

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 498**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/16** (2006.01)  
**A61K 38/03** (2006.01)  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 9/133** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.08.2011 PCT/US2011/048869**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2012 WO12027411**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2011 E 11820553 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 2608800**

54 Título: **Composiciones y usos de materiales con actividad antimicrobiana elevada y toxicidad baja**

30 Prioridad:

**23.08.2010 US 376195 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.07.2017**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (50.0%)**  
**1111 Franklin Street**  
**Oakland, California 94607-5200, US y**  
**AMICROBE INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BEVILACQUA, MICHAEL, P.;**  
**BENTITEZ, DIEGO;**  
**DEMING, TIMOTHY, J.;**  
**HANSON, JARROD, A. y**  
**KOZIOL, LUCAS**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 622 498 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

Composiciones y usos de materiales con actividad antimicrobiana elevada y toxicidad baja

**Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a composiciones de materia que son capaces de destruir (o inhibir) microbios, y que tienen una toxicidad baja en mamíferos. La presente invención también se refiere a ciertas composiciones y a sus usos en una diversidad de situaciones, que incluyen, pero sin limitación, los conservantes, antisépticos, y la prevención y el tratamiento de infecciones de heridas, así como otras enfermedades infecciosas.

**Discusión de la técnica relacionada**

- 10 Los agentes antimicrobianos catiónicos han demostrado tener utilidad; la toxicidad es un problema. Durante más de medio siglo, se han usado agentes antimicrobianos catiónicos (cargados positivamente) en una diversidad de situaciones médicas y no médicas, que varían desde los antibióticos sistémicos hasta los detergentes industriales. Los agentes antimicrobianos catiónicos se unen de manera preferente a las membranas bacterianas, que en general muestran una carga más negativa que las membranas de los mamíferos. Esta interacción puede alterar la función de la membrana y conducir potencialmente a la muerte de la célula bacteriana. Los compuestos antimicrobianos catiónicos incluyen ciertos antibióticos (p.ej., polimixinas), bisbiguanidas (p.ej., clorhexidina), biguanidas poliméricas (p.ej., polihexametilen biguanida) y compuestos de amonio cuaternario (QAC) (p.ej., cloruro de benzalconio), así como péptidos antimicrobianos naturales (AMPs) (p.ej., defensinas). Aunque cada clase de compuestos antimicrobianos catiónicos ha demostrado tener actividad antimicrobiana en una o más situaciones, la toxicidad ha sido un problema constante [1-12].

- 15 Las polimixinas, producidas por *Bacillus polymyxa*, son péptidos cíclicos con colas hidrófobas [6, 7]. La porción de péptido cíclico (aprox. 10 residuos de aminoácidos; cargada positivamente) interacciona intensamente con el lipopolisacárido (LPS) cargado negativamente hallado en la membrana externa de las bacterias gramnegativas. Se cree que la cola hidrófoba interacciona con, y en algunos casos altera, la membrana bacteriana. Las polimixinas tienen actividad antimicrobiana contra muchas bacterias gramnegativas, que incluyen las especies *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Enterobacter*, pero tienen una actividad limitada contra *Proteus*, la mayoría de *Serratia* o las bacterias grampositivas [7]. La neurotoxicidad y nefrotoxicidad significativas han contribuido a su uso limitado como antibióticos sistémicos [13]. Actualmente, las polimixinas se usan a veces como último recurso para infecciones por bacterias gramnegativas que son muy resistentes a los antibióticos, tales como las provocadas por *P. aeruginosa* multirresistente. También se usan como agentes antimicrobianos tópicos para pequeños cortes y rasguños de la piel.

- 20 La clorhexidina se usa de manera generalizada en el ámbito quirúrgico preoperatorio como limpiador antiséptico para la limpieza general de la piel, en el baño preoperatorio y en la preparación de la zona quirúrgica [7]. La clorhexidina es activa contra una amplia diversidad de bacterias grampositivas y gramnegativas, aunque se ha informado de la resistencia por parte de algunas bacterias gramnegativas (p.ej., las especies *P. aeruginosa*, *Providentia*) [5, 10]. Las formulaciones que contienen un 2-4% de clorhexidina parecen ser las más eficaces como agentes antimicrobianos, pero pueden provocar irritación de la piel. En general, la clorhexidina es relativamente segura al aplicarla a la piel intacta, porque se absorben cantidades mínimas del compuesto. Sin embargo, debido a la irritación y la toxicidad, la clorhexidina está contraindicada para el uso cerca de los ojos, oídos, tejidos cerebrales y meninges [2]. A veces se usan concentraciones bajas (p.ej., del 0,05% al 0,12%) como lavados de heridas y enjuagues bucales. La actividad depende del pH, ya que los medios de pH bajo reducen la actividad. Además, la clorhexidina no es compatible con los compuestos aniónicos (p.ej., agua dura, jabón, alginato) y muestra una actividad reducida en presencia de materiales orgánicos (p.ej., sangre).

- 25 La polihexametilen biguanida (PHMB) se ha usado en diversas aplicaciones de consumo durante más de 40 años. La PHMB se usa en desinfectantes de piscinas, conservantes o PVC plastificado, y en biocidas ambientales de uso general [1]. La producción inicial de PHMB dio como resultado oligómeros muy polidispersos con pesos moleculares en el intervalo 500-6.000 g/mol. La caracterización química limitada impidió en gran medida el uso inicial de PHMB en los productos farmacéuticos. Las formulaciones recientes de PHMB han podido afrontar la polidispersidad. De manera similar a la clorhexidina, el uso de PHMB está contraindicado para los ojos, oídos, tejidos cerebrales, meninges y articulaciones [4].

- 30 Los compuestos de amonio cuaternario (QACs) son tensioactivos anfóteros, que en general contienen un átomo de nitrógeno unido directamente a cuatro grupos alquilo, que pueden variar en cuanto a la estructura hidrófoba [1, 2]. Los QACs son principalmente agentes bacteriostáticos, pero a concentraciones superiores pueden ser bactericidas contra ciertos organismos. Los QACs son agentes antimicrobianos contra las bacterias grampositivas, pero son menos eficaces contra las bacterias gramnegativas (p.ej., *P. aeruginosa*). Debido a su actividad débil contra las bacterias gramnegativas, los QAC en general no se usan en ámbitos sanitarios para la antisepsia de las manos. Varios brotes de infección se han rastreado hasta compuestos QAC contaminados con bacilos gramnegativos [8]. Los QAC parecen ser más sensibles a los mecanismos de resistencia mediados por las bombas de expulsión de

múltiples fármacos. Su actividad también se reduce en gran medida en presencia de la materia orgánica.

Los péptidos antimicrobianos naturales (AMPs) a menudo son catiónicos. Los péptidos antimicrobianos naturales (AMPs) (en general, menos de 50 aminoácidos) están distribuidos de manera generalizada en la mayoría de las especies, desde insectos hasta mamíferos, y se cree que desempeñan papeles cruciales en la inmunidad innata [14]. Los AMPs han demostrado una potente destrucción / inhibición de bacterias, virus, hongos y parásitos [15]. Se cree que los AMPs son importantes para prevenir y controlar las infecciones. Los AMPs se depositan intensamente en interfases tales como la piel, las vías respiratorias y el recubrimiento gastrointestinal, y los leucocitos los liberan en los sitios de inflamación. Los leucocitos usan los AMPs como parte de sus mecanismos de destrucción directa en los fagolisosomas. Ciertos AMPs contribuyen a la regulación de la inflamación y la inmunidad adaptativa [15]. Además, los AMPs han demostrado una actividad inhibitoria contra los espermatozoos y las células cancerosas.

La mayoría de AMPs comparten características estructurales que conducen a modos de destrucción físicos, independientes de receptores [9]. Un mecanismo de acción aceptado de manera generalizada de los AMPs es la alteración o perturbación de la membrana microbiana (seguida a veces por la formación de poros), lo que conduce a la muerte celular. En general, los AMPs contienen dominios cargados positivamente e hidrófobos que están separados espacialmente - anfífilos catiónicos. El contenido hidrófobo sustancial de los AMPs (en general, una fracción molar del 30 al 60%) es una característica importante para la actividad antimicrobiana, ya que "controla el grado en el que un péptido se puede repartir en la bicapa lipídica" [16]. Los AMPs que forman hélices alfa "existen con frecuencia como conformeros extendidos o desestructurados en disolución", y se hacen helicoidales "tras la interacción con membranas fosfolipídicas anfipáticas" [16]. Esto sugiere que el "medio local en la superficie externa bacteriana y las membranas es importante y puede inducir cambios conformacionales en los péptidos antimicrobianos que son necesarios para la unión y la inserción de los péptidos en la membrana" [3].

Se ha demostrado que la nisina (un AMP derivado de bacterias que se ha usado como conservante alimentario) es un agente emulsionante débil para las mezclas aceite-agua, y el proceso es significativamente dependiente del pH y la temperatura [17].

Se han patentado varios AMPs naturales y las tecnologías relacionadas. Lehrer y Selsted describieron secuencias de AMP análogas a las de las defensinas aisladas de macrófagos (patente de EE.UU. n° 4.543.252). La clase de AMPs de las magaininas, aisladas por primera vez a partir de la piel de ciertas ranas, ha sido descrita por Zasloff (patente de EE.UU. n° 4.810.777). También se han descrito magaininas modificadas, en particular con deleciones o sustituciones en la secuencia (p.ej., patentes de EE.UU. n°s 4.962.277; 5.221.732; 5.912.231; y 5.792.831). Selsted y Cullor describieron el AMP bovino indolicidina como compuesto antimicrobiano de amplio espectro (patente de EE.UU. n° 5.324.716).

Los oligómeros catiónicos basados en péptidos sintéticos pueden funcionar como agentes antimicrobianos. Salick y colaboradores han descrito un péptido en forma de horquilla beta específico de secuencia (20-mero) que puede formar un hidrogel antimicrobiano en presencia de una concentración salina suficiente (solicitud de patente publicada de EE.UU. n° 2011/0171304). Cuando el péptido "se disuelve en agua, permanece sin plegar y soluble debido a la repulsión de cargas entre las cadenas laterales cargadas positivamente". Se cree que la adición de sal "apantalla la carga derivada de las cadenas laterales y permite que el péptido se pliegue" hasta una horquilla beta, que se puede "ensamblar hasta una red de fibrillas ricas en láminas beta". El péptido consiste en un 60% de contenido hidrófobo y contiene dos residuos de arginina que parecen ser importantes para la actividad antimicrobiana eficaz contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). Los péptidos propiamente dichos no parecen ser inherentemente antimicrobianos, ya que los inventores han informado que el "péptido que se difunde del gel no es el agente activo". Cuando *S. aureus* se sometió a disoluciones acuosas (es decir, no hidrogeles) 100 µM (aprox. 230 µg/mL) de péptido, "la proliferación bacteriana se vio mínimamente afectada". Así, para la actividad antimicrobiana, las bacterias deben estar en contacto directamente con la superficie del hidrogel; el péptido "plegado pero no gelificado" no inhibe la proliferación bacteriana. Se informó de hallazgos similares para otros péptidos en horquilla beta estrechamente relacionados [18].

Gellman y colaboradores han descrito composiciones antimicrobianas que contienen oligómeros de aminoácidos beta (patentes de EE.UU. n°s 6.060.585; 6.683.154; solicitudes de patentes publicadas de EE.UU. n°s 2007/0087404; 2008/0166388) con estructuras secundarias bien definidas. Los péptidos beta contienen estructuras cíclicas en el esqueleto peptídico que limitan la flexibilidad conformacional. DeGrado y colaboradores también han descrito péptidos beta antibacterianos que contienen oligómeros (7-meros o más cortos) de un tri-beta-péptido (patente de EE.UU. 6.677.431).

Se han descrito otros compuestos basados en péptidos sintéticos que pueden imitar la estructura global de los AMPs naturales. DeGrado informó de péptidos beta anfífilos de secuencia aleatoria basados en las propiedades estructurales de los AMPs naturales magainina y cecropina [19]. Gellman y colaboradores han descrito un oligómero de péptido beta de secuencia aleatoria con una longitud media de 21 residuos, un índice de polidispersidad (Mn / Mw) de 1,4 y un 40% de residuos hidrófobos [20]. En otros estudios, Gellman identificó péptidos beta helicoidales [19]. Se descubrió que una "cara hidrófoba" del 60% a lo largo del cilindro helicoidal tuvo una actividad antimicrobiana óptima, mientras una cara del 40% mostró una actividad baja.

Los polímeros catiónicos sintéticos compuestos de bloques de construcción no naturales pueden funcionar como agentes antimicrobianos. Se han descrito varias clases de polímeros antimicrobianos sintéticos con bloques de construcción o unidades repetitivas no naturales; son el objeto de una revisión del 2007 de Tew [22]. Estos polímeros están compuestos por estructuras / unidades monoméricas que no se hallan en la naturaleza. Estos polímeros no naturales presentan a menudo síntesis sencillas y rentables, y estabilidad contra la degradación enzimática. Sin embargo, las limitaciones de estos y otros polímeros no naturales pueden incluir una actividad antimicrobiana limitada, así como la carencia de biocompatibilidad y biodegradabilidad. Los materiales de esta clase están compuestos por bloques de construcción no naturales (p.ej., aril amidas, grupos aromáticos altamente conjugados) y se consideran fuera del alcance de esta invención [21-25]. (Para ejemplos, véase la patente de EE.UU. nº 7.173.102; solicitudes de patentes publicadas de EE.UU. nºs 2008/0176807; 2010/0105703).

Winter y colaboradores han descrito peptoides antimicrobianos (glicinas N-sustituidas) [28]. Se ensayó una serie de peptoides cortos (3-monómeros) frente a un amplio espectro de bacterias grampositivas y gramnegativas, y la actividad hemolítica (HC50) fue inferior que la actividad antimicrobiana (concentraciones inhibitorias mínimas, CIMs). Un tripeptide representativo protegió a ratones infectados por *S. aureus in vivo* en un modelo de infección simple.

Metodologías sintéticas para copolipéptidos (método de Deming). Las metodologías sintéticas tradicionales han impedido la síntesis eficaz de bibliotecas de oligopéptidos con la modificación ortogonal (o semi-ortogonal) de múltiples propiedades. Las propiedades importantes a modificar incluyen la secuencia de aminoácidos, la longitud total de la cadena y la proporción de aminoácidos catiónicos respecto de los hidrófobos. Además, tampoco ha sido fácilmente accesible la síntesis práctica y rentable de mezclas de copolipéptidos de baja polidispersidad (PDI entre 1,0 y 1,4) [25].

El control sobre múltiples propiedades, y la capacidad de crear compuestos de baja polidispersidad, permitirían la optimización de múltiples relaciones estructura-función. Un reto importante en la investigación de AMPs que son polipéptidos sintéticos son los costes de producción prohibitivos de la síntesis en fase sólida. Además, las limitaciones químicas significativas de los métodos sintéticos en fase sólida y en fase de disolución incluyen la falta de control sobre el crecimiento de la cadena. Esto conduce a la ramificación de la cadena, a polidispersidad y a rendimientos de productos bajos.

En 1997, Deming desarrolló iniciadores bien definidos para polimerizar derivados de aminoácidos hasta cadenas de oligopéptidos [25, 26]. Esta metodología añadió monómeros de aminoácidos a una cadena en crecimiento por lotes. Los iniciadores fueron complejos de metales de transición que posibilitaron una síntesis controlada para producir formulaciones de polipéptidos de peso molecular elevado, de distribución estrecha y con múltiples bloques. Los iniciadores y los métodos sintéticos están bien descritos en la bibliografía y en varias patentes (patentes de EE.UU. nºs 6.680.365; 6.632.922; 6.686.446; 6.818.732; 7.329.727; solicitud de patente publicada de EE.UU. nº 2008/0125581).

En general, los polipéptidos sintéticos tienen una composición binaria simple (p.ej., copolímeros de lisina (K) y leucina (L)). Los polipéptidos anfífilicos contienen monómeros de aminoácidos iónicos (p.ej., lisina, arginina (R), glutamato (Z)) copolimerizados con aminoácidos hidrófobos neutros (p.ej., leucina, alanina (A)). Mediante la variación del método de adición de monómeros, se pueden llevar a cabo copolimerizaciones para obtener secuencias de residuos de aminoácidos a lo largo de la cadena del copolímero que son en bloque, aleatorias o una combinación de ambas (es decir, bloques de secuencias aleatorias).

Los copolipéptidos sintéticos aleatorios en disolución muestran actividad antimicrobiana. El laboratorio de Deming ha observado actividad antimicrobiana para una serie de copolipéptidos hidrosolubles que contenían varias proporciones de aminoácidos catiónicos (lisina (K)) e hidrófobos (leucina (L), isoleucina (I), valina (V), fenilalanina (F) o alanina (A)) que estuvieron dispuestos de manera aleatoria [27]. Los copolipéptidos mostraron una actividad antimicrobiana variable contra *S. aureus* (grampositivo), *P. aeruginosa* (gramnegativo) y *E. coli* (gramnegativo) en ensayos de cultivo en suspensión. Los copolipéptidos de lisina-alanina mostraron un amplio "efecto tóxico en las tres especies de bacterias estudiadas", y se concluyó que eran la "combinación copolimérica antimicrobiana más eficaz". Los espectros de dicroísmo circular de los copolipéptidos de lisina-alanina y lisina-leucina mostraron "conformaciones de cadenas aleatorias inequívocas al estar libres en disolución". Este trabajo no examinó la actividad antimicrobiana de los copolipéptidos sintéticos de secuencia en bloque o los copolipéptidos sintéticos formulados deliberadamente en forma de micelas o incorporados en emulsiones / nanoemulsiones (véase también [28, 29]).

Mediante el uso de los métodos de síntesis de Deming, Chan-Park y colaboradores estudiaron recientemente la actividad antimicrobiana de copolipéptidos solubles de secuencia aleatoria que contenían 2-3 aminoácidos diferentes [26]. Los copolipéptidos 25-mericos aleatorios, compuestos de lisina-fenilalanina o lisina-fenilalanina-leucina, mostraron la actividad más amplia contra cinco microbios y tuvieron las CIMs más bajas. Se investigaron los efectos de toda la longitud del péptido y del contenido hidrófobo sobre la actividad antimicrobiana. Se informó que el copolipéptido de lisina-fenilalanina tuvo una "actividad antibacteriana más amplia cuando tuvo una longitud de 25 residuos que cuando tuvo una longitud menor o mayor". Se descubrió que el contenido hidrófobo óptimo para los compuestos de lisina-fenilalanina (y otros copolipéptidos aleatorios) fue de alrededor de un 60%. Sin embargo, los compuestos de lisina-fenilalanina y lisina-fenilalanina-leucina optimizados mostraron una actividad hemolítica

elevada en comparación con otros péptidos naturales y sintéticos. Los autores propusieron que la "elevada hifrofobicidad (60%) de los compuestos o más especies hidrófobas presentes pueden haber dado como resultado una elevada toxicidad para los eritrocitos de mamíferos". Además, los copolipéptidos aleatorios de lisina-alanina y lisina-leucina no mostraron una actividad significativa contra el organismo fúngico *Candida albicans*. El análisis de dicroísmo circular indicó que los copolipéptidos aleatorios de lisina-fenilalanina y lisina-fenilalanina-leucina "carecen de una estructura secundaria nítida" y no forman hélices alfa ni láminas beta.

Se pueden formular copolipéptidos sintéticos para conseguir estructuras jerárquicas. La presencia de polielectrolitos y dominios hidrófobos conduce a materiales segregados en microfases. Las superestructuras resultantes pueden incluir multímeros en disolución, micelas, emulsiones (con aceite), láminas, vesículas y fibrillas que forman hidrogeles. El autoensamblaje hasta las diferentes estructuras jerárquicas se puede controlar mediante: la variación de la composición y la longitud de la cadena; la variación de la concentración; la presencia de aminoácidos L, D o racémicos; y la modificación de las cadenas laterales y de los extremos de la cadena (p.ej., polietilén glicol (PEG)). La estructura secundaria de los dominios hidrófobos (es decir, la cadena aleatoria frente a hélice alfa) desempeña un papel importante en la formación de la superestructura. La naturaleza del dominio hidrófobo o de los segmentos poliméricos determina el tipo de interacciones intermoleculares que se establecen entre las cadenas. Estas interacciones atractivas están en equilibrio con las interacciones con el disolvente. Existe un equilibrio entre la energía libre de la autoasociación y la energía libre de la hidratación para cada molécula y para cada fragmento de la supermolécula.

Los copolipéptidos sintéticos también se pueden diseñar para que formen hidrogeles. Se demostró que ciertas características, tales como los bloques hidrófilos largos (catiónicos o aniónicos) y los bloques hidrófobos ordenados (p.ej., hélice alfa) favorecen la formación del hidrogel. Los estudios sugieren que varios hidrogeles basados en copolipéptidos sintéticos, lo que incluye los copolipéptidos en bloque  $K_{180}L_{20}$  (y otros  $KxLy$ ), son biocompatibles *in vivo*. Deming et al. informaron previamente que los hidrogeles de copolipéptidos en bloque pueden servir como andamiaje tisular en el sistema nervioso central (SNC) murino [27]. Se inyectaron hidrogeles en el prosencéfalo de ratones, y se crearon depósitos de los geles en 3D *in vivo*. La toxicidad, la inflamación y la gliosis fueron mínimas y similares a los controles de solución salina. Después de 8 semanas, en muchos casos, los depósitos de copolipéptido se vascularizaron con una densidad celular similar a la del tejido adyacente, lo que sugiere que los hidrogeles pueden dar apoyo a la proliferación y migración celular.

Deming (publicación PCT WO 2009/025802) describió nanoemulsiones y nanoemulsiones dobles estabilizadas mediante copolipéptidos en bloque sintéticos [27]. La actividad antimicrobiana de los copolipéptidos emulsionados no se describió en ese documento.

Las nanoemulsiones preparadas sin copolipéptidos pueden mostrar cierta actividad antimicrobiana. Baker y colaboradores se han centrado en el uso de nanoemulsiones como agentes antimicrobianos. Informaron de emulsiones antimicrobianas estabilizadas mediante tensioactivos basados en fosfato u otras moléculas pequeñas (patentes de EE.UU. n.ºs 6.015.832; 6.506.803; 6.559.189; 6.635.676; 5.618.840; 5.547.677; y 5.549.901).

