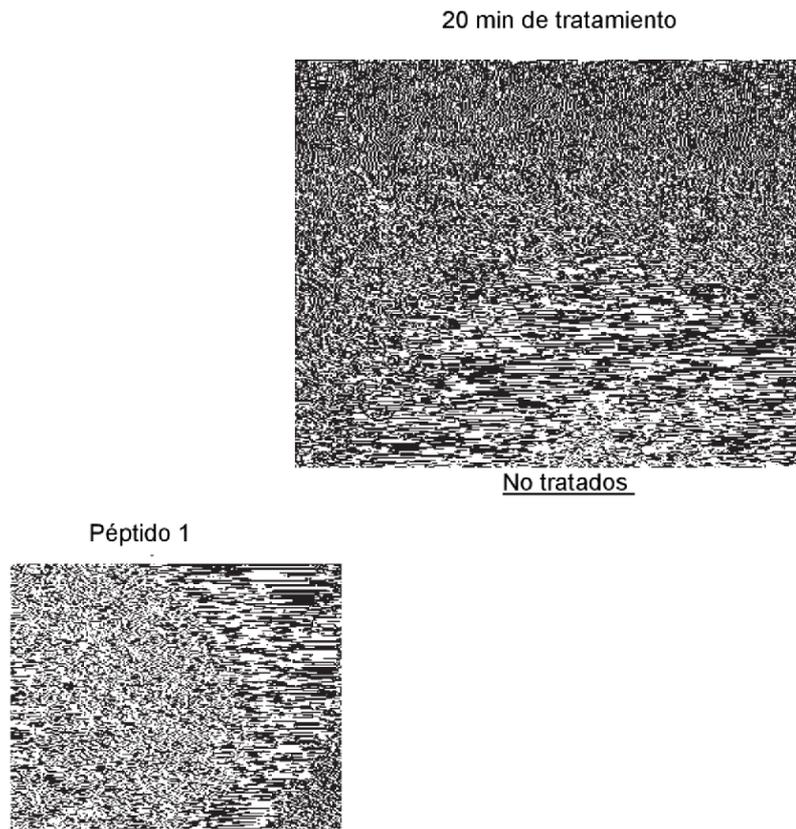


Figura 3

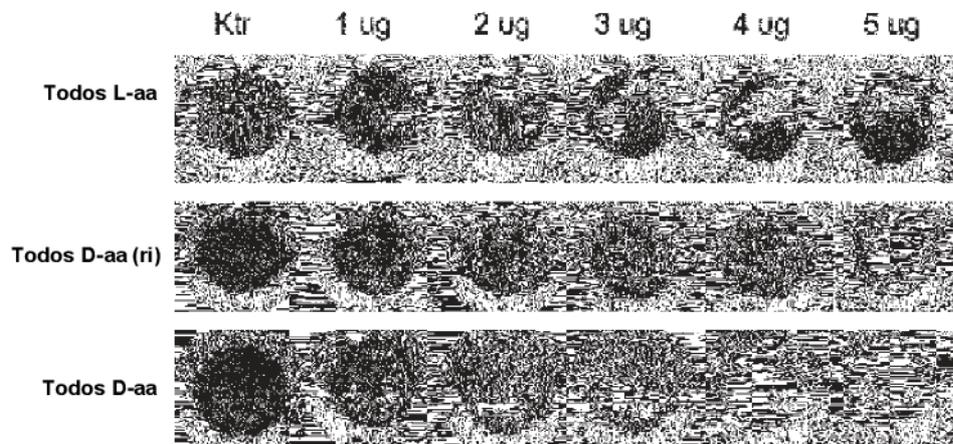


Figura 4

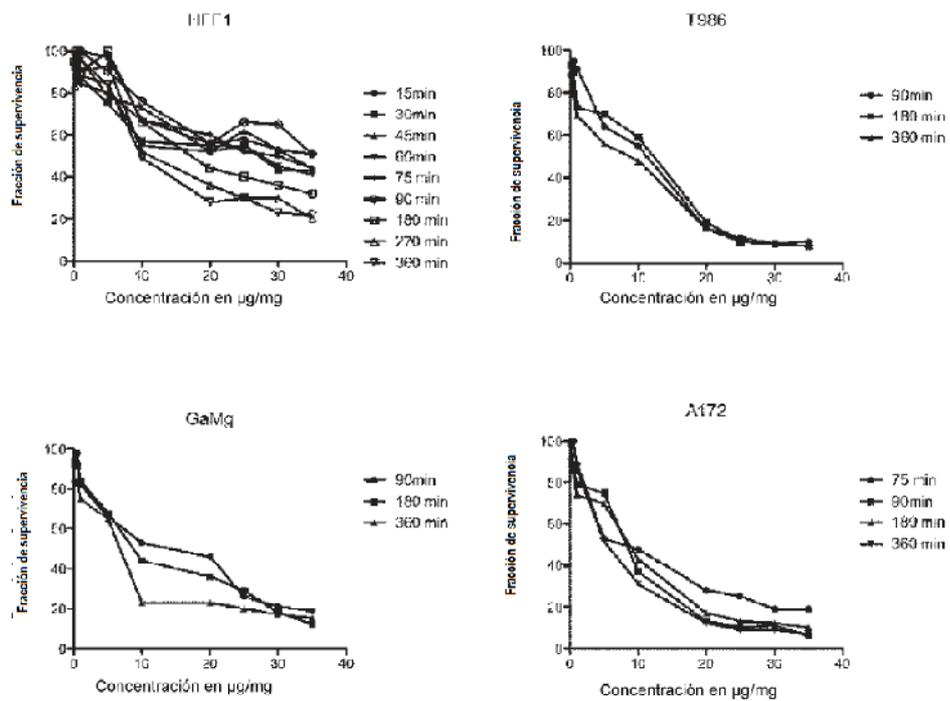


