

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 992**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/04** (2006.01)

**C07K 7/06** (2006.01)

**C08K 7/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2012 PCT/GB2012/052279**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO13038201**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012 E 12761793 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 2755672**

54 Título: **Péptidos de diseño corto que poseen acciones selectivas contra bacterias y células cancerosas**

30 Prioridad:

**14.09.2011 GB 201115910**

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

**03.08.2020**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF MANCHESTER (100.0%)  
Oxford Road  
Manchester M13 9PL, GB**

72 Inventor/es:

**LU, JIAN R.;  
ZHAO, XIUBO;  
PAN, FANG y  
YASEEN, MOHAMMED**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 776 992 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**

Péptidos de diseño corto que poseen acciones selectivas contra bacterias y células cancerosas

5 Campo de la invención

10 La invención se refiere a péptidos anfífilicos que tienen actividad antibacteriana y/o antitumoral, y a composiciones terapéuticas y no terapéuticas que comprenden estos péptidos. La invención se refiere además al uso de los péptidos como agentes antibacterianos, o agentes antitumorales, que incluye el uso médico del péptido en el tratamiento de infecciones y/o cáncer, así como su uso como conservantes y agentes antibacterianos en otros productos, que incluye productos para el cuidado personal tales como tratamientos tópicos para la piel, limpiadores, enjuagues bucales, pastas dentales, champú, lociones y cremas corporales, etc.

15 Antecedentes de la invención

Existente la necesidad de agentes antibacterianos nuevos y eficaces, agentes antibacterianos que puedan usarse para aplicaciones terapéuticas.

20 La resistencia a los antibióticos es un fenómeno cada vez más difícil de abordar. La reciente aparición y propagación de bacterias productoras de NDM-1 (Nueva Delhi metalo-β-lactamasa-1), resistentes a muchos grupos de antibióticos, que incluye los poderosos β-lactámicos (por ejemplo, carbapenems), ha provocado la propagación de infecciones en muchos países. El pánico global ha fomentado nuevamente la necesidad urgente de descubrir agentes bactericidas nuevos con fines terapéuticos.

25 Los péptidos antimicrobianos (AMP) son los efectores que se conservaron evolutivamente en la inmunidad innata. Su actividad bactericida de amplio espectro, su rápida tasa de destrucción y el modo de acción distintivo (es decir, dirigirse a la membrana celular bacteriana en lugar de a receptores específicos como proteínas y ADN), los han convertido en candidatos prometedores para el desarrollo de agentes alternativos para hacer frente a los desafíos generalizados de la resistencia bacteriana. Sin embargo, aunque se aislaron y caracterizaron más de 1000 AMP de diferentes fuentes, hasta ahora solo se ha logrado un éxito limitado en ensayos clínicos. Las principales barreras para convertir los péptidos en medicamentos residen en el alto costo de producción a gran escala, la toxicidad para las células huésped, y la susceptibilidad a la degradación proteolítica. Además, recientemente han surgido preocupaciones por el uso clínico de los AMP con secuencias que están demasiado cerca de las de los AMP humanos naturales, en relación con el compromiso inevitable de la defensa natural humana, lo que impone posibles amenazas a la salud pública.

35 Vaclav Cerovsky y otros, Chembiochem, agosto de 2009, vol. 10, núm. 12, 2089-2099 se refiere a pentadecapéptidos llamados lassio glossinas, que se aíslan del veneno de la abeja eusocial *Lasio glossum laticeps*.

40 La patente con núm.WO98/37090 se refiere a agentes citolíticos no hemolíticos que se seleccionan de péptidos, complejos de péptidos agrupados, mezclas de péptidos o copolímeros de péptidos aleatorios.

La patente con núm.WO03/080652 se relaciona con un péptido antimicrobiano y composiciones que comprenden el péptido.

45 La patente con núm.EP2168976 se ocupa de los péptidos antimicrobianos definidos de acuerdo con una fórmula particular, y su uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

En consecuencia, sigue existiendo la necesidad de agentes antimicrobianos nuevos y eficaces, que sean clínicamente útiles.

50 Además, también existe la necesidad de agentes antibacterianos eficaces y económicos que puedan usarse como conservantes o agentes antibacterianos en composiciones para el cuidado personal (como cremas antibacterianas, ungüentos, lociones, champús, enjuagues de manos, enjuagues bucales, pastas dentales, etc.). Se usan muchos conservantes y agentes antibacterianos que son productos químicos sintéticos que sufren de baja biocompatibilidad.

55 Es un objetivo de la presente invención proporcionar una gama de péptidos anfífilicos antibacterianos que se usan como productos de cuidado personal y como agentes terapéuticos potenciales.

60 Resumen de la invención

Los AMP son muy diversos en términos de longitud, secuencia y estructura, lo que dificulta el diseño de secuencias cortas y eficientes. Sin embargo, los inventores han ideado con éxito una serie de péptidos anfífilicos cortos que pueden matar bacterias Gram-positivas y Gram-negativas tan eficazmente como varios péptidos y antibióticos antimicrobianos bien conocidos. Por ejemplo, los inventores han demostrado que los péptidos con la fórmula G(IKK)<sub>n</sub>I-NH<sub>2</sub>(n=3-4) descritos en la presente muestra actividad bactericida contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas con concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) alrededor de 0,5-8 μM.