No se entienden bien las relaciones potenciales entre la actividad antimicrobiana y / o la toxicidad para las células de mamíferos de los anfifilos catiónicos y su ensamblaje hasta estructuras de orden superior. Se ha publicado una información relevante limitada. Por ejemplo, la actividad antimicrobiana de épsilon-poli-lisina (EPL) se redujo ligeramente mediante la coordinación con un lípido y emulsificación, con respecto a la EPL libre en disolución [33].

#### Sumario de la invención

La presente invención describe composiciones de materia y usos de copolipéptidos sintéticos con una actividad antimicrobiana elevada (*in vitro* o *in vivo*) y una toxicidad baja en mamíferos. En particular, los agentes antimicrobianos catiónicos (cargados positivamente) se han usado durante más de cincuenta años en una diversidad de situaciones médicas y no médicas, que varían desde los antibióticos sistémicos hasta los detergentes industriales. A pesar de tener una eficacia sustancial, su uso en muchas situaciones médicas se ha limitado debido a unas toxicidades sustanciales. Esta invención supera la limitación de la toxicidad inherente de los agentes antimicrobianos catiónicos. En pocas palabras, al controlar la relación entre los elementos catiónicos y los elementos hidrófobos, se han diseñado materiales con una actividad antimicrobiana elevada y una toxicidad baja en mamíferos, a menudo aprovechando estructuras jerárquicas únicas. Esta invención incluye el agrupamiento de residuos de aminoácidos hidrófilos y / o hidrófobos a lo largo de una cadena copolipeptídica para alcanzar una anfifilicidad en bloque. Esto difiere de la anfifilicidad facial que caracteriza a muchos AMPs naturales, así como a los copolipéptidos sintéticos de secuencia aleatoria, de secuencia alternante y de secuencia específica. Para los fines de esta invención, los copolipéptidos en bloque o de secuencia en bloque se caracterizan como copolipéptidos que consisten en uno o más dominios diferentes que contienen cada uno una repetición contigua de al menos 5 residuos de un único aminoácido (p.ej., lisina o leucina) o tipo de aminoácido (catiónico o hidrófobo). En contraste, los copolipéptidos aleatorios se caracterizan como copolipéptidos que consisten en distribuciones estadísticas desordenadas de dos o más residuos de aminoácidos (o tipos de aminoácidos) diferentes en una secuencia.

Los copolipéptidos sintéticos de la presente invención poseen una o más de las siguientes características moleculares que los distinguen de los agentes antimicrobianos naturales y sintéticos descritos previamente. Primero,

una longitud total de cadena relativamente elevada (de 40 a 250 o más residuos de aminoácidos); segundo, la exposición multimérica de los dominios hidrófilos (en general catiónicos); tercero, un contenido hidrófobo relativamente bajo (en general, un 40% o menos); y cuarto, una autoasociación / autoensamblaje por medio de interacciones de los dominios hidrófobos (a menudo basado en una secuencia en bloque). A modo de explicación, sin limitar el alcance de esta invención, se cree que la actividad antimicrobiana elevada es el resultado de la exposición de segmentos hidrófilos (catiónicos) largos, segmentos hidrófilos (catiónicos) multiméricos, o ambos, que interaccionan de manera muy eficaz con las cargas aniónicas (negativas) de la superficie de los microbios. Además, a modo de explicación y sin limitar el alcance de esta invención, se cree que el contenido hidrófobo relativamente bajo, la naturaleza de autoasociación de los dominios hidrófobos (a menudo basada en una secuencia en bloque), o ambos, sirven para limitar la exposición de los tejidos a concentraciones de material altamente hidrófobo o altamente anfipático, por lo que disminuye la toxicidad en mamíferos. En ciertos casos, esta exposición hidrófoba o anfipática limitada puede permitir la administración de cantidades mayores del material antimicrobiano *in vivo*, con la posibilidad de liberación retardada y liberación lenta, y una mayor actividad antimicrobiana (con menos toxicidad en mamíferos) a lo largo del tiempo.

Se reconoce que conseguir una actividad antimicrobiana elevada (*in vitro* o *in vivo*) y una toxicidad baja puede depender de uno o más factores, que incluyen los siguientes: la selección de los monómeros (p.ej., cationes específicos e hidrófobos); la distribución espacial de los monómeros (p.ej., en bloque frente a aleatoria); la fracción molar de los monómeros hidrófobos; la pureza óptica de los monómeros; los dominios hidrófobos ordenados frente a desordenados (p.ej., hélice alfa frente a cadena aleatoria), la modificación química de los monómeros / residuos; las composiciones híbridas (p.ej., conjugados de copolipéptido-polímero).

Estos copolipéptidos sintéticos se pueden diseñar para autoasociarse / autoensamblarse, en parte, por medio de interacciones de las regiones hidrófobas parcialmente solvatadas, mientras se mantienen completamente disueltos los dominios hidrófilos (en general, catiónicos). Los ejemplos específicos incluyen preparaciones que implican multímeros en disolución, micelas, láminas, vesículas y fibrillas que forman hidrogeles, así como emulsiones cuando se mezclan con aceites. A modo de ejemplo, se han desarrollado disoluciones de lavado antimicrobianas, hidrogeles antimicrobianos y emulsiones antimicrobianas. Todas estas preparaciones se pueden aplicar a heridas, otros tejidos u otras diversas superficies. El autoensamblaje molecular dirigido de esta invención determina las características químicas y biológicas, que incluyen la estructura jerárquica. Este difiere de la autoasociación de diversos copolipéptidos sintéticos de secuencia aleatoria, que se basa en la distribución no uniforme de residuos hidrófilos e hidrófobos, y en general da como resultado materiales irregulares y mal definidos.

Las realizaciones preferidas pueden considerar también ciertas cualidades que pueden influir en la eficacia y la toxicidad global en enfermedades humanas o animales, que incluyen, pero sin limitación, la prevención y el tratamiento de infecciones de heridas u otras enfermedades infecciosas. Estas características incluyen, pero sin limitación, la fluidez (que facilita la aplicación), cobertura del tejido, duración de la bioactividad antimicrobiana, biocompatibilidad, degradación, biodistribución, y efectos sobre la respuesta inflamatoria, reparación del tejido, angiogénesis, hemostasia, inmunogenicidad, y otros. En ciertas situaciones médicas (p.ej., heridas quirúrgicas o traumáticas), la eficacia y la toxicidad pueden depender sustancialmente de las interacciones de los copolipéptidos sintéticos con los tejidos. Se pueden obtener ciertas ventajas de los copolipéptidos sintéticos que precipitan fácilmente sobre y / o se unen directamente a los tejidos dañados, donde pueden proporcionar una actividad antimicrobiana local y concentrada. La eficacia y la seguridad globales en las enfermedades humanas o animales dependerán de la enfermedad específica y el estado general del paciente. Es de esperar que las bioactividades *in vivo* dependerán sustancialmente de la formulación y de la estructura jerárquica, y que la actividad *in vivo* puede no determinarse completamente mediante los ensayos *in vitro*.

### Descripción de las figuras

La FIGURA 1 es un diagrama que muestra la diversidad de bloques de construcción moleculares que se pueden usar para construir los copolipéptidos;

La FIGURA 2 es <sup>1</sup>H-RMN del copolipéptido en bloque K<sub>55</sub>(rac-L)<sub>20</sub> en *d*-TFA;

La FIGURA 3 es un diagrama que muestra las estructuras de copolipéptidos en bloque antimicrobianos seleccionados: A) K<sub>x</sub>(rac-L)<sub>y</sub>; B) K<sub>55</sub>(rac-L)<sub>20</sub> aleatorio; C) K<sub>55</sub>(rac-A)<sub>20</sub>; D) K<sub>55</sub>(rac-V)<sub>20</sub>; E) K<sub>55</sub>(rac-V)<sub>20</sub>; F) K<sub>55</sub>(rac-L/F)<sub>20</sub>; G) R<sup>H</sup><sub>55</sub>(rac-L)<sub>20</sub>; H) E<sub>64</sub>(rac-L)<sub>20</sub>; I) PEG<sub>205</sub>(rac-L)<sub>20</sub>; y J) K<sub>60</sub>L<sub>20</sub>;

La FIGURA 4 muestra la actividad antimicrobiana del copolipéptido en bloque K<sub>55</sub>(rac-L)<sub>20</sub> contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, y *P. aeruginosa*; se incubó K<sub>55</sub>(rac-L)<sub>20</sub> con bacterias durante 30 min antes de la colocación en placas para el cultivo;

La FIGURA 5 muestra la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *E. coli*, de copolipéptidos con un contenido variable de residuos de aminoácidos hidrófobos;

La FIGURA 6 muestra la actividad antimicrobiana contra *C. albicans* de copolipéptidos a una concentración de 100 µg/mL;

- La FIGURA 7 muestra la actividad antimicrobiana del copolipéptido en bloque  $K_{55}(rac-L)_{20}$  contra *S. aureus* y *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*); se incubó  $K_{55}(rac-L)_{20}$  con bacterias durante 30 min antes de la colocación en placas para el cultivo;
- 5 La FIGURA 8 muestra la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *E. coli* de copolipéptidos con tamaños variables de dominios hidrófobos en bloque a una concentración de péptidos de 10 µg/mL;
- La FIGURA 9 muestra la actividad antimicrobiana contra *P. acnes* de copolipéptidos con tamaños variables de dominios hidrófobos a una concentración de péptidos de 10 µg/mL;
- La FIGURA 10 muestra la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *E. coli* de copolipéptidos formulados con una distribución espacial en bloque o aleatoria de monómeros a una concentración de péptidos de 10 µg/mL;
- 10 La FIGURA 11 muestra la actividad antimicrobiana de  $K_{55}(rac-L)_{20}$  en un modelo de roedores; se insertó de manera subcutánea una malla de polipropileno empapada previamente con PBS o  $K_{55}(rac-L)_{20}$  en ratas, con copolipéptido adicional, y se añadió un inóculo de  $10^6$  de *S. aureus* 6538 o *P. aeruginosa* (aislamiento clínico de cerdo); después de dos días, la malla implantada se colocó en placas para la enumeración bacteriana;
- 15 La FIGURA 12 muestra la actividad antimicrobiana de  $K_{55}(rac-L)_{20}$  en un modelo de roedores; se insertó de manera subcutánea una malla de polipropileno empapada previamente con PBS o  $K_{55}(rac-L)_{20}$  en ratas, con copolipéptido adicional, y se añadió un inóculo de  $10^6$  de *S. aureus* 6538 o *P. aeruginosa* (aislamiento clínico de cerdo); en varios momentos, la malla implantada se colocó en placas para la enumeración bacteriana;
- 20 La FIGURA 13 muestra la actividad antimicrobiana de  $K_{55}(rac-L)_{20}$  en un modelo de roedores; se insertó de manera subcutánea una malla de polipropileno empapada previamente con PBS o 2 mg/ml de  $K_{55}(rac-L)_{20}$  en ratas, con copolipéptido adicional, y se añadió un inóculo de  $10^6$  de *S. aureus* 6538 o *P. aeruginosa* (aislamiento clínico de cerdo); después de dos días, el tejido circundante se colocó en placas para la enumeración bacteriana;
- 25 La FIGURA 14 muestra los resultados de ensayar la inflamación en un modelo de roedores; se insertó de manera subcutánea una malla de polipropileno empapada previamente con el copolipéptido  $K_{55}(rac-L)_{20}$  en ratas, con copolipéptido adicional, y se añadió un inóculo de  $10^6$  de *S. aureus* 6538; después de 48 hrs, se analizó el tejido mediante histología en busca de inflamación: 0=normal, 1=leve, 2=moderado, 3=grave;
- La FIGURA 15 muestra la actividad antimicrobiana de  $K_{55}(rac-L)_{20}$  en un modelo porcino; se aplicó  $K_{55}(rac-L)_{20}$  (10 mg/mL) a heridas, y después de cuatro hrs se aspiró el material restante y se añadieron  $10^7$  de *S. aureus* 6538 a las heridas; después de 48 hrs, se determinaron los recuentos bacterianos;
- 30 La FIGURA 16 muestra el resultado de ensayar la inflamación en un modelo porcino; se aplicó  $K_{55}(rac-L)_{20}$  (10 mg/mL) a heridas, y después de 30 min se añadieron  $10^4$  o  $10^7$  de *S. aureus* o *P. aeruginosa* a las heridas; después de 48 hrs, los tejidos se analizaron mediante histología en busca de inflamación (que incluye la infiltración celular y la necrosis);
- La FIGURA 17 muestra la cicatrización de heridas en un modelo porcino en el que las heridas se trataron con 500 µg/mL de  $K_{55}(rac-L)_{20}$  y se monitorizaron a lo largo de un periodo de 21 días;
- 35 La FIGURA 18 muestra la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *E. coli* de copolipéptidos en bloque  $K_{55}(rac-L)_{20}$  formulados como disoluciones o emulsiones;
- La FIGURA 19 muestra la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* de copolipéptidos formulados como disoluciones o emulsiones con tamaños variables de dominios hidrófobos a una concentración de péptidos de 10 µg/mL;
- 40 La FIGURA 20 muestra la actividad antimicrobiana *in vivo* contra *S. aureus* del copolipéptido  $K_{55}(rac-L)_{20}$  formulado como una emulsión; se insertó de manera subcutánea una malla de polipropileno empapada previamente con copolipéptido en ratas, con copolipéptido adicional, y se añadió un inóculo de  $10^6$  de *S. aureus* 6538; después de 2 días, la malla implantada se colocó en placas para la enumeración bacteriana;
- 45 La FIGURA 21 muestra los resultados de ensayar la inflamación en un modelo de roedores; el copolipéptido  $K_{55}(rac-L)_{20}$  se formuló como una emulsión, y se insertó de manera subcutánea una malla de polipropileno empapada previamente con copolipéptido en ratas, con copolipéptido adicional; se añadió un inóculo de  $10^6$  de *S. aureus* 6538, y después de 48 hrs, el tejido se analizó mediante histología en busca de inflamación: 0=normal, 1=leve, 2=moderado, 3=grave;
- La FIGURA 22 muestra la cicatrización de heridas en un modelo porcino en el que las heridas se trataron con 500 µg/mL de  $K_{55}(rac-L)_{20}$  formulado como una emulsión y se monitorizaron a lo largo de un periodo de 21 días;
- 50 La FIGURA 23 muestra la actividad antimicrobiana de copolipéptidos en bloque  $K_{180L20}$ . Se incubó  $K_{180L20}$  con bacterias durante 30 min antes de colocarlas en placas para el cultivo;
- La FIGURA 24 muestra la actividad antimicrobiana de  $K_{180L20}$  en un modelo de roedores; se insertó de manera

subcutánea una malla de polipropileno empapada previamente con PBS o K<sub>180</sub>L<sub>20</sub> en ratas, con copolipéptido adicional; se añadió un inóculo de 10<sup>6</sup> de *S. aureus* 6538 o *P. aeruginosa* (aislamiento clínico de cerdo); después de 48 hrs, la malla implantada y el tejido circundante se colocaron en placas para la enumeración bacteriana;

5 La FIGURA 25 muestra los resultados de ensayar la inflamación en un modelo de roedores; se insertó de manera subcutánea una malla de polipropileno empapada previamente con PBS o el copolipéptido K<sub>180</sub>L<sub>20</sub> en ratas, con copolipéptido adicional, y se añadió un inóculo de 10<sup>6</sup> de *S. aureus* 6538; después de 48 hrs, el tejido circundante se analizó mediante histología en busca de inflamación (que incluye la infiltración celular y la necrosis);

10 La FIGURA 26 muestra la actividad antimicrobiana de K<sub>180</sub>L<sub>20</sub> en un modelo porcino; se aplicó K<sub>180</sub>L<sub>20</sub> (40 mg/mL) a heridas, y después de 4 hrs se añadieron 10<sup>7</sup> de *S. aureus* 6538 a las heridas; después de 48 hrs, se determinaron los recuentos bacterianos finales;

La FIGURA 27 muestra el efecto de los copolipéptidos sobre el tiempo de coagulación en sangre completa, a una concentración de copolipéptido de 10 µg/mL;

15 La FIGURA 28 muestra los resultados de un ensayo de tromboelastografía (TEG) para medir los efectos de los copolipéptidos sobre la coagulación sanguínea a una concentración de copolipéptidos de 10 µg/mL; el tiempo R es el tiempo de latencia entre la colocación de sangre en el aparato de TEG y el incremento inicial de viscosidad (medida mediante el incremento de la señal de 0 - 2 mm); el tiempo R corresponde a la actividad enzimática de los factores de coagulación antes de que se incremente el entrecruzamiento; el tiempo K corresponde a la amplitud que se incrementa de 2 - 20 mm; el ángulo alfa es la pendiente de la señal de TEG entre los tiempos R y K; el ángulo alfa mide la velocidad de desarrollo de coágulos, y la amplitud máxima (MA) es la señal más alta y proporciona una  
20 medida absoluta de la resistencia del coágulo;

La FIGURA 29 muestra el efecto de los copolipéptidos sobre la agregación plaquetaria en plasma rico en plaquetas con una concentración de copolipéptidos de 100 µg/mL;

La FIGURA 30 muestra el efecto de los copolipéptidos sobre la agregación plaquetaria;

25 La FIGURA 31 muestra un ensayo en placas de gel de fibrina usado para medir los efectos sobre la fibrinólisis del copolipéptido R<sup>H</sup><sub>55</sub>(rac-L)<sub>20</sub> a concentraciones de 100, 1000 µg/ml y 1000 µg/ml con 1 mg/ml de albúmina;

La FIGURA 32 muestra imágenes de hemorragias venosas porcinas que representan heridas de 15 mm a los 5 min rellenas de geles basados en PEG que contienen copolipéptidos; y

30 La FIGURA 33 es una tabla (Tabla 1) de datos sintéticos de polipéptidos en la que <sup>a</sup> = M<sub>n</sub> y PDI se determina mediante el uso de cromatografía de permeabilidad en gel (GPC) del primer segmento, poli(N<sub>ε</sub>-CBZ-L-lisina); las composiciones se calcularon mediante el uso de: <sup>b</sup> = GPC y <sup>1</sup>H-RMN o <sup>c</sup> = <sup>1</sup>H-RMN en *d*-TFA. <sup>d</sup> = Sintetizado mediante guanilación de K<sub>55</sub>(rac-L)<sub>20</sub>;

La FIGURA 34 es una tabla (Tabla 2) del tiempo de contacto de mínimo (min) para un 99,99% de inhibición del crecimiento de *E. coli* 11229 y *E. coli* 0157:H7, a una concentración de copolipéptido de 100 µg/mL;

35 La FIGURA 35 es una tabla (Tabla 3) que muestra la concentración inhibitoria mínima (CIM) de copolipéptidos contra diversos microbios que incluyen microbios relacionados con los alimentos;

La FIGURA 36 es una tabla (Tabla 4) que muestra el logaritmo de la reducción contra gripe A (virus con envoltura) mediante copolipéptidos a una concentración de 1 mg/ml después de 30 seg de tiempo de contacto;

La FIGURA 37 es una tabla (Tabla 5) que muestra la concentración inhibitoria mínima (CIM) de copolipéptidos formulados como emulsiones contra endosporas de *B. subtilis*;

40 La FIGURA 38 es una tabla (Tabla 6) que muestra la citotoxicidad *in vitro* en queratinocitos humanos, de copolipéptidos formulados como disoluciones o emulsiones, a una concentración de 100 µg/mL; y

La FIGURA 39 es una tabla (Tabla 7) que muestra los parámetros de tromboelastografía (TEG) para copolipéptidos a una concentración de 10 µg/mL; \*Los valores fueron significativamente diferentes (p<0,05) que los controles sin tratar.

#### 45 Descripción detallada de la invención

La descripción siguiente se proporciona para permitir que cualquier persona experta en la técnica realice y use la invención, y expone los mejores modos contemplados por el inventor de llevar a cabo esta invención. Sin embargo, seguirán siendo fácilmente evidentes diversas modificaciones para los expertos en la técnica, ya que los principios generales de la presente invención se han definido en la presente memoria específicamente para proporcionar  
50 copolipéptidos sintéticos con una actividad antimicrobiana elevada y una toxicidad baja.

Las composiciones de copolipéptidos antimicrobianos de esta invención pueden contener uno o más aminoácidos

catiónicos (p.ej., lisina, arginina, homoarginina, ornitina) y uno o más aminoácidos hidrófobos (p.ej., leucina, valina, isoleucina, fenilalanina, alanina) dispuestos en bloques (Figs. 1-3, Fig. 33 (Tabla 1)). Los polipéptidos anfifílicos policatiónicos (p.ej., que contienen grupos amina que están protonados a pH neutro, amonios peralquilados o guanidínios) muestran una actividad antimicrobiana elevada. Por ejemplo, como se representa en la Fig. 4, se ha demostrado que un copolipéptido sintético que consiste en un bloque de 55 lisinas seguido de un bloque de 20 leucinas D y L (racémica) ( $K_{55}(\text{rac-L})_{20}$ ) tiene una actividad antimicrobiana sustancial contra *S. aureus* (grampositivo), *S. epidermidis* (grampositivo), *E. coli* (gramnegativo) y *P. aeruginosa* (gramnegativo). También se ha demostrado una actividad contra otros diversos organismos bacterianos y fúngicos (véase más adelante). Se han sintetizado otros múltiples copolipéptidos sintéticos (Fig. 33 (Tabla 1)), y presentan una actividad antimicrobiana sustancial. En contraste, a pH neutro (~7) los polipéptidos polianiónicos (p.ej.,  $E_{64}(\text{rac-L})_{20}$ ) muestran una actividad antimicrobiana baja.