Figura 5

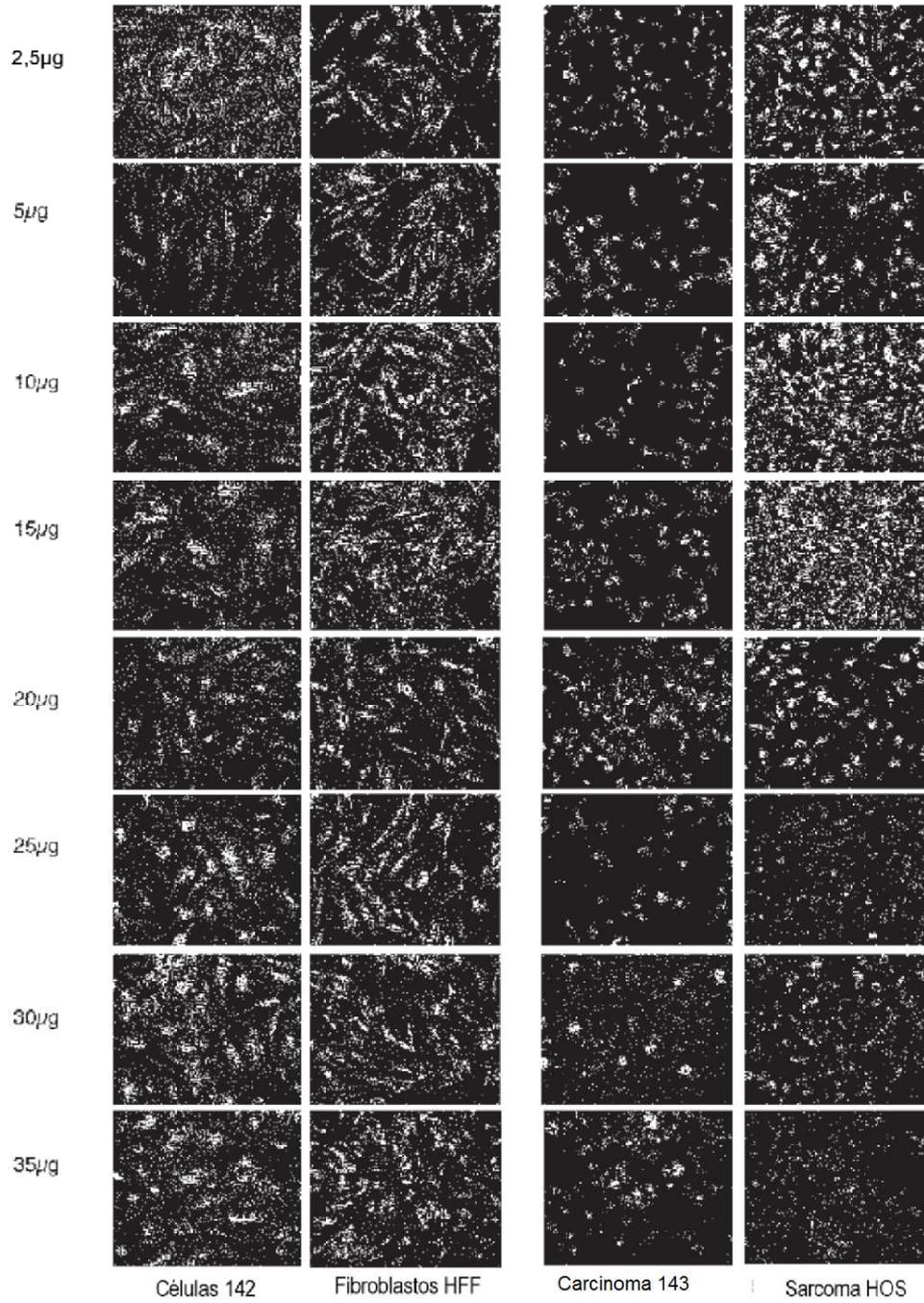
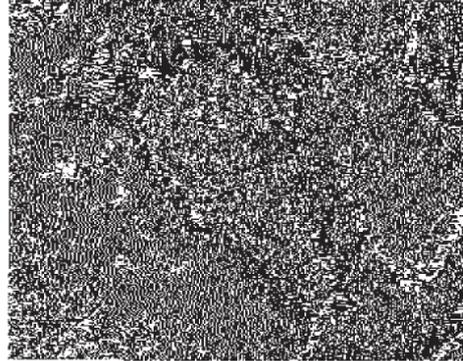
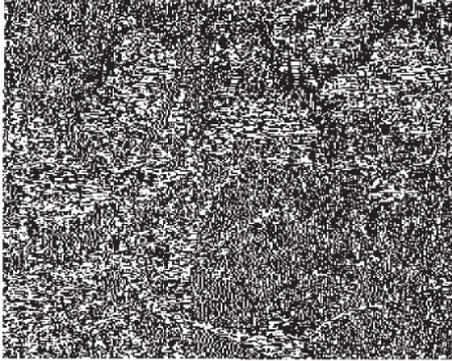