Como se representa en la Fig. 5, los copolipéptidos sintéticos dibloque basados en el aminoácido catiónico lisina y otros aminoácidos hidrófobos muestran una actividad antimicrobiana intensa. En otros estudios, se demostró que la guanilación parcial de los residuos de lisina dio como resultado una actividad antimicrobiana elevada, por ejemplo  $X_{55}(\text{rac-L})_{20}$  para  $X = K / R^H$  (homoarginina) alcanzó una actividad antimicrobiana elevada. Variando la composición de aminoácidos hidrófobos, mientras se mantenían constantes todas las demás propiedades, también se mantuvo una actividad antimicrobiana elevada *in vitro* (Fig. 5). De manera específica, poli(L-lisina-HCl)<sub>55</sub>-bloque-poli(aminoácido hidrófobo racémico)<sub>20</sub>,  $K_{55}(\text{rac-X})_{20}$ , para  $X = \text{Alanina (A), Isoleucina (I), Leucina/Fenilalanina (L/F), o Valina (V)}$ , a una concentración muy baja (10 µg/ml), alcanzó una reducción observable máxima (6 unidades logarítmicas) de las cuentas bacterianas para bacterias grampositivas (*S. aureus*) y gramnegativas (*E. coli*). También se demostró que los copolipéptidos seleccionados fueron bastante eficaces contra otros microbios, que incluyen *E. coli* 0157:H7, así como contra otros patógenos alimentarios, e incluso contra ciertas formas de endosporas de microbios (Figs. 34 y 35 (Tablas 2 y 3)). También se demostró que estos compuestos fueron eficaces contra ciertos organismos fúngicos, como se representa para *Candida albicans* en la Fig. 6. Como se representa en la Fig. 7, ciertos organismos microbianos (p.ej., *P. acnes*) pueden ser menos sensibles a ciertos copolipéptidos que otros microorganismos (p.ej., *S. aureus*). Los copolipéptidos en fase de disolución también mostraron actividad antiviral contra el virus de la gripe H1N1 (Fig. 33 (Tabla 4)). En este experimento, se observó que el copolipéptido dibloque  $R^H/K$  (lisina parcialmente guanilada) fue especialmente activo.

En estos copolipéptidos en bloque, también se ha demostrado una actividad antimicrobiana elevada cuando se varía la longitud del bloque hidrófobo (Figs. 8 y 9). De manera inesperada, se demostró una actividad antimicrobiana elevada en varias series de copolipéptidos en bloque sintéticos, que incluyen los copolipéptidos en bloque con un contenido hidrófobo por debajo del 40%. Incluso las moléculas con un bloque de solamente 5 o 10 aminoácidos hidrófobos de leucina mostraron una buena actividad antimicrobiana al construirlos con un bloque de 55 aminoácidos catiónicos de lisina.

En estudios diferentes se ha demostrado que los copolipéptidos en bloque con bloques hidrófilos largos (es decir, más largos de K90) fueron eficaces como agentes antimicrobianos (Fig. 10). Además, se ha demostrado que los copolipéptidos sintéticos aleatorios de longitud superior (más de 100 residuos de aminoácidos) fueron agentes antimicrobianos muy eficaces. Esto fue cierto para los compuestos de contenido hidrófobo variable.

En estudios *in vitro* diferentes, se ha demostrado que los copolipéptidos de secuencia en bloque en disolución fueron menos citotóxicos que los copolipéptidos de secuencia aleatoria de composición similar. Por ejemplo, se descubrió que una secuencia en bloque  $K_{55}L_{20}$  en disolución disminuyó la viabilidad celular de queratinocitos de ratón en un 50% ( $CE_{50}$ ), a 47,4 µg/ml, mientras un copolipéptido sintético de composición similar de secuencia aleatoria tuvo una  $CE_{50}$  de 21,0 µg/ml en disolución. De forma similar, se descubrió que la secuencia en bloque  $K_{55}(\text{rac-L})_{20}$  en disolución fue menos citotóxica que la secuencia aleatoria  $K_{55}(\text{rac-L})_{20}$  en disolución. Como se describe más adelante, se descubrió que una diversidad de copolipéptidos sintéticos fueron antimicrobianos en preparaciones en emulsión. En estas preparaciones, también se descubrió que los copolipéptidos sintéticos de secuencia en bloque fueron menos citotóxicos ( $CE_{50}$  inferior) que los copolipéptidos de secuencia aleatoria, aunque las emulsiones estabilizadas de los copolipéptidos de secuencia en bloque mostraron en general una actividad antimicrobiana equivalente (y a veces superior).

También se demostró que un copolipéptido sintético de secuencia en bloque  $K_{55}(\text{rac-L})_{20}$  en fase de disolución fue eficaz en un modelo de roedores de prevención de la infección de heridas (Figs. 11 - 13). Se han demostrado reducciones de las poblaciones bacterianas en un modelo de prevención de la infección contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*. De manera coherente, se observaron reducciones dependientes de la concentración, en general una reducción de 1-3 unidades logarítmicas a 20 µg/ml de copolipéptido  $K_{55}(\text{rac-L})_{20}$ , y una reducción completa (o casi completa) a 2 mg/ml. Estos estudios indican que las formulaciones de copolipéptidos siguen siendo activas cuando se exponen a un fluido biológico complejo. En particular, los copolipéptidos se podrían formular como suspensiones acuosas, o mezclarlos con aceite y agua y autoensamblarse en nanoemulsiones; ciertos copolipéptidos antimicrobianos son tensioactivos eficaces (véase más adelante para las emulsiones).

De manera importante, los copolipéptidos sintéticos de secuencia en bloque  $K_{55}(\text{rac-L})_{20}$  en disolución no parecieron irritar las heridas abiertas. Como se representa en la Fig. 14, las pruebas histopatológicas sugieren que la inflamación estuvo al mismo nivel o a un nivel inferior que en los tratamientos de control.

También se descubrió que los copolipéptidos antimicrobianos en fase de disolución fueron muy eficaces en un modelo porcino de prevención de la infección. Como se representa en la Fig. 15, una disolución de  $K_{55}(rac-L)_{20}$  aplicada a una herida abierta antes de la inoculación con *S. aureus* previno completamente la infección microbiana. En estudios diferentes, el copolipéptido  $K_{55}(rac-L)_{20}$ , en el que el bloque hidrófobo es poli-D/L-leucina racémica, mostró una biocompatibilidad tisular excelente en los modelos animales. Por ejemplo, en un estudio porcino de herida abierta de dos días (Fig. 16), el análisis histológico (llevado a cabo por un patólogo veterinario) mostró que "los exudados serocelulares y la inflamación neutrofílica fueron levemente y mínimamente menos graves, respectivamente" en los animales tratados con  $K_{55}(rac-L)_{20}$  respecto de los controles. No se observaron diferencias en la inflamación mononuclear, edema o hemorragia. En un estudio porcino de cicatrización de heridas de 21 días (sin infectar), se descubrió que las heridas tratadas con  $K_{55}(rac-L)_{20}$  y tratadas con control fueron similares con respecto a la inflamación, necrosis y cobertura epitelial por parte de un patólogo veterinario (Fig. 17).

Emulsiones antimicrobianas basadas en copolipéptidos sintéticos. Estos copolipéptidos sintéticos se pueden diseñar para que sean tensioactivos eficaces que puedan estabilizar (y / o mostrar actividad en) emulsiones. Se ha demostrado que una diversidad de preparaciones en emulsión de copolipéptidos sintéticos son agentes antibacterianos eficaces *in vitro* (Figs. 18 y 19). En particular, se descubrió que estas emulsiones antimicrobianas fueron activas contra endosporas de *B. subtilis* (Fig. 33 (Tabla 5)). Como se describió previamente para los copolipéptidos en fase de disolución, las preparaciones en emulsión mostraron actividad antiviral contra el virus de la gripe H1N1 (Fig. 34 (Tabla 4)), así como contra un bacteriófago sin envoltura.

También se descubrió que las emulsiones antimicrobianas basadas en copolipéptidos sintéticos fueron eficaces en un modelo de prevención de la infección en roedores (Fig. 20). Se han demostrado reducciones de las poblaciones bacterianas en un modelo de prevención de la infección contra *S. aureus*. De manera coherente, se observaron reducciones dependientes de la concentración, en general una reducción de 1-4 unidades logarítmicas a 20 µg/ml de emulsiones basadas en copolipéptido  $K_{55}(rac-L)_{20}$ , y una reducción completa (o casi completa) a 2 mg/ml. Estos estudios indican que las formulaciones de emulsiones de copolipéptidos siguen siendo activas cuando se exponen a un fluido biológico complejo. Parece que las heridas toleran bien estas emulsiones antimicrobianas, y no dieron como resultado una inflamación incrementada respecto de los tratamientos de control, tal como se determinó mediante examen histológico (Fig. 21). Además, se descubrió que estas emulsiones antimicrobianas se toleraron bien en un modelo porcino de 21 días de cicatrización de heridas (no infectadas) (Fig. 22).

Los estudios adicionales indicaron que las emulsiones de copolipéptidos sintéticos antimicrobianos tienen menos citotoxicidad *in vitro* (Fig. 34 (Tabla 6)). En otros estudios, esta observación fue coherente para múltiples copolipéptidos sintéticos, que incluyen  $K_{55}(rac-L)_{20}$ ,  $K_{55}L_{20}$ ,  $K_{55}(rac-L/F)_{20}$ . En conjunto, estos datos indican que la disposición de los copolipéptidos sintéticos de secuencia en bloque en las estructuras jerárquicas de las emulsiones y nanoemulsiones puede mejorar la actividad antimicrobiana, reducir la toxicidad en mamíferos, o ambos.

Hidrogeles antimicrobianos basados en copolipéptidos sintéticos. Esta invención también describe copolipéptidos en bloque que se autoensamblan en fibrillas que forman hidrogeles antimicrobianos. Como se describe más adelante,  $K_{180}L_{20}$  es un agente formador de hidrogeles y ha mostrado una actividad antimicrobiana intensa *in vitro* y una prevención eficaz del crecimiento microbiano en estudios *in vivo*. Como se representa en la Fig. 23,  $K_{180}L_{20}$  mostró una actividad intensa de agente antimicrobiano *in vitro* (reducción 5+ unidades logarítmicas a 6,3 µg/mL) contra bacterias grampositivas (*S. aureus*, *S. epidermidis*) y gramnegativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*) que se sabe que son importantes en la infección de heridas. En los ensayos de destrucción en función del tiempo,  $K_{180}L_{20}$  a 100 µg/mL mostró una reducción mayor de 3 unidades logarítmicas en 5 min contra *S. epidermidis*, *E. coli*, y *P. aeruginosa*.

Otros estudios demostraron que los copolipéptidos en bloque  $K_{180}L_{20}$  son agentes antimicrobianos *in vivo*. Como se representa en la Fig. 24,  $K_{180}L_{20}$  fue eficaz en la inhibición del crecimiento microbiano en un modelo en roedores de herida cerrada con cuerpo extraño. En este modelo, se insertó de manera subcutánea una malla empapada previamente con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o  $K_{180}L_{20}$  en la región cervical dorsal de ratas Sprague-Dawley, seguido de  $10^6$  de *S. aureus* o *P. aeruginosa*. Se añadió más PBS o  $K_{180}L_{20}$ , se cerraron las heridas y los animales se devolvieron a sus jaulas durante 48 h.  $K_{180}L_{20}$  (2 mg/mL y 20 mg/mL) disminuyó sustancialmente el número de bacterias (tanto *S. aureus* como *P. aeruginosa*) cultivadas a partir de la malla y el tejido adyacente. No se observó una inflamación incrementada con este hidrogel antimicrobiano en el modelo de infección en roedores (Fig. 25).

En un estudio diferente, el hidrogel basado en el copolipéptido de secuencia en bloque  $K_{180}L_{20}$  fue eficaz en la inhibición de *S. aureus* en un modelo porcino de herida abierta (Fig. 26). Se hicieron heridas de 1 cm de diámetro de espesor completo en el tórax dorsal y lateral de un cerdo cruzado Yorkshire de 25-35 kg. Se aplicó el hidrogel de  $K_{180}L_{20}$  (o tampón de control), y después de cuatro hr, las heridas se inocularon con *S. aureus*. Las heridas se estudiaron después de 48 hr con respecto al recuento bacteriano mediante métodos habituales de microbiología. Como se representa en la Fig. 26, el hidrogel de  $K_{180}L_{20}$  redujo completamente el recuento de *S. aureus*.

Estructura de secuencia en bloque. En ciertas realizaciones, estas composiciones de copolipéptidos antimicrobianos pueden tener una estructura de secuencia en bloque, que incluye uno o más bloques que contienen segmentos de 2 o más aminoácidos / monómeros catiónicos consecutivos (p.ej., lisina, arginina), o segmentos de 2 o más aminoácidos / monómeros hidrófobos consecutivos (p.ej., leucina, isoleucina, valina, alanina, fenilalanina). En ciertos

casos, los compuestos tribloque o multibloque (es decir, varios bloques de aminoácidos distintos, monómeros y / u otros bloques poliméricos) pueden ser especialmente eficaces. Los bloques de aminoácidos o monómeros alternantes también pueden ser eficaces, mientras los bloques de secuencias aleatorias también pueden ser ventajosos en ciertas situaciones. Otras realizaciones también pueden presentar un bloque o segmento de copolipéptido del mismo aminoácido / monómero o de diferentes aminoácidos / monómeros que están unidos químicamente a un polímero diferente. También se prevé que la bioactividad y la composición química de los copolipéptidos / copolímeros en bloque pueden ser más reproducibles de lote a lote que la de los copolipéptidos / copolímeros aleatorios. También se prevé que los copolipéptidos en bloque pueden ser menos inmunógenos que los copolipéptidos aleatorios. Los bloques pueden estar compuestos de aminoácidos naturales y / o no naturales que muestran diferentes grados de hidrofiliidad o hidrofobicidad. Se pueden usar aminoácidos naturales (hidrófobos, tales como, pero sin limitación, alanina, glicina, isoleucina, leucina, fenilalanina, valina, e hidrófilos, tales como, pero sin limitación, arginina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, lisina, serina, tirosina, o treonina) o aminoácidos no naturales, tales como, pero sin limitación, hidrocarburos fluorados o insaturados, así como mezclas enantiopuras o racémicas. Además, los materiales polipeptídicos o híbridos que contienen polímeros sintéticos y segmentos o bloques peptídicos también pueden mostrar una actividad antimicrobiana incrementada, una toxicidad disminuida en mamíferos, o ambas. Por ejemplo, se puede conjugar un polipéptido hidrófobo a un polímero u oligómero hidrófilo, o un polímero u oligómero sintético hidrófobo se puede conjugar a un péptido hidrófilo y mostrar características similares a las de un material compuesto completamente por aminoácidos unidos. También se puede sustituir un segmento, bloque o dominio peptídico por un segmento oligomérico o polimérico sintético, lo que incluye la incorporación directa en el esqueleto del polímero, o como un injerto.

Se ha demostrado que se puede usar la estructura de secuencia en bloque para dirigir la autoasociación o el autoensamblaje molecular. Por ejemplo, se demostró determinando la concentración de agregación crítica (CAC) que el copolipéptido de secuencia en bloque  $K_{55}L_{20}$  muestra una autoasociación sustancialmente más intensa (CAC=0,33  $\mu\text{M}$ ) que la secuencia aleatoria  $K_{55}L_{20}$  (CAC=160  $\mu\text{M}$ ). Este elemento de diseño molecular es importante en las realizaciones preferidas de la invención que implican estructuras jerárquicas diseñadas.

Estructuras jerárquicas diseñadas. Estas composiciones se pueden formular como estructuras jerárquicas, tales como multímeros, micelas, hidrogeles, o vesículas, o mezclas de las mismas. La actividad antimicrobiana aumentada, o la toxicidad disminuida en mamíferos, o ambas, pueden proceder de la organización de los elementos antimicrobianos en estructuras de orden elevado que muestran las zonas activas de una manera más eficaz o con una concentración local más elevada. Por ejemplo, la mayor densidad de carga catiónica en las secciones hidrófilas de la interfase líquida de una emulsión puede conducir a una mejor interacción con los organismos microbianos. De forma similar, otras estructuras de orden elevado, tales como vesículas, micelas, lamelas o hidrogeles pueden transportar los elementos antimicrobianos de manera más eficaz que un elemento antimicrobiano aislado solo. Por otra parte, las interacciones secundarias presentes, y a veces responsables de las estructuras de orden superior de los segmentos hidrófobos en los polímeros anfífilicos, pueden ser responsables de la toxicidad reducida en mamíferos.

Estos copolipéptidos sintéticos diseñados se pueden autoensamblar en estructuras jerárquicas (p.ej., multímeros, micelas, emulsiones, hidrogeles, vesículas), y de ese modo aumentan la actividad del agente antimicrobiano (*in vitro* o *in vivo*), disminuyen la toxicidad, o ambas. Además, estos compuestos pueden precipitar fácilmente sobre y / o unirse directamente a los tejidos dañados, en los que pueden proporcionar una actividad local, concentrada de agente antimicrobiano.

En ciertas realizaciones, estas composiciones se pueden formular como, o mezclar en, emulsiones, microemulsiones o nanoemulsiones. En particular, estas emulsiones se pueden diseñar para que tengan una actividad elevada de agente antimicrobiano, una toxicidad baja en mamíferos, o ambas. Se reconoce que estas actividades pueden depender de uno o más factores adicionales, tales como la composición de la fase oleosa, o el tamaño de las gotículas.

En ciertas realizaciones, estos copolipéptidos de agentes antimicrobianos se pueden formular como hidrogeles. Estas moléculas de agentes antimicrobianos se autoensamblarían en hidrogeles. Se prevé que existirían ventajas con los hidrogeles físicos, que son intrínsecamente antimicrobianos que pueden ser capaces de pasar a través de aberturas de orificios pequeños (p.ej., agujas de 0,8 mm) o en espacios de tejidos pequeños, y después volver a gelificarse rápidamente. Estos copolipéptidos antimicrobianos que forman hidrogeles se pueden diseñar para que sean ligeramente adherentes al tejido y ópticamente transparentes. Se prevé que proporcionarán una actividad antimicrobiana localizada, concentrada, así como los beneficios de los hidrogeles estándar (p.ej., retención de fluidos). Las propiedades antimicrobianas de los copolipéptidos que se autoensamblan en fibrillas que forman hidrogeles se han demostrado a concentraciones muy por debajo de la concentración de gelificación. Por ejemplo, se ha demostrado que  $K_{180}L_{20}$  es un agente antimicrobiano potente a concentraciones de 10  $\mu\text{g/ml}$ , mientras su concentración de gelificación es de aprox. 10 mg/ml. Esto establece que el material es intrínsecamente antimicrobiano, mientras al mismo tiempo puede autoasociarse hasta estructuras jerárquicas que proporcionan propiedades macroscópicas a las preparaciones. Además, se ha demostrado que  $K_{180}L_2$  a concentraciones que forman hidrogeles (p.ej., 20 mg/ml) es un agente antimicrobiano eficaz en un modelo de prevención de la infección *in vivo*, y también que tiene una toxicidad baja en varios modelos *in vivo*.

Longitud de cadena larga. En ciertas realizaciones, estas composiciones de copolipéptidos antimicrobianos pueden tener una longitud de cadena relativamente larga (p.ej., más de 100 aminoácidos). Se prevé que los copolipéptidos sintéticos con una longitud de cadena más larga se pueden optimizar para que muestren una eficacia incrementada, una toxicidad disminuida en mamíferos o ambas en ciertas situaciones. En particular, pueden mostrar múltiples sitios activos, conformaciones, dominios, o fragmentos de manera más eficaz, y por lo tanto podrían continuar mostrando una actividad antimicrobiana incluso después de una complejación o degradación parcial. Los copolipéptidos de cadena larga pueden interaccionar de manera más eficaz con las superficies microbianas, e interaccionar con más de un microbio a la vez. Los polipéptidos más largos pueden ser capaces de alterar las membranas bacterianas de manera más eficaz mediante el entrecruzamiento de los componentes negativos de la membrana bacteriana. También pueden ser capaces de interaccionar con ciertas biomoléculas solubles o componentes tisulares, a la vez que dejan un segmento molecular libre para interaccionar con los microbios.

Contenido hidrófobo bajo. Estas composiciones pueden tener fracciones molares bajas de monómero hidrófobo (p.ej., leucina, isoleucina, valina, alanina, fenilalanina, o monómero hidrófobo no peptídico) en comparación con otros péptidos antimicrobianos, por ejemplo un 35% o menos. En la presente invención, se reconoce que los copolipéptidos en bloque con una fracción molar baja de monómeros hidrófobos (p.ej.,  $f_{HM} = 8\%$ , 18%, 25%, 35%) pueden producir una actividad antimicrobiana elevada y una toxicidad baja en mamíferos. Tales compuestos pueden superar las limitaciones específicas inherentes a los copolímeros con  $f_{HM}$  alta. Los copolímeros anfífilos con  $f_{HM}$  baja ofrecen varias ventajas diferentes. Por ejemplo, se prevé que el contenido hidrófobo reducido disminuya la toxicidad en mamíferos. Se ha informado que el contenido hidrófobo incrementado en los péptidos antimicrobianos incrementa la actividad hemolítica, posiblemente reduciendo la selectividad hacia las membranas bacterianas respecto de las de células de mamífero [22]. Otras ventajas pueden incluir una solubilidad mejorada en disolución acuosa. Ciertas composiciones de la presente invención incorporan  $f_{HM}$  bajas. De manera específica, se ha demostrado una actividad antimicrobiana elevada con una fracción molar de monómeros hidrófobos de solo alrededor del 8%. Además, se ha demostrado que la actividad antimicrobiana elevada se puede obtener disminuyendo el contenido hidrófobo o incrementando el contenido hidrófilo.

La pureza enantiomérica influye en la estructura secundaria. En ciertas realizaciones, la pureza enantiomérica de los aminoácidos (especialmente en el dominio hidrófobo) se puede usar para controlar las características de autoensamblaje. Por ejemplo, se demostró que  $K_{55L_{20}}$  y  $K_{55}(rac-L)_{20}$  consiguen una reducción de bacterias, para cepas grampositivas (*S. aureus*) y gramnegativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*) a una concentración muy baja (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Las mezclas racémicas, o mezclas con una pureza óptica variable, pueden ofrecer una solubilidad mejorada y una agregación reducida. De manera importante, la incorporación de una fracción de D-aminoácidos puede tener ventajas particulares en las aplicaciones terapéuticas contra biopelículas [38]. Además, la disminución de la pureza óptica elimina la estructura secundaria ordenada, que influye en las características de autoasociación y / o autoensamblaje. Por ejemplo, determinando la concentración de agregación crítica (CAC) se demostró que el copolipéptido de secuencia en bloque  $K_{55L_{20}}$  muestra una asociación más fuerte (CAC=0,33  $\mu\text{M}$ ) que  $K_{55}(rac-L)_{20}$  (CAC=8,1  $\mu\text{M}$ ).

Estabilidad en disolución baja con un contenido hidrófobo bajo. En ciertas realizaciones, estas composiciones de copolipéptidos antimicrobianos se pueden diseñar con una estabilidad en disolución relativamente baja. Además, estos materiales se pueden diseñar para unirse a / precipitar en sitios en los que interaccionan con elementos cargados negativamente hallados habitualmente en los microbios (p.ej., microcolonias bacterianas y biopelículas) y en sitios de daño tisular. Estas moléculas antimicrobianas "metaestables" en disolución pueden precipitar fácilmente (por ejemplo, al interaccionar con microbios o materiales tisulares de mamífero de carga opuesta). Se pueden obtener ciertas ventajas de los copolipéptidos sintéticos que precipitan fácilmente sobre y / o se unen directamente a los tejidos dañados, donde pueden proporcionar una actividad antimicrobiana local y concentrada. Además, los copolipéptidos antimicrobianos (u otros materiales antimicrobianos) se pueden hacer más eficaces en ciertas situaciones mediante la unión a / precipitación en sitios de microbios (p.ej., microcolonias bacterianas y biopelículas). Se pueden incorporar ciertos elementos de diseño de forma que las estructuras jerárquicas de copolipéptidos sintéticos permanezcan completamente solvatadas en ausencia de materiales biológicos (p.ej., suero, fluidos de heridas, tejidos dañados, biopelículas bacterianas), pero se hagan metaestables tras unirse a materiales biológicos. Una vez que los materiales antimicrobianos se hacen metaestables, pueden depositarse en los tejidos o colonias bacterianas, y así incrementan drásticamente la concentración local que actúa como agente antimicrobiano y / o como barrera antimicrobiana.

Multivalencia. En ciertas realizaciones, estas composiciones se pueden modificar para que incluyan múltiples sitios de agentes antimicrobianos. Estos sitios antimicrobianos pueden incluir regiones locales de carga catiónica y / o regiones locales de hidrofobicidad. Por lo tanto, un único material podría tener varios sitios activos diferentes capaces de destruir / inhibir microbios. De esta manera, una única construcción supramolecular podría realizar una aproximación "de doble efecto", lo que proporciona una mayor eficacia y además disminuye la probabilidad de resistencia microbiana. Además, se puede observar una actividad aditiva o sinérgica. Además, el material puede liberar fragmentos antimicrobianos a medida que se degrada.

Selectividad hacia microbios. Estas composiciones se pueden modificar para seleccionar como objetivo preferentemente ciertos microbios sobre otros. En particular, la selección como objetivo de organismos tradicionalmente patógenos (p.ej., *S. aureus*, *S. aureus* resistente a meticilina (SARM)) sobre la flora

tradicionalmente normal (p.ej., *P. acnes*), puede ser especialmente beneficiosa. Además, la selección como objetivo de virus seleccionados, bacterias u hongos puede ser relevante en situaciones clínicas particulares, tales como el uso de un desinfectante de manos o en la prevención de infecciones de heridas. Se han desarrollado múltiples copolipéptidos sintéticos que han mostrado una actividad mayor contra *S. aureus* que contra *P. acnes in vitro*.

- 5 Mezclas. En ciertas realizaciones, estas composiciones se pueden formular con dos o más copolipéptidos / copolímeros antimicrobianos diferentes. De esta manera, una composición podría realizar una aproximación "de doble efecto", lo que proporciona una mayor eficacia y además disminuye el desarrollo de resistencia microbiana. Además, se puede observar una actividad aditiva o sinérgica.

- 10 En ciertas realizaciones, estas composiciones se pueden sintetizar con la modificación química de aminoácidos o residuos monoméricos, por ejemplo, la conversión de una amina primaria (p.ej., de un monómero de lisina) en un grupo guanidinio. Otras modificaciones pueden incluir la alquilación, acilación, amidación, halogenación, transesterificación, aminación reductora u otras transformaciones químicas que añaden una funcionalidad o modifican una funcionalidad existente de los aminoácidos o residuos monoméricos.

- 15 En ciertas realizaciones, estas composiciones se pueden formular con clases diferentes de otros agentes antimicrobianos (p.ej. alcohol, compuestos basados en cloro, compuestos de amonio cuaternario, compuestos fenólicos, clorhexidina, antibióticos, anticuerpos). Esto puede incluir mezclar las composiciones de la invención con agentes antimicrobianos conocidos. Puede incluir formular copolipéptidos / copolímeros sintéticos como un tipo de agente de administración o de liberación retardada (p.ej., emulsión, nanoemulsión doble, vesícula, hidrogel) e incorporar una o más sustancias antimicrobianas adicionales.

- 20 En ciertas realizaciones, estas composiciones se pueden formular con materiales bioactivos u otros ingredientes farmacéuticos activos (IFAs). De esta manera, las formulaciones podrían proporcionar una actividad antimicrobiana, así como una segunda o tercera función. Las posibilidades incluyen, pero sin limitación, materiales hemostáticos, factores de crecimiento para favorecer la cicatrización de heridas, agentes pro- o antiinflamatorios, y moduladores inmunitarios.

- 25 En ciertas realizaciones, los copolipéptidos / copolímeros antimicrobianos sintéticos se pueden diseñar para que contengan otros elementos bioactivos (p.ej., secuencias específicas, bloques, estructuras jerárquicas o modificaciones químicas). Por ejemplo, pueden contener elementos que estimularían la hemostasia mediante uno o más mecanismos tales como la unión de plaquetas, la activación de plaquetas, la aceleración de la coagulación, la disminución de la fibrinólisis, la absorción de fluidos o efectos de barrera física. Esta invención prevé copolipéptidos sintéticos que son de naturaleza hemostática, así como aquellos que tienen actividades antimicrobianas y hemostáticas combinadas (Figs. 27 - 32, Fig. 39 (Tabla 7)).

### Sección experimental

- 35 General. Se preparó tetrahidrofurano seco (THF) haciéndolo pasar a través de una columna empaquetada con alúmina bajo nitrógeno antes del uso. Los pesos moleculares (*M<sub>n</sub>*) y las polidispersidades (PDIs) se obtuvieron mediante cromatografía de permeabilidad en gel/dispersión de luz en tándem (GPC/LS) llevada a cabo a 60 °C con una bomba SSI equipada con un detector de dispersión de luz Wyatt DAWN EOS y un aparato Wyatt Optilab DSP con columnas Phenomenex de 5 μm de 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, y 10<sup>3</sup> Å mediante el uso de LiBr 0,1 M en DMF como eluyente y una concentración de polipéptido de aproximadamente 5 mg/mL. Se registraron los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) en un espectrofotómetro Perkin Elmer RX1 FTIR calibrado mediante el uso de una película de poliestireno. Los espectros de <sup>1</sup>H RMN se registraron en un espectrómetro Bruker AVANCE de 400 MHz. Se purificó agua desionizada (DI) mediante el uso de un purificador de ósmosis inversa Purelab Option 560. Se obtuvo agua Millipore de una unidad de purificación Millipore Milli-Q Biocel A10.

- 45 Síntesis de copolipéptidos en bloque-General. Se sintetizaron monómeros de α-aminoácido-N-carboxianhídrido NCA mediante el uso de protocolos publicados previamente en la bibliografía. Todos los copolipéptidos en bloque se polimerizaron mediante el uso del iniciador (PMe<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Co. Los polipéptidos resultantes se caracterizaron mediante el uso de GPC, <sup>1</sup>H RMN y espectroscopía IR. Se determinaron las composiciones de los copolímeros mediante análisis de los valores de integración de los espectros de <sup>1</sup>H RMN registrados en *d*-TFA. Se descubrió que todas las composiciones estuvieron dentro del 5% de los valores predichos. Las distribuciones de longitudes de cadenas de los polímeros oscilaron (*M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub>*) de 1,1 a 1,3.

- 50 Poli(N<sub>ε</sub>-CBZ-L-lisina)<sub>55</sub>-*b*-poli(*rac*-leucina)<sub>20</sub>, Z-K<sub>55</sub>(*rac*-L)<sub>20</sub>. En la caja seca, se colocó N<sub>ε</sub>-CBZ-L-lisina, Z-K NCA (11,34 g, 37 mmol) en un matraz de fondo plano de 500 mL con una barra de agitación. Se añadió THF seco (227 mL) y después se selló con un tapón de plástico. Después se añadió una alícuota de (PMe<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Co (18,9 mL de una disolución de 40 mg/mL en THF seco, 2,1 mmol) por medio de una jeringa, y el matraz se selló y se agitó durante 45 minutos. Se extrajo una alícuota (50 μL) de la polimerización para el análisis mediante GPC (*M<sub>n</sub>* = 14,7 × 10<sup>3</sup> g/mol, *M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub>* = 1,12). Después, la reserva de poli(N<sub>ε</sub>-CBZ-L-lisina)<sub>55</sub> se dividió igualmente en 8 fracciones (0,26 mmol de iniciador (PMe<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Co en cada una) y se colocó en matraces de fondo plano de 125 mL. A cada fracción se le añadió una cantidad diferente de D,L NCA hidrófobo según fue necesario. Por ejemplo, para sintetizar Z-K<sub>55</sub>(*rac*-L)<sub>20</sub> se añadió una alícuota de D,L leucina (L) NCA (5,3 mL de una disolución de 50 mg/mL en THF, 1,7 mmol) y se dejó

polimerizar durante la noche.

Se usó un procedimiento similar para producir los copolímeros en bloque siguientes: Z-K<sub>55</sub>(rac-L)<sub>5</sub>, D,L leucina NCA (1,3 mL de una disolución de 50 mg/mL en THF, 0,42 mmol); Z-K<sub>55</sub>(rac-L)<sub>10</sub>, D,L leucina NCA (2,7 mL de una disolución de 50 mg/mL en THF, 0,84 mmol); Z-K<sub>55</sub>(rac-L)<sub>30</sub>, D,L leucina NCA (7,9 mL de una disolución de 50 mg/mL en THF, 2,5 mmol); Z-K<sub>55</sub>(rac-L)<sub>20</sub>, D,L isoleucina (I) NCA (5,3 mL de una disolución de 50 mg/mL en THF, 1,7 mmol); Z-K<sub>55</sub>(rac-L/F)<sub>20</sub>, D,L leucina NCA (2,6 mL de una disolución de 50 mg/mL en THF, 0,84 mmol) y D,L fenilalanina (F) NCA (3,2 mL de una disolución de 50 mg/mL en THF, 0,84 mmol); Z-K<sub>55</sub>(rac-A)<sub>20</sub>, D,L alanina (A) NCA (3,9 mL de una disolución de 50 mg/mL en THF, 1,7 mmol); y Z-K<sub>55</sub>(rac-V)<sub>20</sub>, D,L valina (V) NCA (5,3 mL de una disolución de 50 mg/mL en THF, 1,7 mmol).

10 Poli(L-Lisina·HCl)<sub>55</sub>-b-poli(rac-Leucina)<sub>20</sub>, K<sub>55</sub>(rac-L)<sub>20</sub>. La poli(N<sub>ε</sub>-CBZ-L-lisina)<sub>55</sub>-b-poli(rac-leucina)<sub>20</sub> se extrajo de la caja seca. El THF se eliminó a presión reducida y después se disolvió en ácido trifluoroacético (TFA) (50 mL). A continuación, el matraz se colocó en un baño de hielo seguido de la adición de HBr (33% en ácido acético, 6,0 mL, 19,7 mmol) y se agitó durante dos hrs. El polímero desprotegido se aisló mediante la adición de éter dietílico a la mezcla de reacción (50 mL), seguido de centrifugación (tres min a 3.000 rpm). El polímero precipitado se lavó después y se centrifugó dos veces más con éter dietílico. El polímero aislado se disolvió después en agua Millipore y se dializó (membrana de MWCO 2.000) con EDTA tetrasódico (3 mmol, cuatro días), HCl 0,1 M (dos días), agua DI (un día), NaCl 0,1 M (dos días), agua Millipore (dos días), cambiando cada disolución dos veces/día. El polímero dializado se aisló mediante liofilización para proporcionar el producto en forma de un polvo blanco seco (0,80 g, 84%).

20 Se usó un procedimiento similar para producir los copolímeros en bloque siguientes: K<sub>55</sub>(rac-L)<sub>5</sub> (0,51 g, 62%), K<sub>55</sub>(rac-L)<sub>10</sub> (0,70 g, 81 %), K<sub>55</sub>(rac-L)<sub>30</sub> (0,77 g, 74 %), K<sub>55</sub>(rac-L)<sub>20</sub> (0,78 g, 81 %), K<sub>55</sub>(rac-L/F)<sub>20</sub> (0,74 g, 79 %), K<sub>55</sub>(rac-A)<sub>20</sub> (0,82 g, 92 %), y K<sub>55</sub>(rac-V)<sub>20</sub> (0,82 g, 88 %).

25 Poli(etilen glicol)<sub>205</sub>-b-poli(rac-leucina)<sub>20</sub>, PEG<sub>204</sub>(rac-L)<sub>20</sub>. Antes del uso, se secaron 0,50 g de éter monometílico de poli(etilen glicol) terminado en ω-amino, PEG<sub>205</sub>-NH<sub>2</sub>, (Mn = 9.000 g/mol, PDI = 1,08) disolviéndolo en benceno seco seguido de eliminación del disolvente mediante destilación para producir un sólido seco. En una caja seca, se disolvió PEG<sub>205</sub>-NH<sub>2</sub> (0,50 g, 5,6 × 10<sup>-5</sup> moles) en 4,0 mL de DMF seca. A continuación, se disolvió L-Leucina NCA (83 mg, 0,53 mmol) y D-Leucina NCA (83 mg, 0,53 mmol) en DMF seca (2,5 mL) y después se añadió a la mezcla de polimerización. La disolución se agitó durante tres días a temperatura ambiente hasta que polimerizó completamente. Después se extrajo de la caja seca y se añadieron 5 mL de agua Millipore, y después se transfirió a una membrana de diálisis (membrana de MWCO 2.000) y se dializó con agua Millipore (tres días), cambiando cada disolución dos veces/día. El polímero dializado se aisló mediante liofilización para proporcionar el producto en forma de un polvo blanco seco (0,51 g, 82%). <sup>1</sup>H-RMN

35 Poli(L-glutamato-Na)<sub>64</sub>-b-poli(rac-leucina)<sub>20</sub>, E<sub>64</sub>(rac-L)<sub>20</sub>. En la caja seca, se colocó γ-bencil-L-glutamato, Bzl-Glu NCA (5,00 g, 19 mmol) en un matraz de fondo plano de 250 mL con una barra de agitación. Se añadió THF seco (100 mL) y después se selló con un tapón de plástico. Después se añadió una alícuota de (PMe<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Co (11,5 mL de una disolución de 40 mg/mL en THF seco, 1,27 mmol) por medio de una jeringa, y el matraz se selló y se agitó durante 1 hora. Se extrajo una alícuota (50 μL) de la polimerización para el análisis mediante GPC (Mn = 13,9 × 10<sup>3</sup> g/mol, Mw/Mn = 1,27). A continuación, se añadió una alícuota de D,L leucina (L) NCA (18,7 mL de una disolución de 50 mg/mL en THF, 6,0 mmol) y se dejó polimerizar durante la noche. A continuación, el THF se eliminó a presión reducida y después se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (100 mL). Para eliminar los grupos protectores bencilo, se añadió yodotrimetilsilano por medio de una jeringa (10,8 mL, 76 mmol). Se unió un condensador de reflujo al matraz y se sometió a reflujo durante la noche a 40 °C. A continuación, el disolvente se eliminó a presión reducida y se añadió NaOH 1 M y se agitó durante la noche, después se filtró para eliminar el precipitado y se dializó (membrana de MWCO 6-8.000) con bisulfato sódico 5 mM y NaOH 0,1 M (tres días), después agua Millipore (cuatro días), cambiando cada disolución dos veces/día. La disolución clara se liofilizó después para proporcionar un sólido blanco esponjoso (1,26 g, 36 %).

50 Poli(L-homoarginina·HCl)<sub>55</sub>-b-poli(rac-Leucina)<sub>20</sub>, R<sup>H</sup><sub>55</sub>(rac-L)<sub>20</sub>. A un matraz de fondo redondo de 500 mL que contenía una barra de agitación se le añadió K<sub>55</sub>(rac-L)<sub>20</sub> (1,00 g, 0,09 mmol) y después se dispersó en NaOH 1 M (137 mL). A continuación, se añadió nitrato de 3,5-dimetil-1-pirazol formamidinio (3,93 g, 19,6 mmol). El pH se ajustó a pH = 10 mediante el uso de HCl y después se colocó en un baño de aceite a 40 °C y se agitó durante 48 horas. Para detener la reacción, la disolución se acidificó con HCl 0,1 M a un pH = 3, después se colocó en una bolsa de diálisis (MWCO 2.000) y se dializó con agua Millipore (cinco días), cambiando cada disolución dos veces/día. El polímero dializado se aisló mediante liofilización para proporcionar el producto en forma de un polvo blanco (0,95 g, 78%).

55 Poli(L-Lisina·HCl)<sub>80</sub>-co-poli(L-Lisina)<sub>80</sub>, K<sub>80</sub>(rac-L)<sub>20</sub>. A un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL que contenía una barra de agitación se le añadió Poli(L-Lisina·HCl)<sub>80</sub>, K<sub>80</sub> (75 mg, 5,7 μmol) y después se disolvió en tampón de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 50 mM (15 mL). A continuación, se añadió tetrahidrofurano (THF) (14,3 mL). A esta disolución, se le añadió N-hidroxi succinimida (530 μL de una disolución de 10 mg/mL en THF/agua, 46 μmol), ácido octanoico (660 μL de una disolución de 10 mg/mL en THF, 46 μmol), y 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (2,6 mL de una disolución de 50 mg/mL en THF/agua, 0,68 mmol). La disolución se dejó con agitación

60

durante la noche. Al día siguiente, la disolución se colocó en una bolsa de diálisis (MWCO 2.000) y se dializó con agua Millipore (tres días), HCl 0,01 M (dos días), NaOH 0,01 M (un día), HCl 0,01 M (un día), agua Millipore (dos días), cambiando cada disolución dos veces/día. El polímero dializado se aisló mediante liofilización para proporcionar el producto en forma de un polvo blanco (68 mg, 85%).

- 5 Concentración de agregación crítica (CAC) por medio de fluorescencia de pireno. Se dispersaron disoluciones de polipéptido (2 mL) en agua en un intervalo de concentraciones ( $2,0 \times 10^{-3}$  a  $2,0 \times 10^{-12}$  M). Se hizo una disolución de reserva de pireno disolviendo pireno en acetona ( $6,0 \times 10^{-2}$  M). A continuación, se añadió una cantidad adecuada de la disolución de reserva de pireno para proporcionar una concentración final de  $12 \times 10^{-7}$  M en agua, y la acetona se evaporó. A cada disolución de polipéptido se le añadieron 2,0 mL de la disolución de reserva acuosa de pireno para proporcionar una concentración final de  $6,0 \times 10^{-7}$  M. Después, cada disolución se dejó equilibrar durante la noche antes de las medidas. Para registrar los espectros de fluorescencia, se añadieron 3,0 mL de cada disolución de polipéptido a una cubeta de poliestireno de 4,0 mL. Los espectros de excitación se registraron en un intervalo de 300 - 360 nm a una longitud de onda de emisión de 390 nm. Todos los espectros se realizaron con un tiempo de integración de 1 seg/0,5 nm. Se representó la proporción de las intensidades de dos picos I338/I333 como una función de la concentración de polipéptido (M) para cada muestra. Las CACs se determinaron como la intersección de los ajustes lineales extrapolados de la gráfica.

- 20 Preparación de emulsiones. En una formulación típica, se añadieron 800  $\mu$ L de una disolución de polipéptido del 1 %p/v a un tubo de centrifuga estéril de 1,5 mL. A continuación, se añadieron 200  $\mu$ L de fase oleosa, en general polidimetilsiloxano (PDMS) con una viscosidad de 10 cSt (esterilizado mediante filtración a través de un filtro estéril de 0,2  $\mu$ m), para proporcionar una fracción de volumen final,  $\phi = 0,2$ . La disolución se emulsionó durante un minuto mediante el uso de un homogeneizador ultrasónico manual (Cole-Parmer serie 4710 modelo ASI con una salida del 35-40%) para formar gotículas de escala nanométrica (diámetro de ~400-500 nm basado en las medidas de dispersión de luz dinámica DLS).