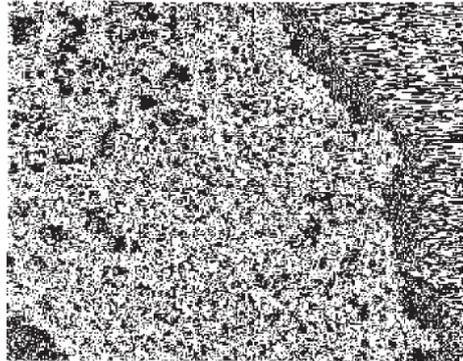
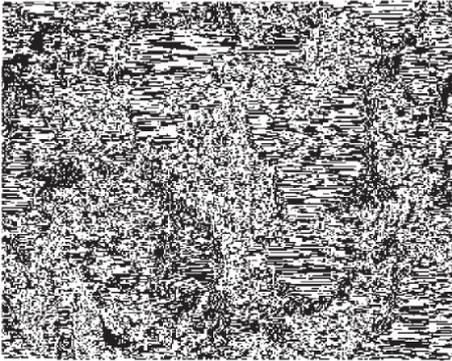
Figura 6

**A**

No tratado



Tratado durante 18 horas



**B**

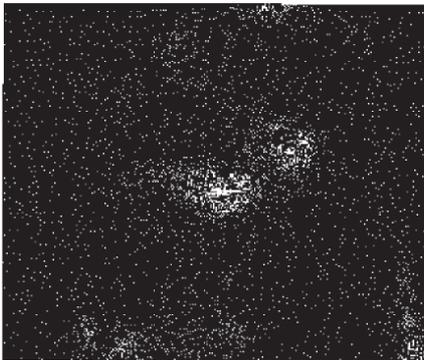