## REFERENCIAS

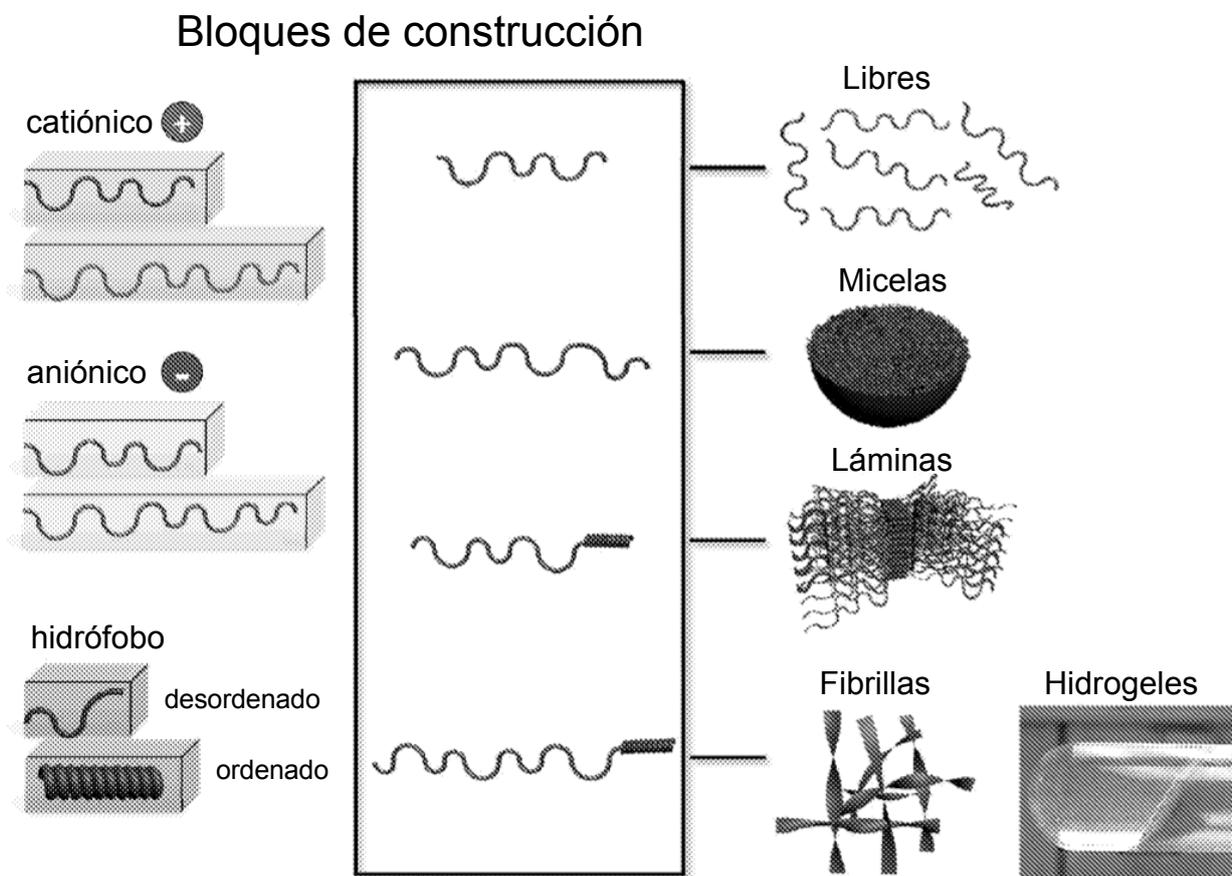
- 25 1. Gilbert, P.a.M., L. E., Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology*, 2005. 99(4): p. 703-715.
2. Lio, P., A. y Kaye, E., T., Topical antibacterial agents. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2009. 23(4): p. 945-963.
3. Landman, D., et al., Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev*, 2008. 21(3): p. 449-65.
- 30 4. Stickler, D.J. y B. Thomas, Antiseptic and antibiotic resistance in Gram-negative bacteria causing urinary tract infection. *J Clin Pathol*, 1980. 33(3): p. 288-96.
5. Higgins, C.S., et al., Resistance to antibiotics and biocides among non-fermenting Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiological Infections*, 2001. 7: p. 308-315.
- 35 6. Boyce, J.M.a.P., D., Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2002. 51(RR-16): p. 1-54.
7. Eberlein, T.a.A., O., Clinical use of polihexanide on acute and chronic wounds for antisepsis and decontamination. *Skin Pharmacology and Physiology*, 2010. 23 Suppl: p. 45-51.
8. Oie, S. y A. Kamiya, Microbial contamination of antiseptics and disinfectants. *Am J Infect Control*, 1996. 24(5): p. 389-95.
- 40 9. Zasloff, M., Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002. 415(6870): p. 389-95.
10. Zaiou, M., Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J Mol Med (Berl)*, 2007. 85(4): p. 317-29.
11. Hancock, R.E. y R. Lehrer, Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol*, 1998. 16(2): p. 82-8.
- 45 12. Yeaman, M.R. y N.Y. Yount, Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev*, 2003. 55(1): p. 27-55.
13. Brogden, K.A., Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 2005. 3(3): p. 238-50.
14. Bani-Jaber, A., et al., Efficacy of the Antimicrobial Peptide Nisin in Emulsifying Oil in Water. *Journal of Food*

- Science, 2000. 65(3): p. 502-506.
15. Salick, D.A., et al., Inherent antibacterial activity a peptide-based beta-hairpin hydrogel. *J Am Chem Soc*, 2007. 129(47): p. 14793-9.
- 5 16. Liu, D. y W.F. DeGrado, De novo design, synthesis, and characterization of antimicrobial beta-peptides. *J Am Chem Soc*, 2001. 123(31): p. 7553-9.
17. Epanand, R.F., et al., Dual mechanism of bacterial lethality for a cationic sequence-random copolymer that mimics host-defense antimicrobial peptides. *J Mol Biol*, 2008. 379(1): p. 38-50.
18. Porter, E.A., B. Weisblum, y S.H. Gellman, Mimicry of host-defense peptides by unnatural oligomers: antimicrobial beta-peptides. *J Am Chem Soc*, 2002. 124(25): p. 7324-30.
- 10 19. Gabriel, G.J., et al., Infectious Disease: Connecting Innate Immunity to Biocidal Polymers. *Mater Sci Eng R Rep*, 2007. 57(1-6): p. 28-64.
20. Liu, D., et al., Nontoxic membrane-active antimicrobial arylamide oligomers. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2004. 43(9): p. 1158-62.
- 15 21. Tew, G.N., et al., Antimicrobial activity of an abiotic host defense peptide mimic. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1758(9): p. 1387-92.
22. Ilker, M.F., et al., Tuning the hemolytic and antibacterial activities of amphiphilic polynorbornene derivatives. *J Am Chem Soc*, 2004. 126(48): p. 15870-5.
23. Kuroda, K., G.A. Caputo, y W.F. DeGrado, The role of hydrophobicity in the antimicrobial and hemolytic activities of polymethacrylate derivatives. *Chemistry*, 2009. 15(5): p. 1123-33.
- 20 24. Wang, Y., et al., Antimicrobial and Hemolytic Activities of Copolymers with Cationic and Hydrophobic Groups: A Comparison of Block and Random Copolymers. *Macromolecular Bioscience*, 2011: p. n/a-n/a.
25. Goodson, B., et al., Characterization of novel antimicrobial peptoids. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. 43(6): p. 1429-34.
26. Deming, T.J., Polypeptide and Polypeptide Hybrid Copolymer Synthesis via NCA Polymerization. *ChemInform*, 2007. 38(5): p. no-no.
27. Deming, T.J., Methodologies for preparation of synthetic block copolypeptides: materials with future promise in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002. 54: p. 1145-1155.
28. Wyrsta, M.D., Synthesis and studies of polypeptide materials: Self-assembled block copolypeptide amphiphiles, DNA-condensing block copolypeptides and membrane-interactive random copolypeptides, 2002, University of California, Santa Barbara. p. 125.
- 30 29. Wyrsta, M.D., A.L. Cogen, y T.J. Deming, A parallel synthetic approach for the analysis of membrane interactive copolypeptides. *J Am Chem Soc*, 2001. 123(51): p. 12919-20.
30. Deming, T.J., Synthetic polypeptides for biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 2007. 32: p. 858-875.
- 35 31. Zhou, C., et al., High potency and broad-spectrum antimicrobial peptides synthesized via ring-opening polymerization of alpha-aminoacid-N-carboxyanhydrides. *Biomacromolecules*, 2010. 11(1): p. 60-7.
32. Yang, C.Y., et al., Biocompatibility of amphiphilic diblock copolypeptide hydrogels in the central nervous system. *Biomaterials*, 2009. 30: p. 2881-2898.
33. Hanson, J.A., et al., Nanoscale double emulsions stabilized by single-component block copolypeptides. *Nature*, 2008. 455: p. 85-89.
- 40 34. Ho, Y.-T., S. Ishizaki, y M. Tanaka, Improving emulsifying activity of [var epsilon]-polylysine by conjugation with dextran through the Maillard reaction. *Food Chemistry*, 2000. 68(4): p. 449-455.
35. Lam, H., et al., D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. *Science*, 2009. 325(5947): p. 1552-5.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición de agente antimicrobiano que comprende:  
al menos una especie de copolipéptido sintético de al menos cuarenta residuos de aminoácidos que comprende:  
al menos un segmento hidrófilo que contiene al menos cinco residuos de aminoácidos catiónicos contiguos; y  
5 al menos un segmento hidrófobo que contiene al menos cinco residuos de aminoácidos hidrófobos contiguos;  
en el que el segmento hidrófilo contiene un número mayor de residuos de aminoácidos que el segmento hidrófobo; y  
agua;  
en la que la composición de dicho copolipéptido en medio acuoso forma estructuras; y en la que la composición  
inhibe o destruye microbios.
- 10 2. La composición como se describió en la reivindicación 1, en la que el copolipéptido sintético comprende  
sustancialmente solamente aminoácidos naturales, y/o en la que la proporción del número de aminoácidos del  
segmento hidrófilo respecto del número de aminoácidos del segmento hidrófobo es al menos de 1,8 a 1.
3. La composición como se describió en la reivindicación 1, en la que las estructuras formadas en medio acuoso  
se seleccionan del grupo que consiste en multímeros en disolución, micelas, láminas, vesículas, y fibrillas.
- 15 4. La composición como se describió en la reivindicación 1, en la que el copolipéptido se caracteriza por la  
capacidad de formar mezclas en agua sin un precipitado visible a temperatura ambiente a concentraciones de hasta  
10 o 100 veces por encima de la concentración de agregación crítica (CAC), en particular a concentraciones de al  
menos 1000 µg/mL.
- 20 5. La composición como se describió en la reivindicación 1, en la que el copolipéptido tiene una concentración de  
agregación crítica (CAC) en agua que es al menos 1 unidad logarítmica inferior a la de un copolipéptido de  
secuencia aleatoria de la misma composición de aminoácidos.
6. La composición como se describió en la reivindicación 1, caracterizada porque destruye o inhibe microbios *in vitro*  
a una concentración inferior que la que destruye células de mamífero *in vitro* o en o sobre tejidos de mamífero  
*in vivo* a concentraciones que muestran una toxicidad baja para esos tejidos.
- 25 7. La composición como se describió en la reivindicación 1, caracterizada porque destruye o inhibe microbios *in vitro*  
tal como se mide por más de 3 unidades logarítmicas de destrucción de *Staphylococcus epidermidis* y  
*Escherichia coli* en ensayos de destrucción estándar de 60 minutos a concentraciones de copolipéptido de 100  
µg/mL o menos.
- 30 8. La composición como se describió en la reivindicación 1, caracterizada porque el copolipéptido forma mezclas  
en agua sin un precipitado visible a temperatura ambiente a concentraciones al menos 10 veces por encima de la  
concentración necesaria para inhibir o destruir microbios *in vitro*, tal como se mide por más de 3 unidades  
logarítmicas de destrucción de *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli* en ensayos de destrucción estándar de  
60 minutos.
- 35 9. La composición como se describió en la reivindicación 1, que tiene un módulo de almacenamiento de al menos  
50 Pa a una concentración del copolipéptido de menos de 40 mg/mL.
10. La composición como se describió en la reivindicación 1, en la que la composición estimula la agregación  
plaquetaria o inhibe la fibrinólisis.
11. La composición como se describió en la reivindicación 1, que comprende además una combinación de fases  
inmiscibles en una mezcla o emulsión dispersada.
- 40 12. La composición como se describió en la reivindicación 1, formulada como una disolución, un gel, una crema,  
una espuma, o un apósito.
13. La composición como se describió en la reivindicación 1, que comprende además un ingrediente farmacéutico  
activo (IFA) añadido seleccionado de esteroides, agentes proinflamatorios, agentes antiinflamatorios, agentes anti-  
acné, conservantes, agentes hemostáticos, agentes angiogénicos, agentes de cicatrización de heridas, agentes  
45 antineoplásicos y otros agentes antimicrobianos.
14. El uso de una cantidad eficaz de la composición como se describió en la reivindicación 1 para la fabricación de  
un medicamento para la prevención o el tratamiento de infecciones, para la anti-infección tópica, para la  
descolonización microbiana, para el tratamiento de heridas, para el tratamiento de sitios quirúrgicos, para el  
tratamiento de traumatismos, para el tratamiento de quemaduras, para el tratamiento de úlceras en el pie diabético,  
50 para el tratamiento ocular, para las infecciones vaginales, o para las infecciones del tracto urinario.

Fig. 1



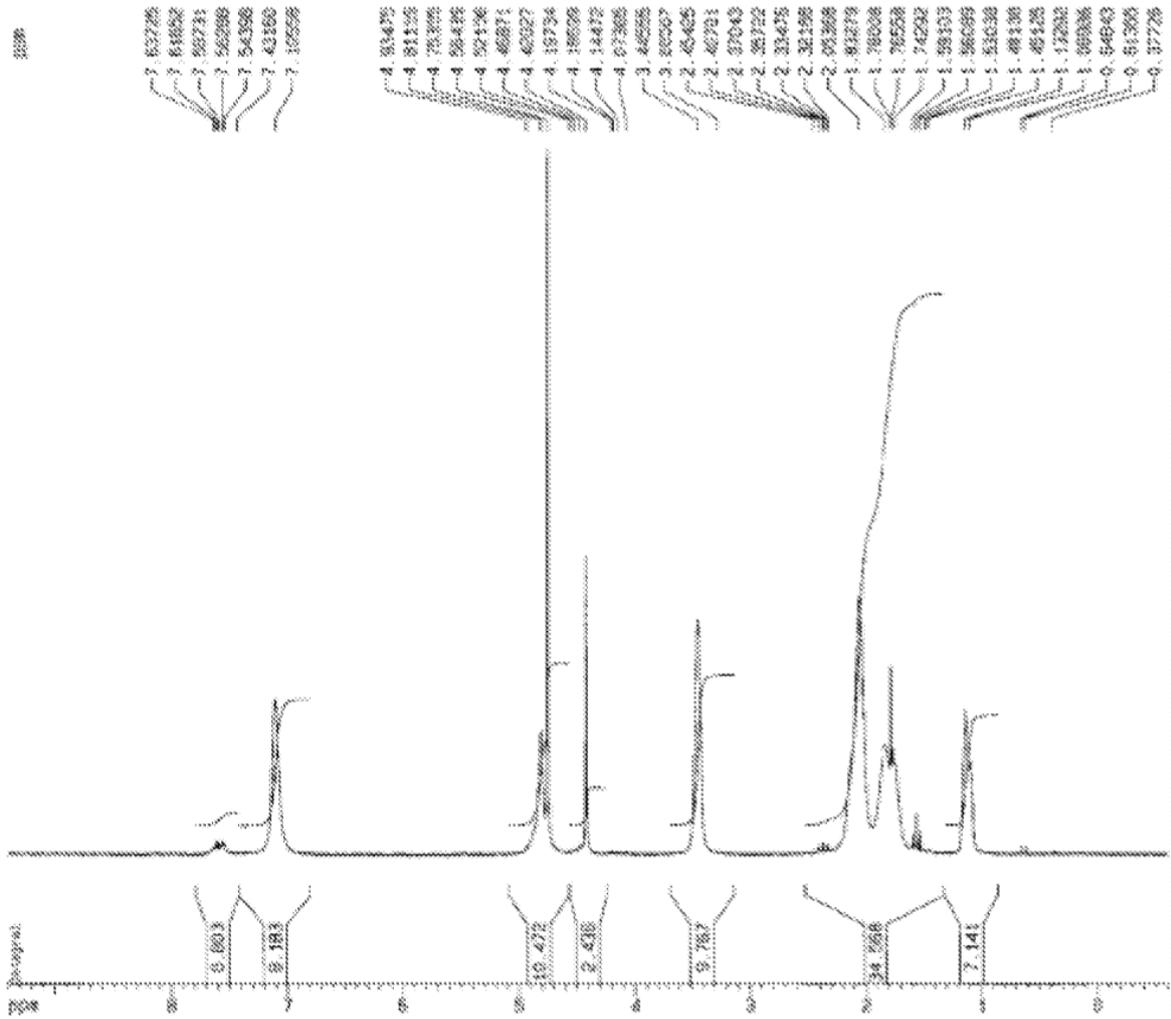


Fig. 2

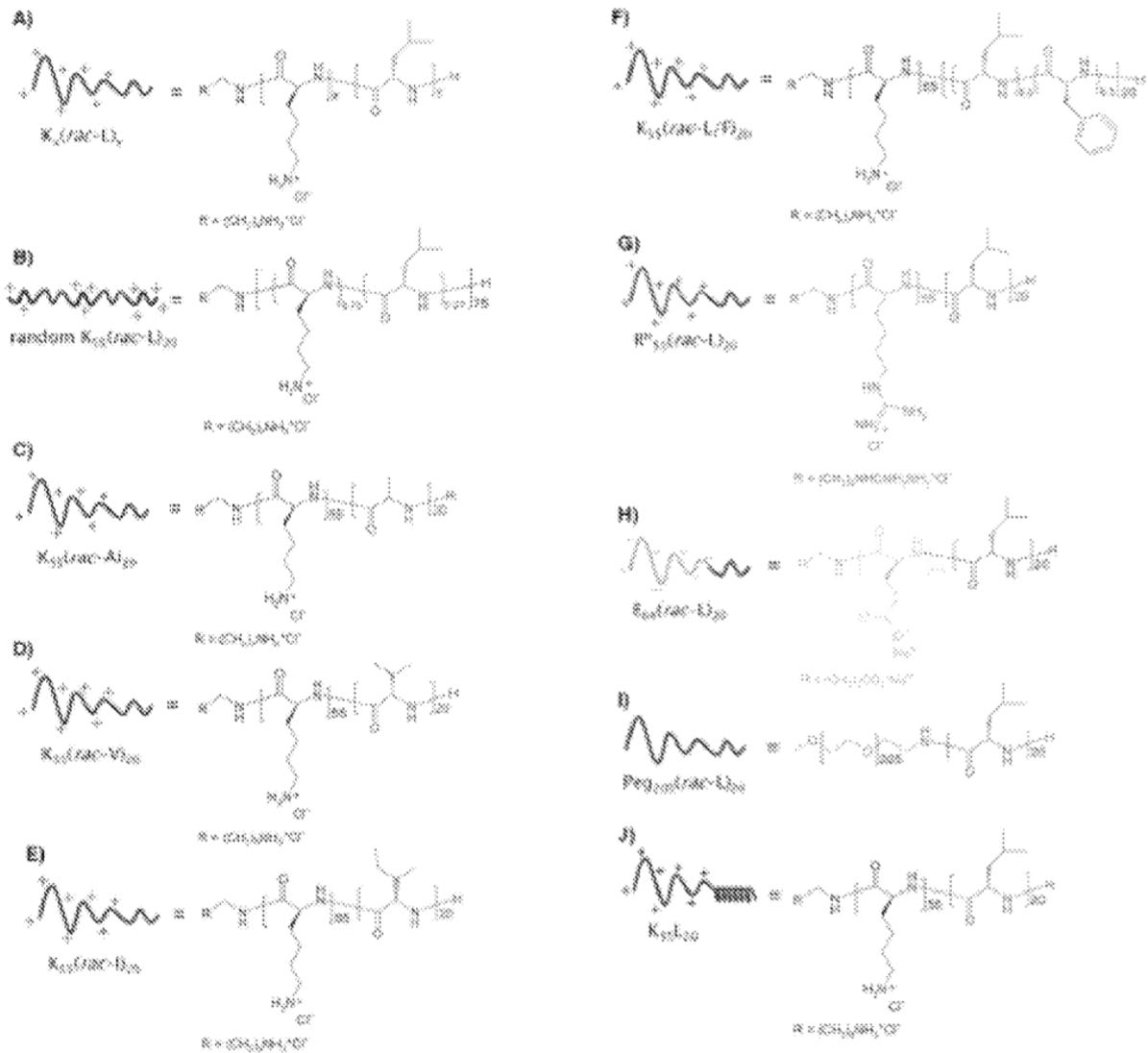
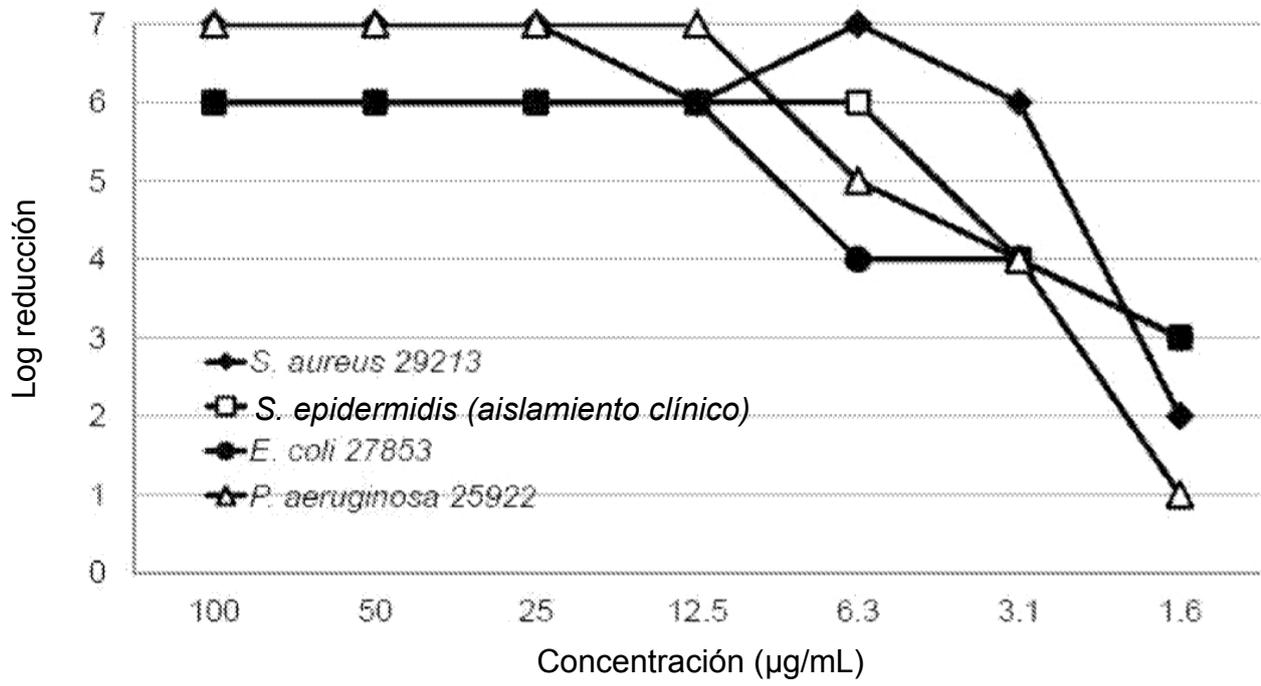


Fig. 3



**Fig. 4**

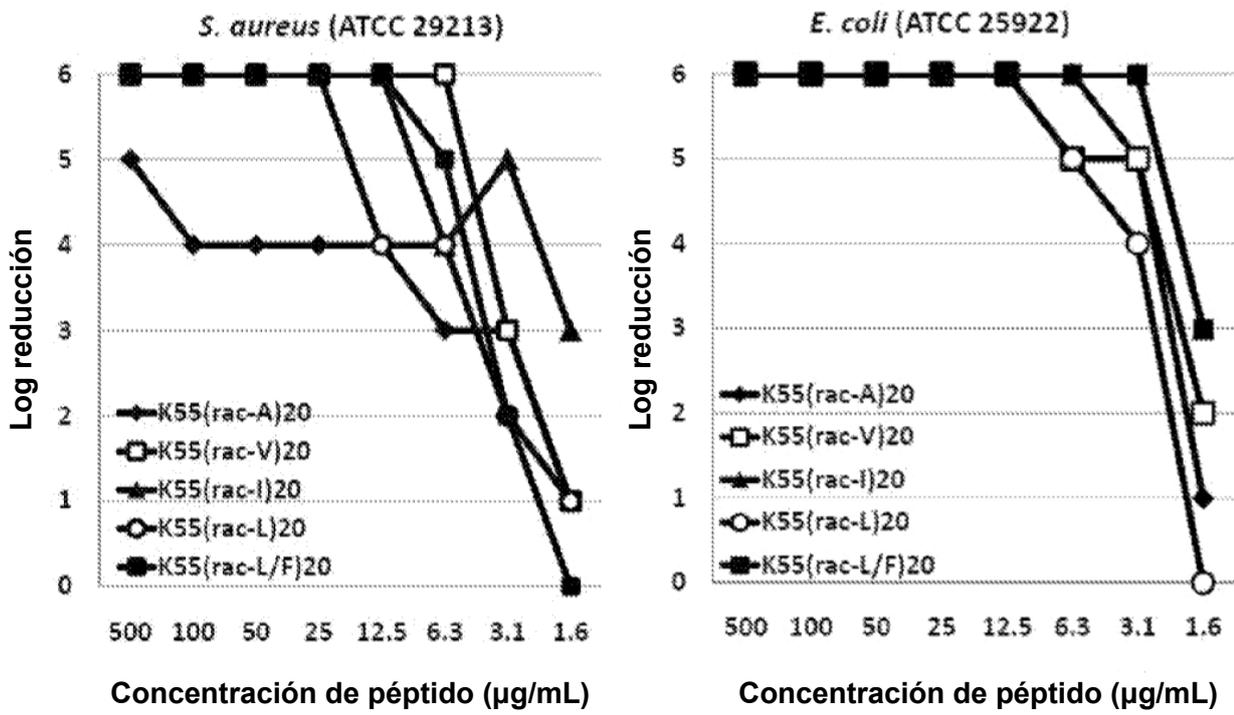
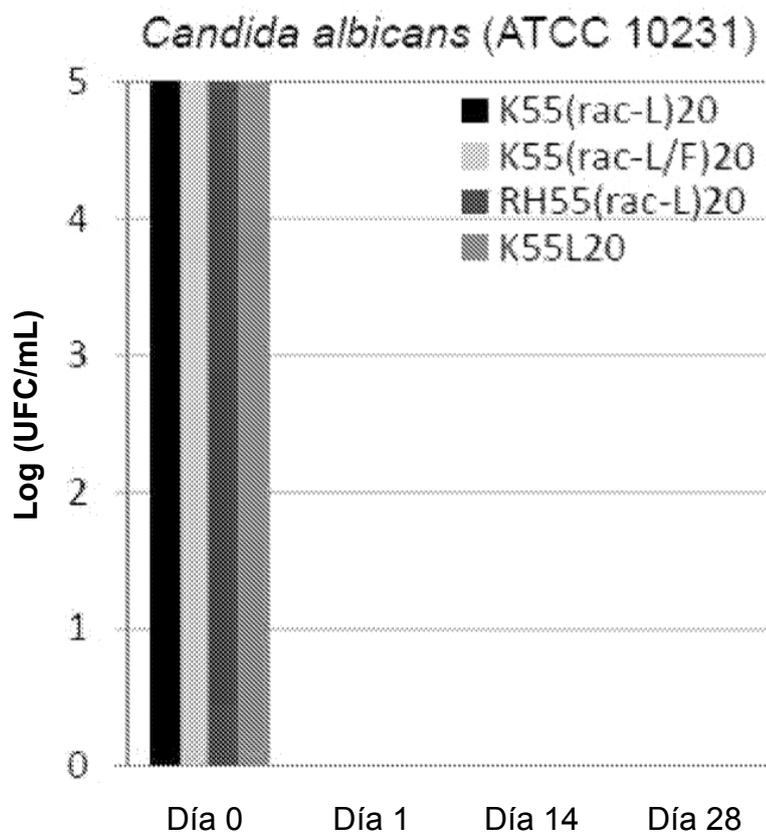
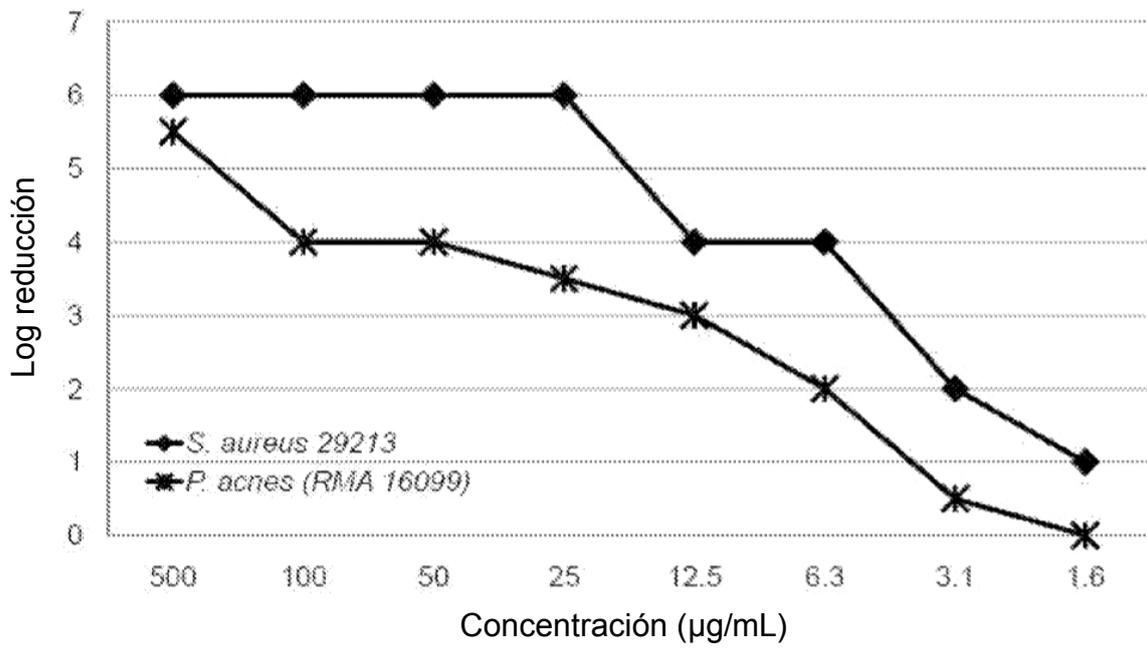


Fig. 5



**Fig. 6**



**Fig. 7**

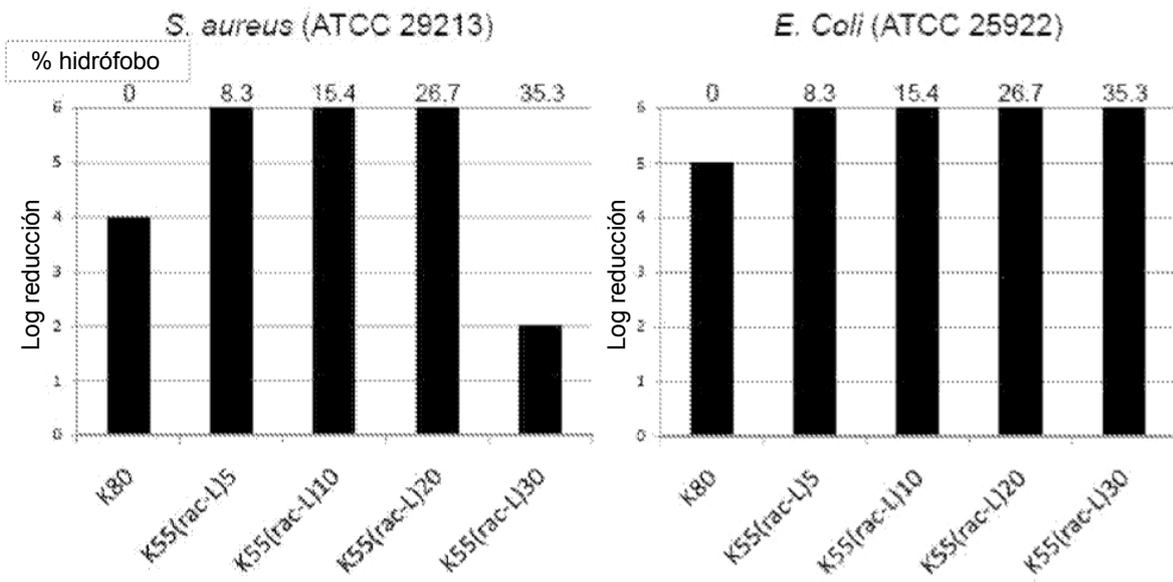
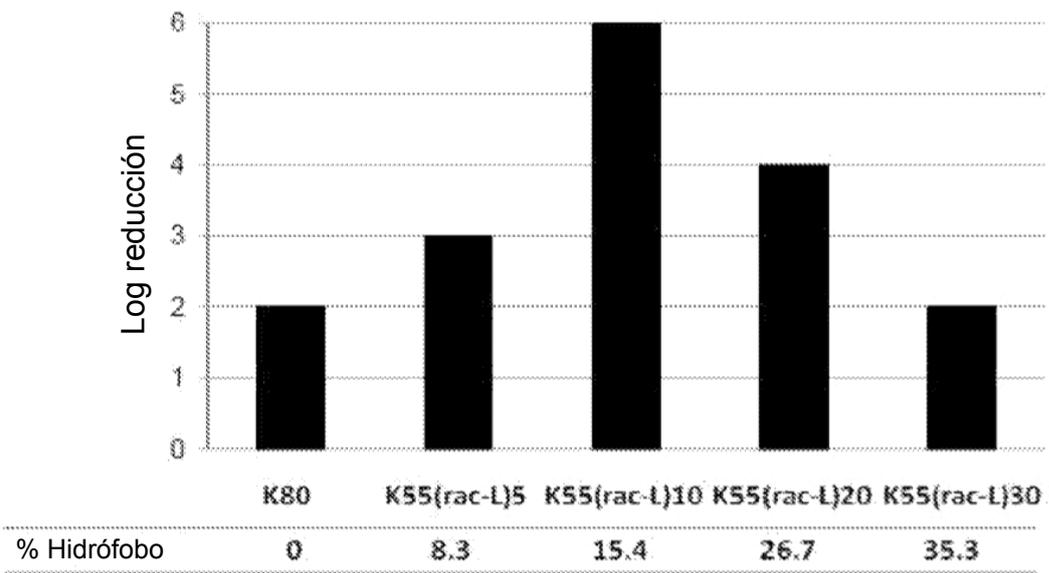
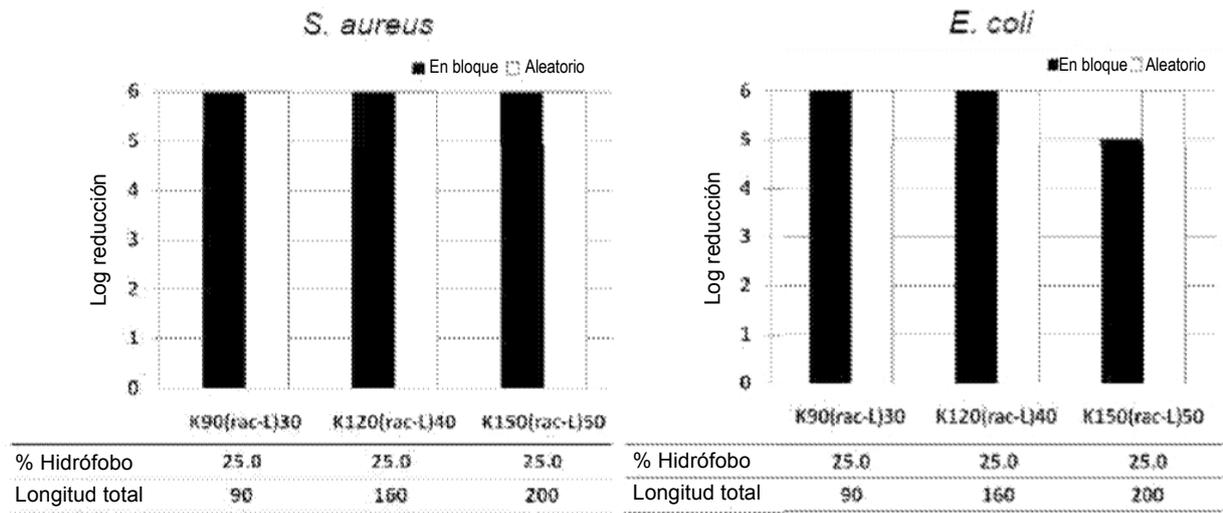


Fig. 8



**Fig. 9**



**Fig. 10**

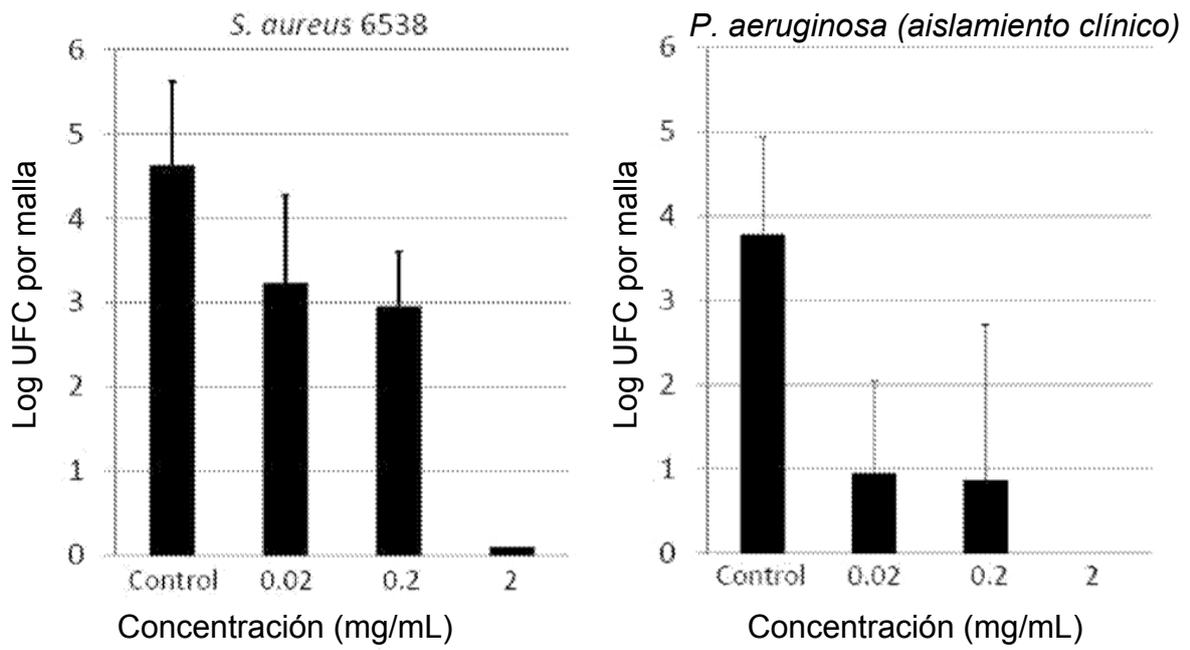
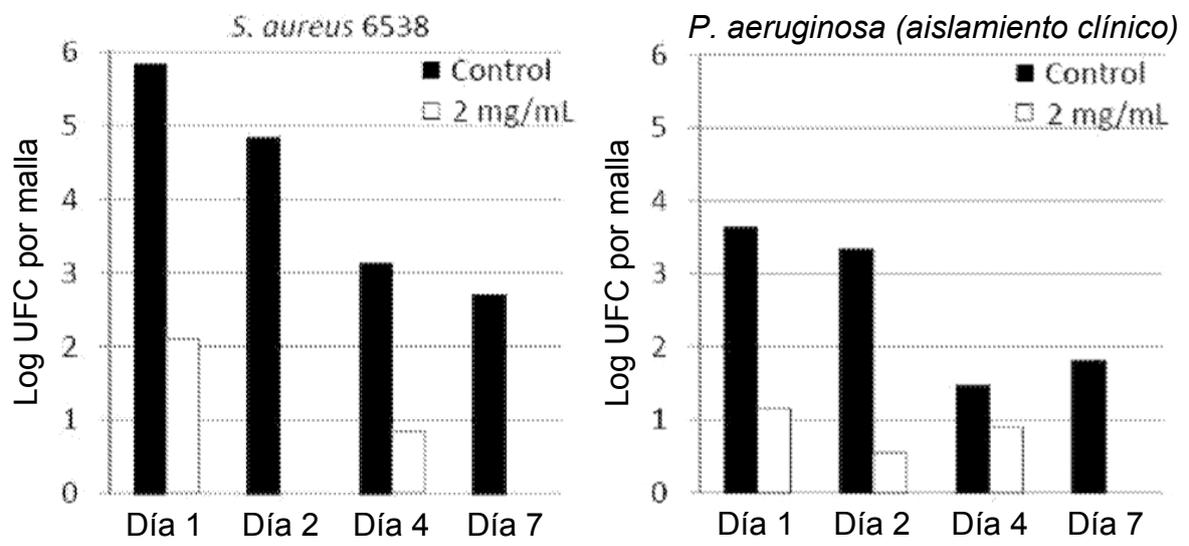


Fig. 11



**Fig. 12**

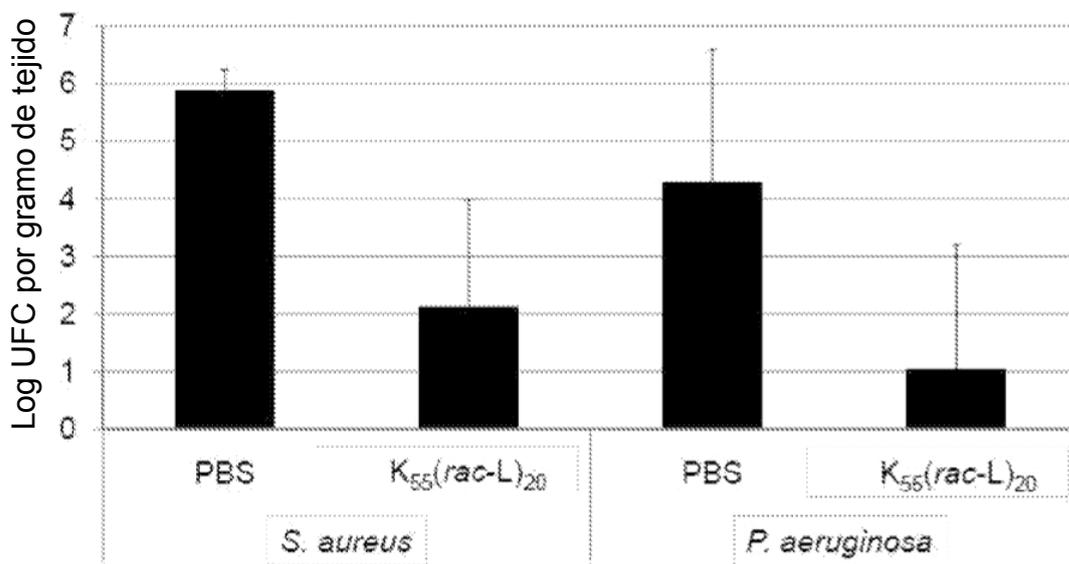
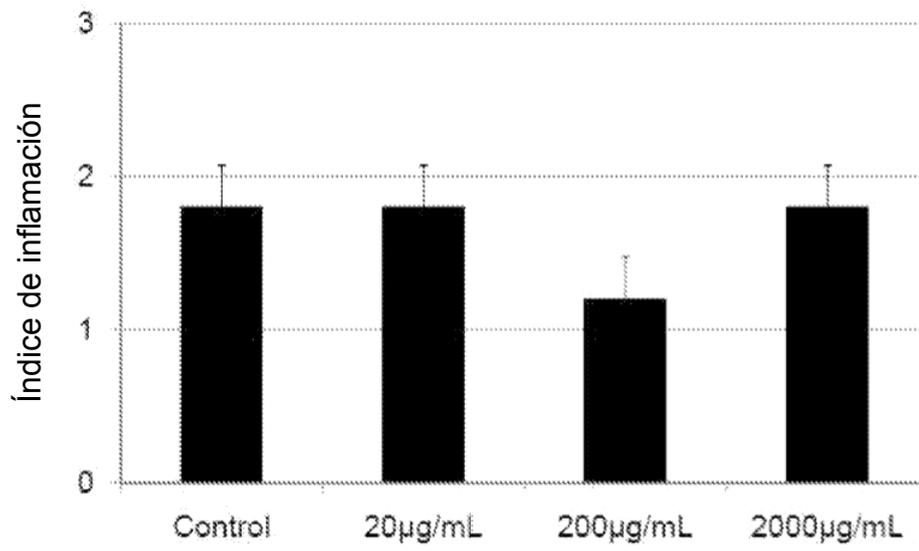
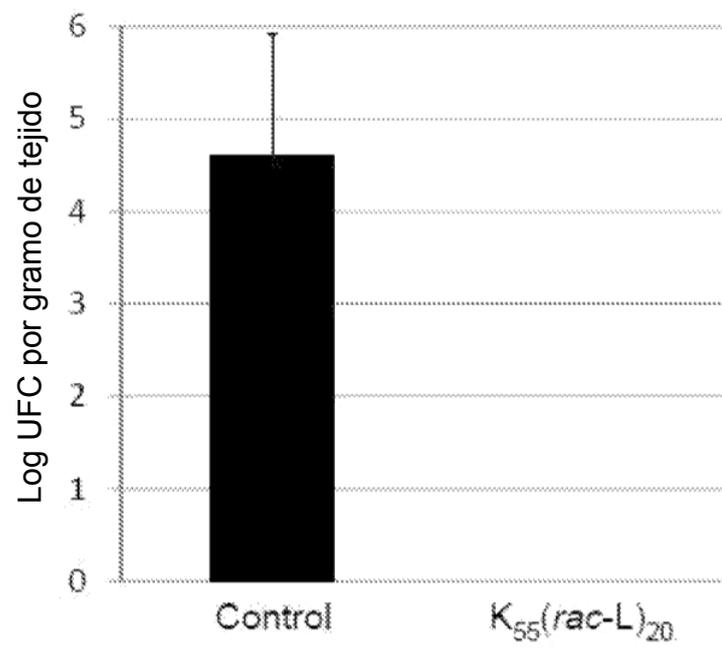