Figura 7

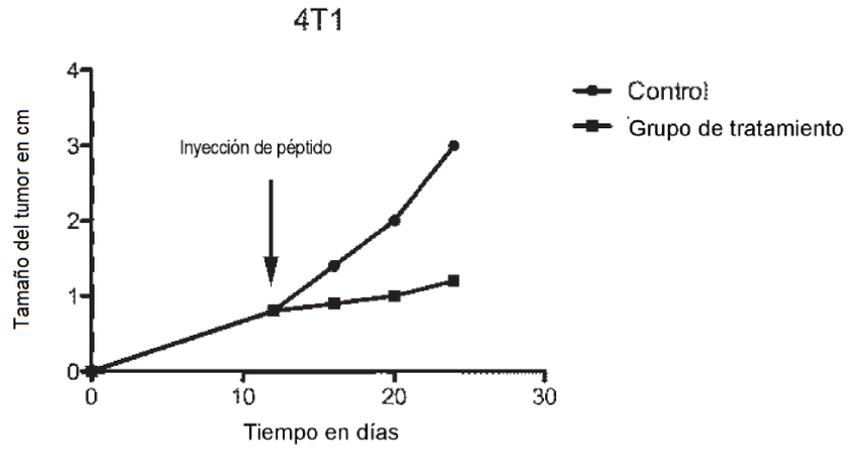


Figura 8

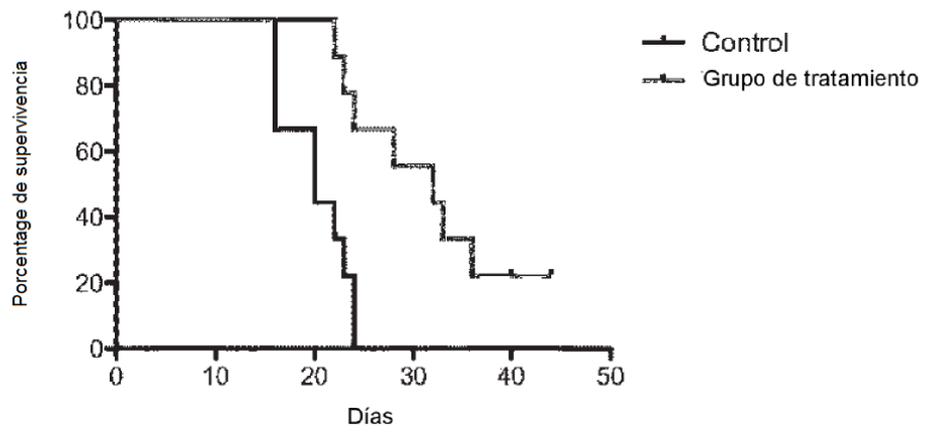


Figura 9

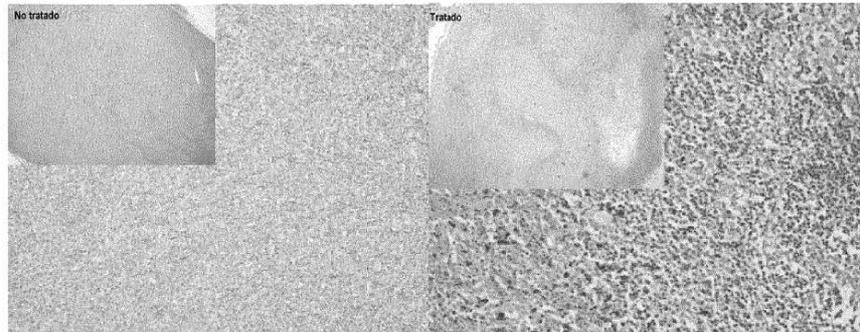


Figura 10

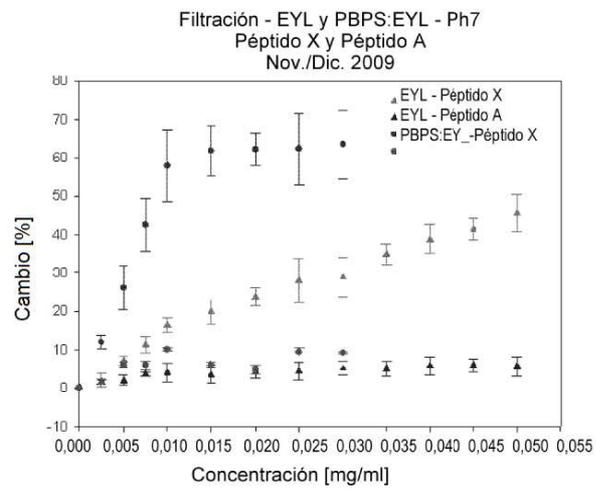