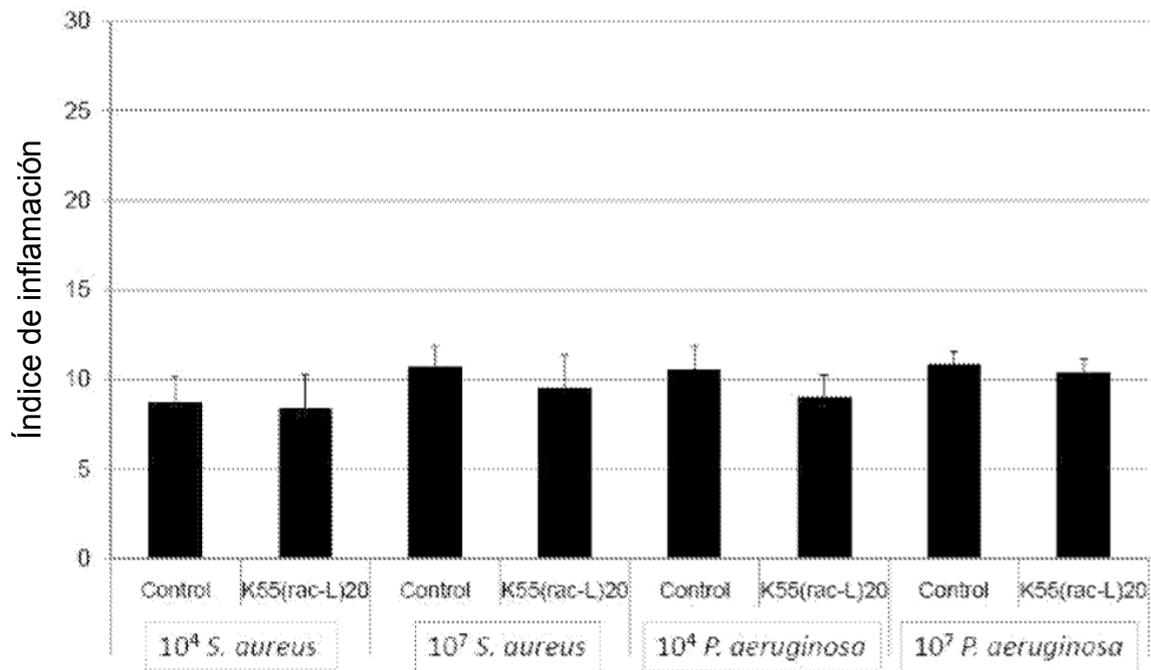
Fig. 13



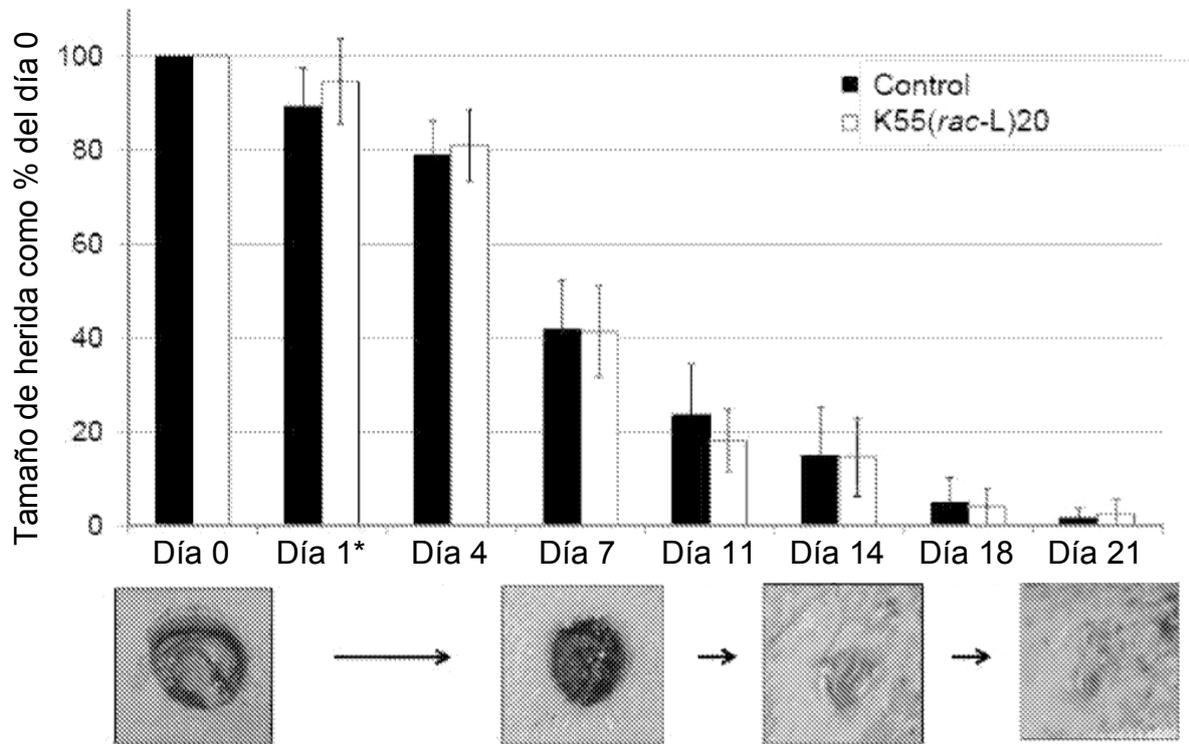
**Fig. 14**



**Fig. 15**



**Fig. 16**



**Fig. 17**

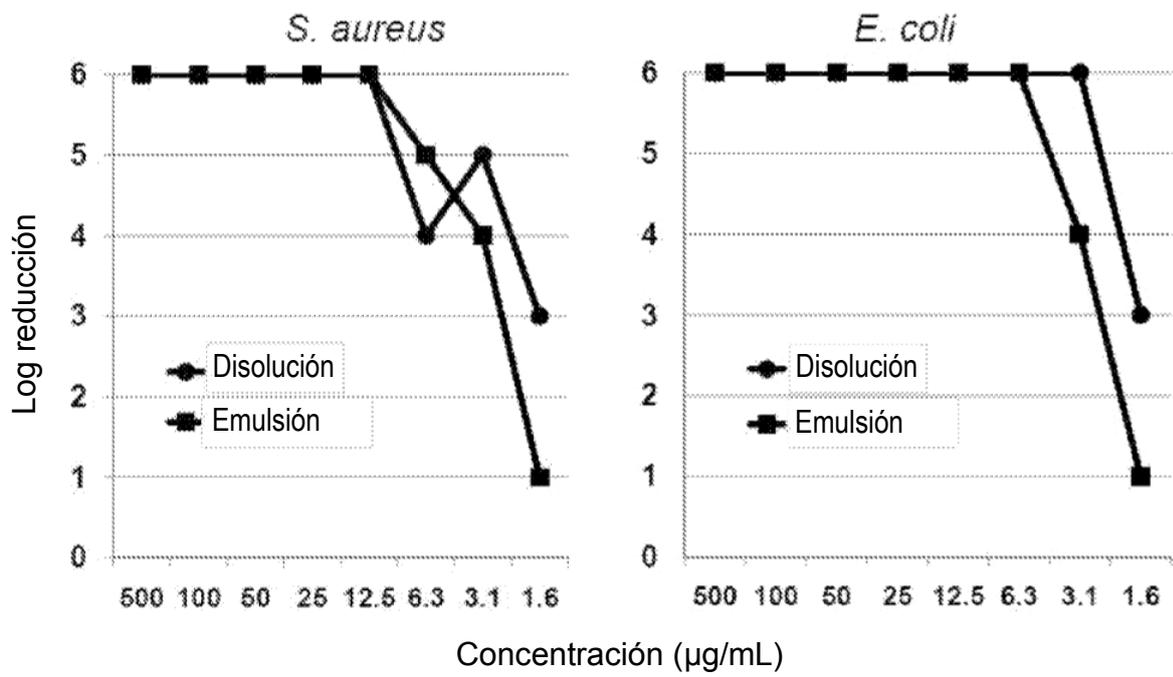
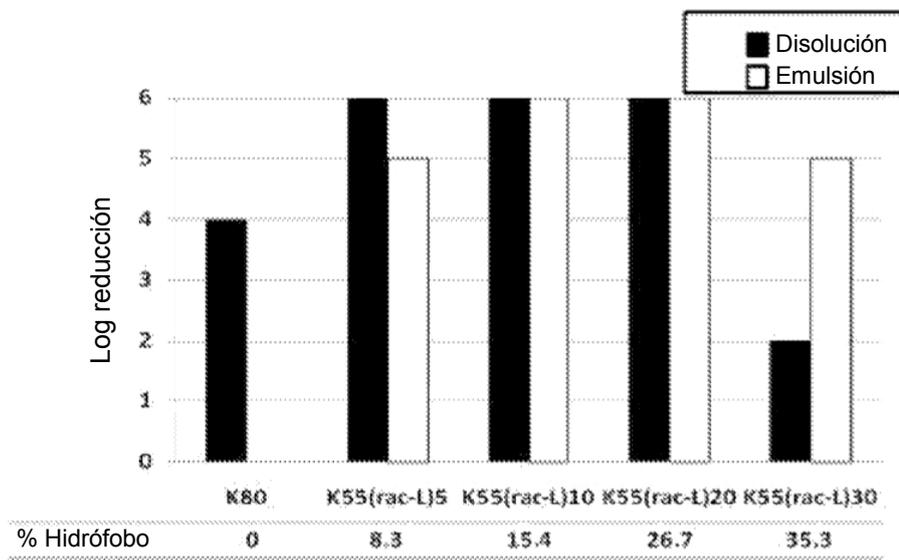
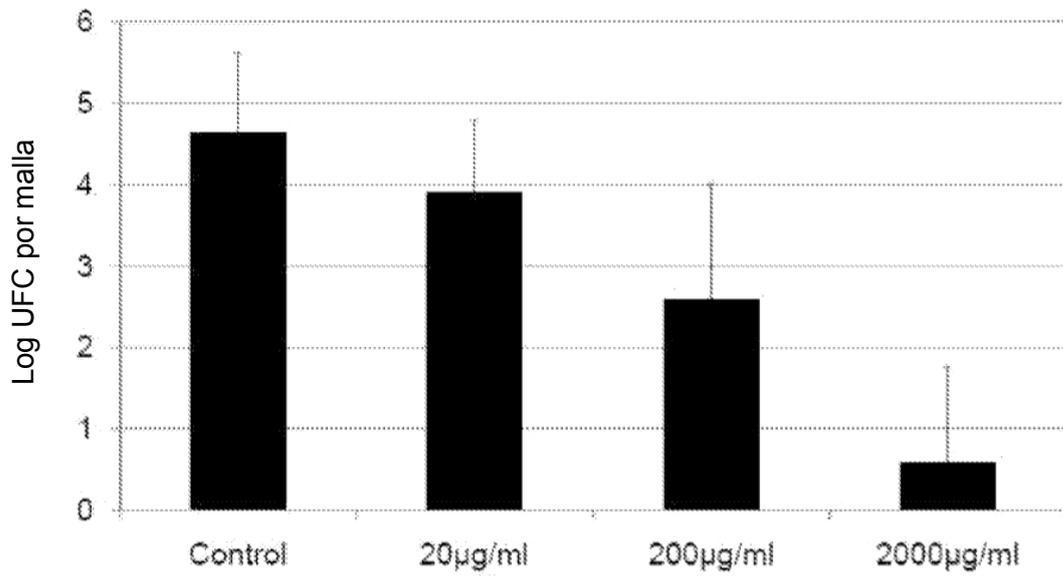


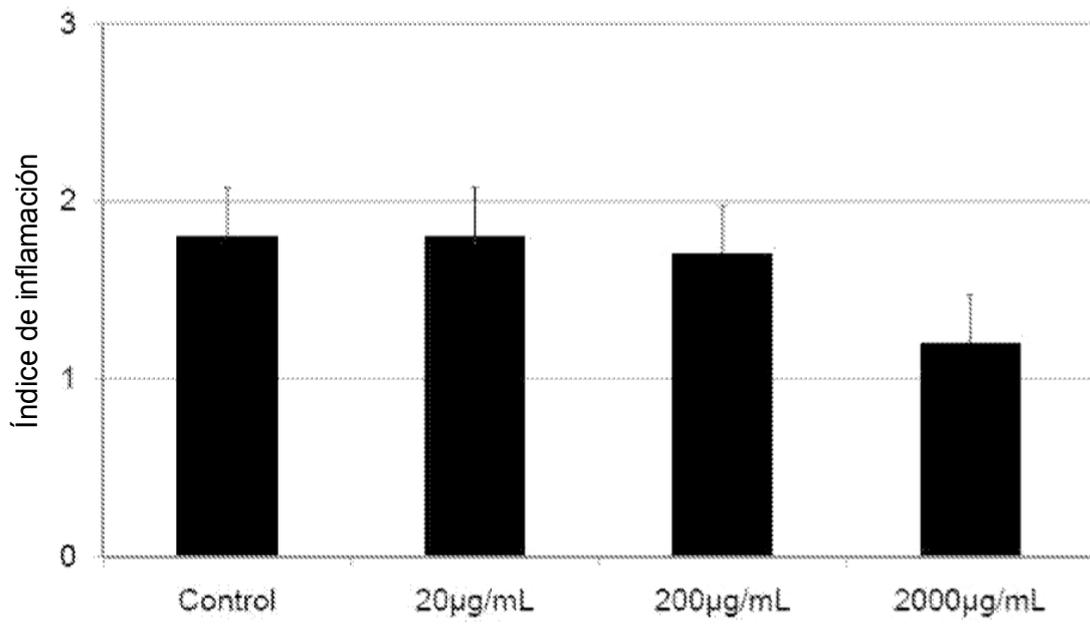
Fig. 18



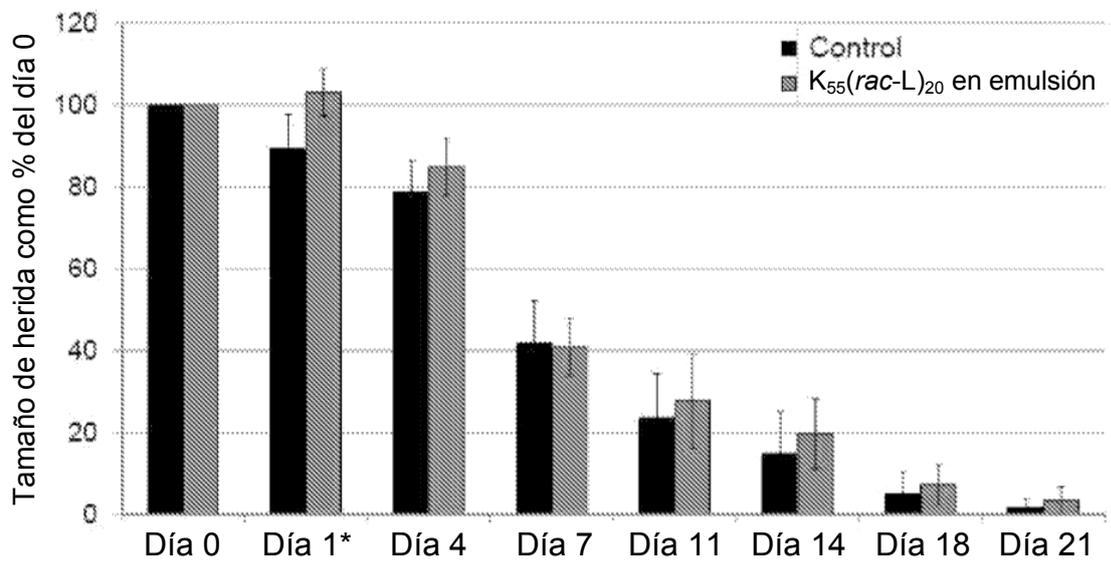
**Fig. 19**



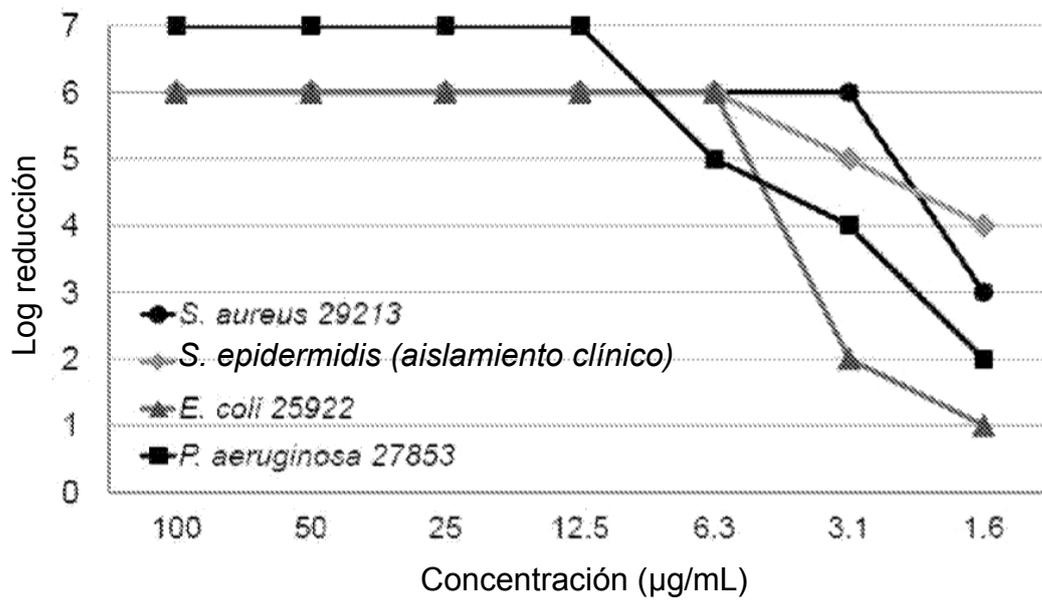
**Fig. 20**



**Fig. 21**



**Fig. 22**



**Fig. 23**

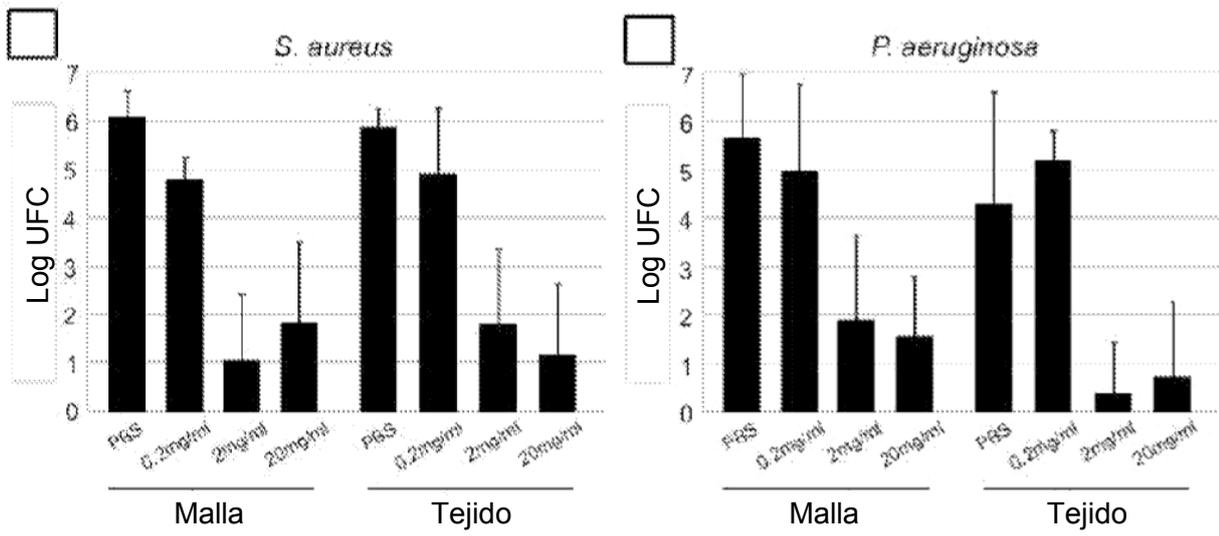
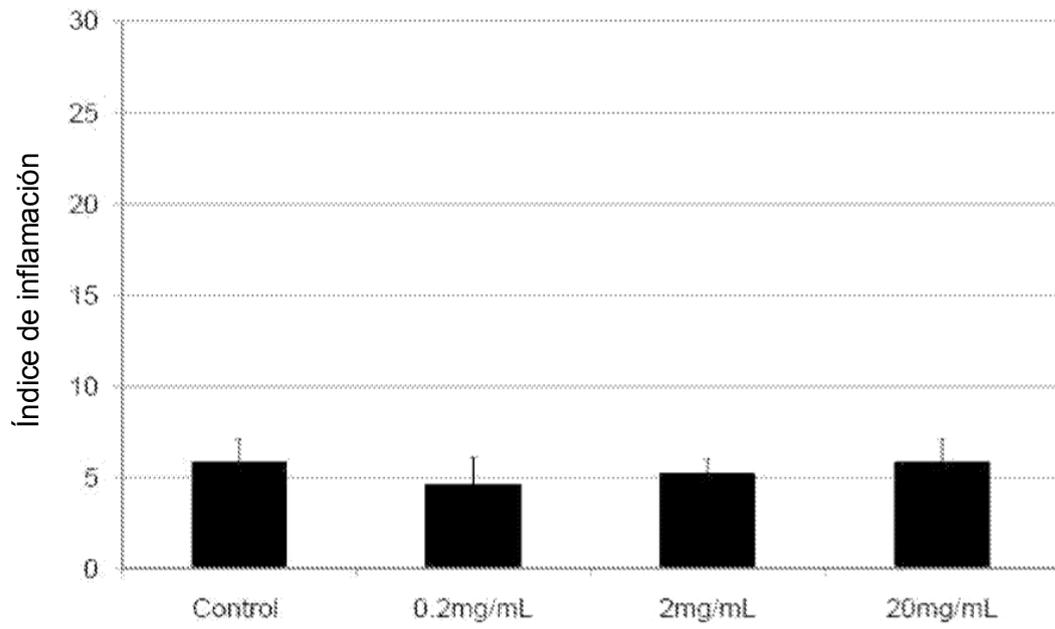
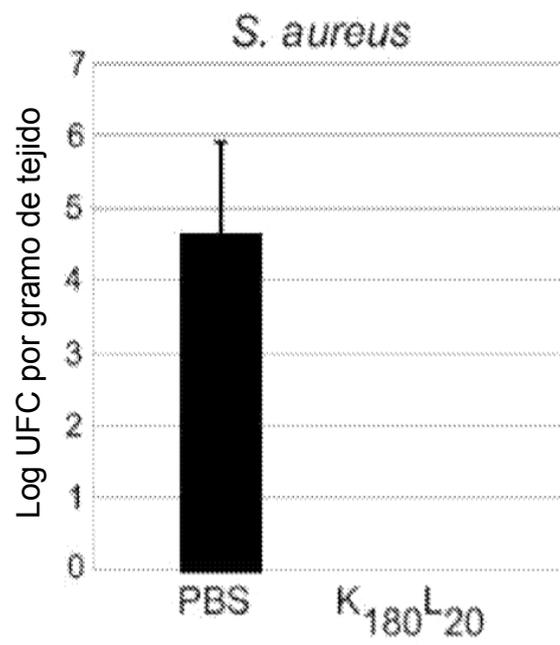


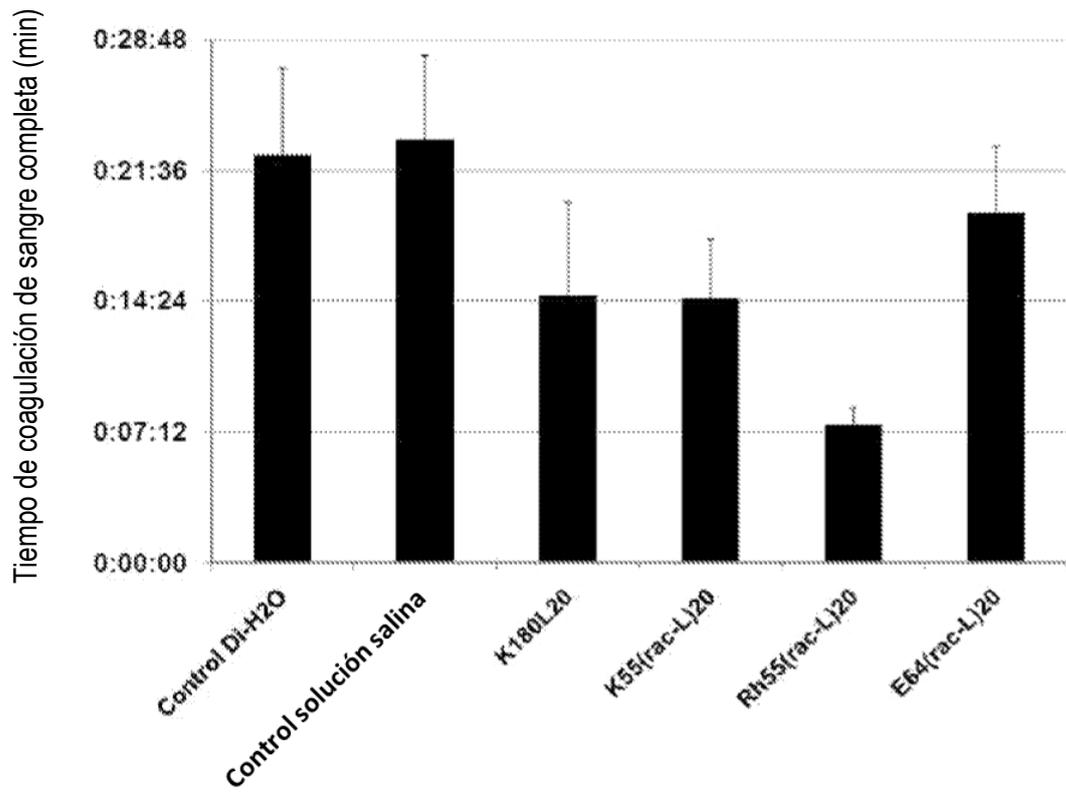
Fig. 24



**Fig. 25**



**Fig. 26**



**Fig. 27**

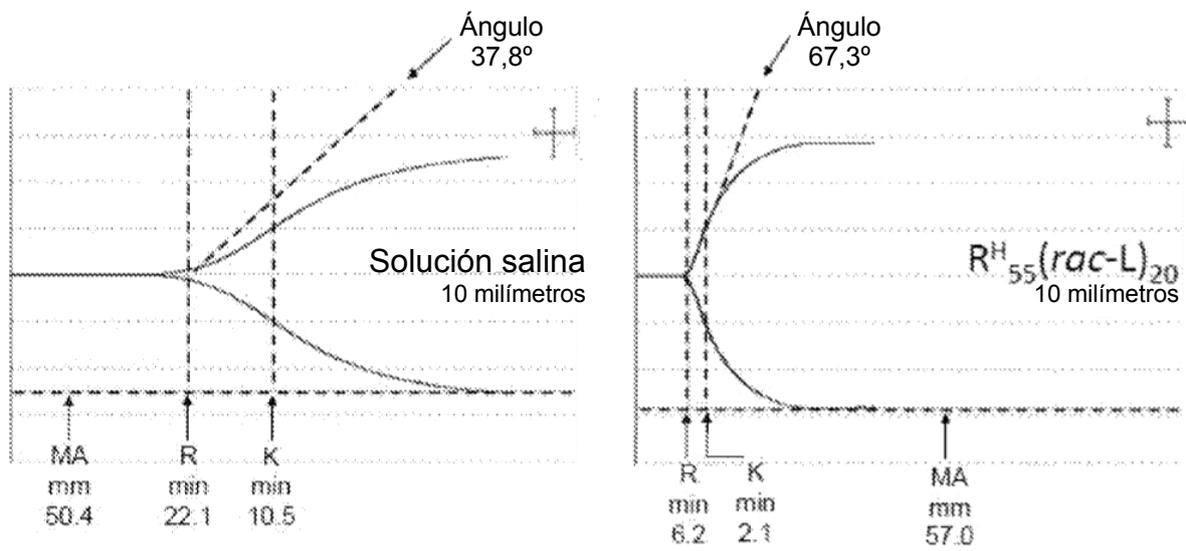


Fig. 28

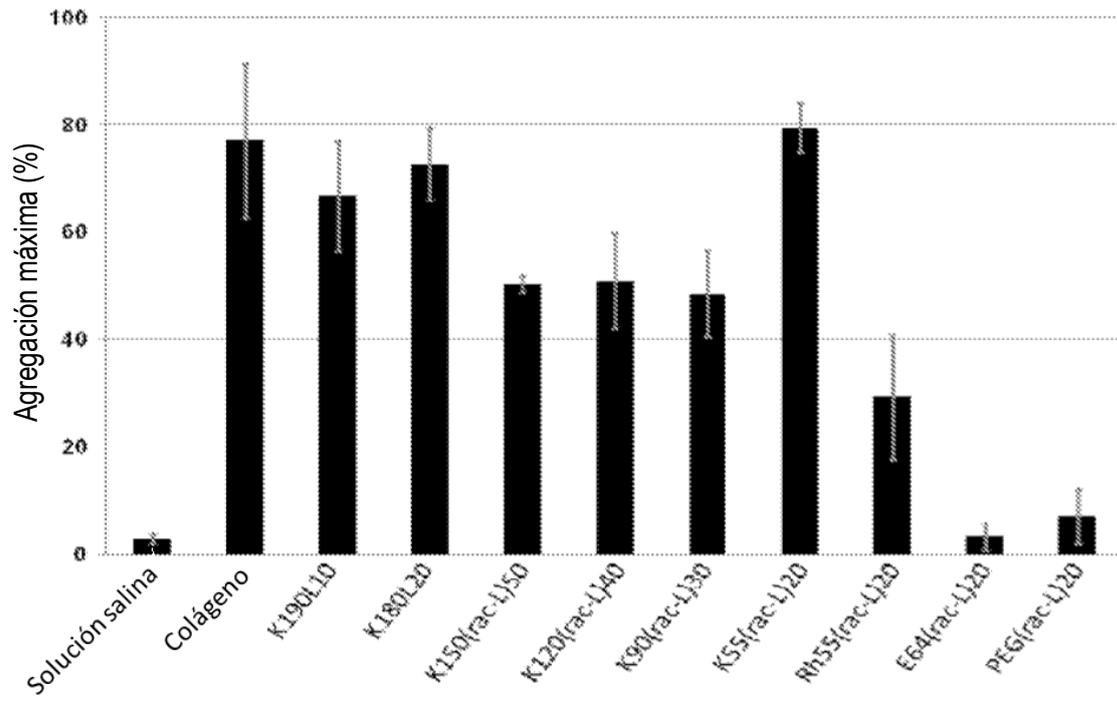
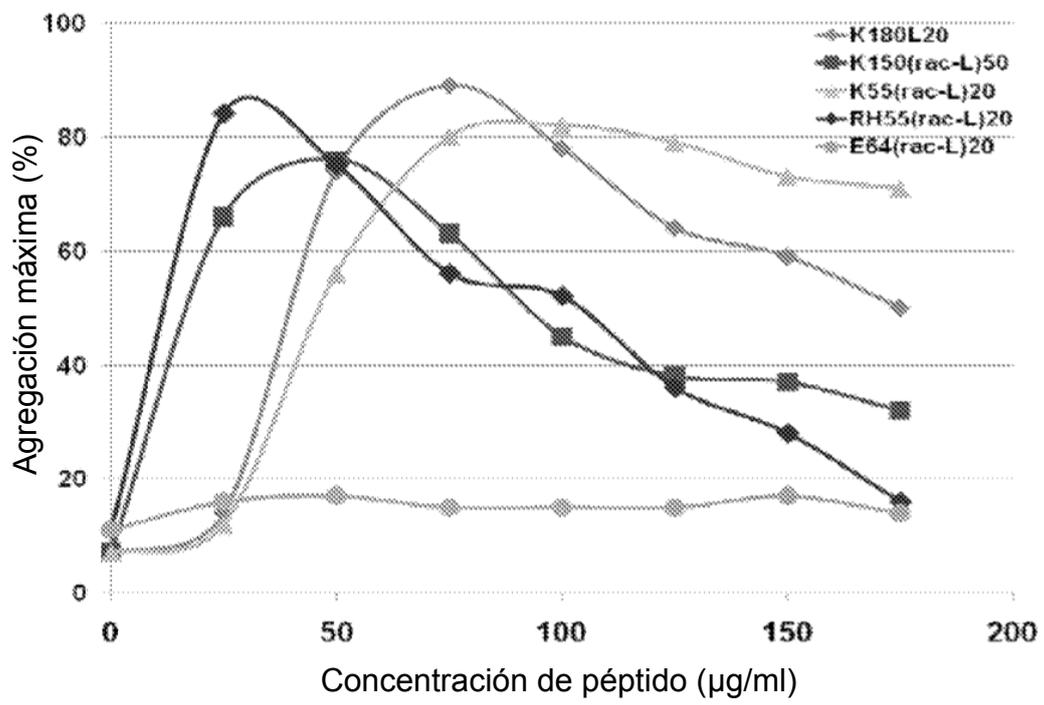
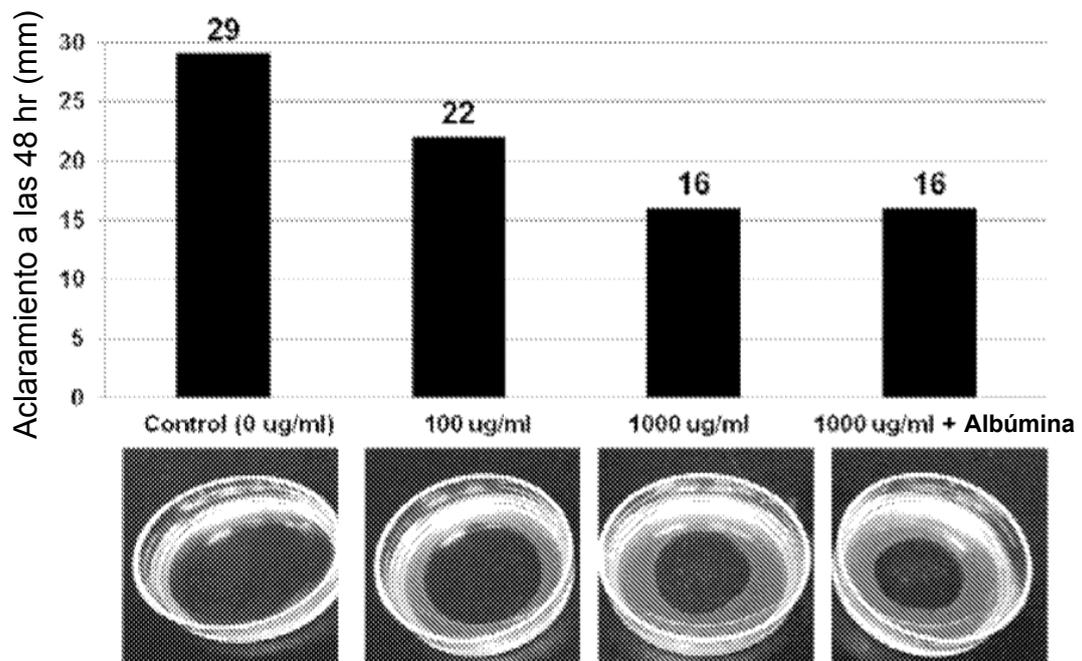


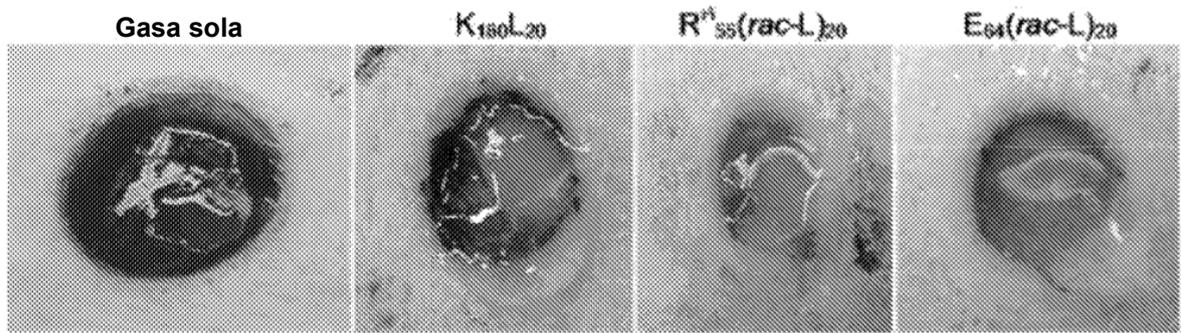
Fig. 29



**Fig. 30**



**Fig. 31**



**Fig. 32**

Polipéptido	PDI <sup>a</sup>	M <sub>n</sub> (× 10 <sup>3</sup> ) <sup>b</sup>
<b>Serie K<sub>55</sub>L<sub>x</sub></b>		
K <sub>55</sub> L <sub>5</sub>	1.09	9.8
K <sub>55</sub> L <sub>10</sub>	1.09	10.4
K <sub>55</sub> L <sub>15</sub>	1.09	10.9
K <sub>55</sub> L <sub>20</sub>	1.09	11.5
K <sub>55</sub> L <sub>25</sub>	1.08	12.1
K <sub>55</sub> L <sub>30</sub>	1.08	12.6
<b>Serie K<sub>55</sub>(rac-L)<sub>x</sub></b>		
K <sub>55</sub> (rac-L) <sub>5</sub>	1.12	9.6
K <sub>55</sub> (rac-L) <sub>10</sub>	1.12	10.2
K <sub>55</sub> (rac-L) <sub>20</sub>	1.12	11.3
K <sub>55</sub> (rac-L) <sub>30</sub>	1.12	12.4
<b>Serie K<sub>55</sub>(rac-L)<sub>x</sub> aleatorio y K<sub>55</sub>L<sub>x</sub></b>		
K <sub>55</sub> L <sub>20</sub> aleatorio	1.13	10.3
K <sub>55</sub> (rac-L) <sub>5</sub> aleatorio	1.14	10
K <sub>55</sub> (rac-L) <sub>10</sub> aleatorio	1.16	10.2
K <sub>55</sub> (rac-L) <sub>20</sub> aleatorio	1.16	12.2
<b>K<sub>55</sub>(rac-X)<sub>y</sub> aleatorio</b>		
K <sub>55</sub> (rac-I) <sub>20</sub>	1.12	11.3
K <sub>55</sub> (rac-L/F) <sub>20</sub>	1.12	11.7
K <sub>55</sub> (rac-V) <sub>20</sub>	1.12	11
K <sub>55</sub> (rac-A) <sub>20</sub>	1.12	10.5
<b>Serie K<sub>x</sub>(rac-L)<sub>y</sub> largo y K<sub>x</sub>(rac-L)<sub>y</sub> aleatorio</b>		
K <sub>90</sub> (rac-L) <sub>30</sub>	1.27	18.1
K <sub>90</sub> (rac-L) <sub>30</sub> aleatorio	1.17	18.3
K <sub>120</sub> (rac-L) <sub>40</sub>	1.16	24.3
K <sub>120</sub> (rac-L) <sub>40</sub> aleatorio	1.07	23.5
K <sub>150</sub> (rac-L) <sub>50</sub>	1.23	30.3
K <sub>150</sub> (rac-L) <sub>50</sub> aleatorio	1.23	31.3
<b>Polipéptido</b>		
<b>K<sub>x</sub></b>		
K <sub>90</sub>	1.2	13.2
K <sub>205</sub>	1.2	42.4
<b>Serie K<sub>x</sub>L<sub>y</sub> largo</b>		
K <sub>100</sub> L <sub>20</sub>	1.30	40.2
K <sub>150</sub> L <sub>10</sub>	1.23	41.2
<b>R<sup>55</sup></b>		
R <sup>55</sup>	-	13.6
<b>PEG</b>		
PEG <sub>3000</sub> (rac-L) <sub>20</sub>	1.06	11.3
<b>Serie E</b>		
E <sub>50</sub> (rac-L) <sub>20</sub>	1.17	11.9
E <sub>100</sub> L <sub>20</sub>	1.34	30.3

Fig. 33

<b>Péptido</b>	<b><i>E. coli</i> 11229</b>	<b><i>E. coli</i> O157:H7</b>
K <sub>55</sub> L <sub>20</sub> en bloque	1	0.25
K <sub>55</sub> (rac-L) <sub>20</sub> en bloque	1	1
K <sub>55</sub> (rac-L) <sub>10</sub> en bloque	5	1
K <sub>55</sub> (rac-L/F) <sub>20</sub> en bloque	5	1
K <sup>H</sup> <sub>55</sub> (rac-L) <sub>20</sub> en bloque	30	1

**Fig. 34**

Microbio	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	K <sub>60</sub> L <sub>20</sub> aleatorio	K <sub>55</sub> (rac-L) <sub>20</sub>	K <sub>55</sub> (rac-L) <sub>10</sub>	K <sub>55</sub> (rac-L/F) <sub>20</sub>
<i>S. aureus</i>	7.8	7.8	7.8	7.8
<i>L. monocytogenes</i>	3.9	7.8	3.9	5.9
<i>S. enterica</i>	31.3	125	62.5	250
<i>B. cereus</i>	7.8	7.8	7.8	7.8
<i>B. subtilis</i>	7.8	11.7	5.9	7.8
Endosporas de <i>B. cereus</i>	15.6	15.6	15.6	15.6
Endosporas de <i>B. subtilis</i>	250	125	250	250

Fig. 35

	Log reducción
$K_{55}(rac-L)_{20}$ en bloque	0.3
Emulsión $K_{55}(rac-L)_{20}$ en bloque	0.3
$(R^H/K)_{55}(rac-L)_{20}$ en bloque	1.5, 3.0
$E_{64}(rac-L)_{20}$ en bloque	0

**Fig. 36**

Microbio	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	K <sub>60</sub> L <sub>20</sub> aleatorio	K <sub>55</sub> (rac-L) <sub>20</sub>	K <sub>55</sub> (rac-L) <sub>10</sub>	K <sub>55</sub> (rac-L/F) <sub>20</sub>
Endosporas de <i>B. subtilis</i>	7.8	31.3	15.6	15.6

**Fig. 37**

		<b>% Citotoxicidad</b>
$K_{55}(\text{rac-L})_{20}$ en bloque	Disolución	92.0
	Emulsión	0
$R^H_{55}(\text{rac-L})_{20}$ en bloque	Disolución	88.4
	Emulsión	18.5

**Fig. 38**

Parámetro de TEG	Solución salina	Péptido (10 µg/ml)			
		K <sub>186</sub> L <sub>20</sub>	K <sub>55</sub> (rac-L) <sub>20</sub>	R <sup>H</sup> <sub>55</sub> (rac-L) <sub>20</sub>	E <sub>64</sub> (rac-L) <sub>20</sub>
Tiempo R (min)	18.3 ± 3.2	11.6 ± 2.0*	10.8 ± 1.3*	5.7 ± 0.7*	18.7 ± 2.5
Tiempo K (min)	7.5 ± 1.7	5.2 ± 1.0	2.9 ± 0.6*	1.7 ± 0.3*	7.3 ± 0.8
Ángulo α (°)	41.5 ± 2.8	45.3 ± 2.7	59.7 ± 4.7*	70.9 ± 3.3*	40.3 ± 1.6
MA (mm)	53.5 ± 3.3	46.6 ± 3.2	51.5 ± 0.8	60.7 ± 3.5	54.8 ± 3.6

Fig. 39