Figura 11

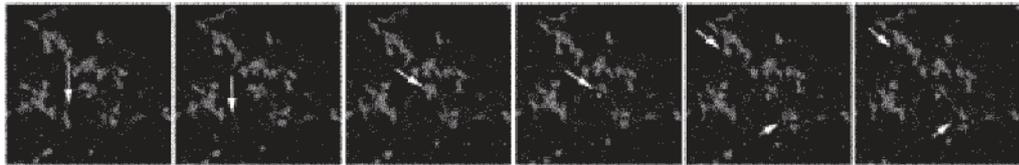


Figura 12

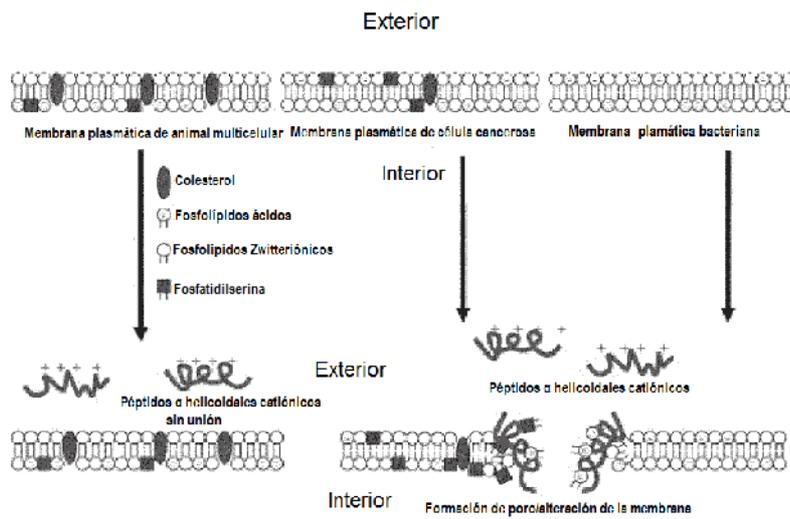


Figura 13

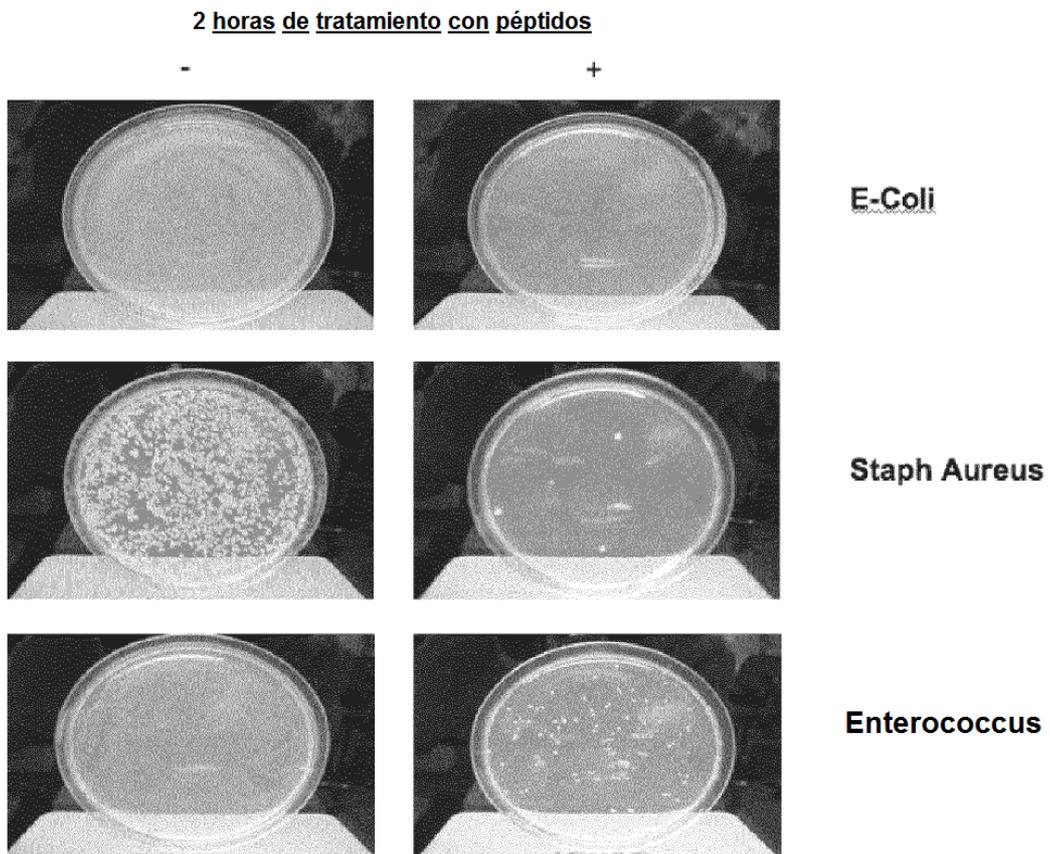


Figura 14