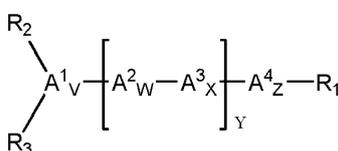
Además de la actividad antimicrobiana, se ha demostrado que algunos de los péptidos poseen actividades antitumorales potentes contra las líneas celulares cancerosas. Por ejemplo, los péptidos G(IKK)<sub>n</sub>I-NH<sub>2</sub> (n=3-4) han demostrado ser eficaces contra dos líneas celulares de cáncer seleccionadas con concentraciones de inhibición del crecimiento del 50% (IC<sub>50</sub>) alrededor de 4-25 μM.

Aún más, la citotoxicidad de los péptidos presentes, que se determina a partir de la lisis de las células de eritrocitos humanos, sigue siendo notablemente baja a valores de MIC de hasta 10 veces o mucho mayores.

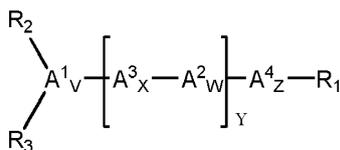
El péptido G(IKK)<sub>3</sub>I-NH<sub>2</sub> descrito en la presente también ha demostrado tener una selectividad rápida y alta para microbios o células tumorales (línea celular de cáncer HL60) con citotoxicidad mínima para modelar células huésped (línea celular 3T3 y células fibroblastos dérmicos humanos primarios) cuando se cocultivan in vitro.

Así, la invención proporciona péptidos nuevos que demuestran actividad selectiva contra bacterias y/o células cancerosas, sin poner en peligro las células huésped normales. Además, los péptidos también tienen un tamaño relativamente pequeño y una composición simple que favorece los bajos costos de fabricación y el fácil control de calidad. Los péptidos ofrecen así nuevas oportunidades en el desarrollo de agentes antimicrobianos rentables y altamente selectivos para su uso en los productos de cuidado personal, como conservantes y en tratamientos antibacterianos y antitumorales.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un péptido con la fórmula I o II que se muestra a continuación



(I)



(II)

en donde:

A<sup>1</sup><sub>V</sub> se selecciona de G, GKI o GIK en donde G es glicina, K es lisina e I es isoleucina;

A<sup>2</sup><sub>W</sub> es II o VV, en donde I es isoleucina y V es valina;

A<sup>3</sup><sub>X</sub> es KK u OO en donde K es lisina y O es ornitina;

y es 2, 3, o 4;

A<sup>4</sup> está ausente o es un aminoácido que se selecciona de isoleucina (I), leucina (L), valina (V) y lisina (K);

z es 0, 1, 2 o 3;

R<sub>1</sub> es un sustituyente terminal que se selecciona de OH, NH<sub>2</sub>, (1-18C)alquilo, N[(1-18C)alquilo]<sub>2</sub> o NH(1-18C)alquilo; y

R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> ambos se seleccionan independientemente de H, (1-18C)alquilo o (2-18C)acilo; o una sal de estos;

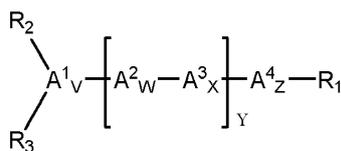
en donde el péptido comprende de 12 a 20 aminoácidos.

Otras características del péptido se exponen en las reivindicaciones.

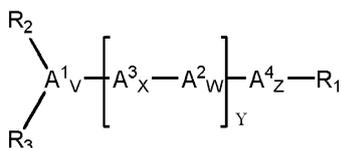
La invención también proporciona el uso de un péptido de la invención como agente antibacteriano no terapéutico, como conservante o como tensioactivo.

La invención proporciona además una composición antibacteriana o una composición para el cuidado personal que comprende un péptido de la invención.

La invención también proporciona un péptido con la fórmula I o II que se muestra a continuación



(I)



(II)

en donde:

$A^1_V$  se selecciona de G, GKI o GIK en donde G es glicina, K es lisina e I es isoleucina;

$A^2_W$  es II, LL o VV, en donde I es isoleucina, L es leucina y V es valina;

$A^3_X$  es KK u OO en donde K es lisina y O es ornitina;

y es 2, 3, o 4;

$A^4$  está ausente o es un aminoácido que se selecciona de isoleucina (I), leucina (L), valina (V) y lisina (K);

z es 0, 1, 2 o 3;

$R_1$  es un sustituyente terminal que se selecciona de OH,  $NH_2$ , (1-18C)alquilo,  $N[(1-18C) \text{alquilo}]_2$  o  $NH(1-18C)$ alquilo; y

$R_2$  y  $R_3$  ambos se seleccionan independientemente de H, (1-18C)alquilo o (2-18C)acilo; o una sal de estos;

en donde el péptido comprende de 12 a 20 aminoácidos;

para su uso en el tratamiento del cáncer.

La invención también proporciona un péptido como se establece en las reivindicaciones o una sal farmacéuticamente aceptable de este para su uso en el tratamiento de la infección.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un péptido como se establece en las reivindicaciones o una sal farmacéuticamente aceptable de este en mezcla con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

También en la presente se describe un método para sintetizar un péptido anfifílico con la fórmula I o II, o una sal de este, como se define en la presente.

También en la presente se describe un péptido anfifílico con la fórmula I o II, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, como se define en la presente, para uso como medicamento.

También en la presente se describe un método para tratar una infección bacteriana en un individuo que necesita dicho tratamiento, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido anfifílico con la fórmula I o II, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, como se define en la presente.

También en la presente se describe un método para tratar el cáncer en un individuo que necesita dicho tratamiento, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido anfifílico con la fórmula I o II, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, como se define en la presente.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 - Proyección de la rueda Schiffer-Edmundson de los péptidos helicoidales 2, 3, 4, 8 y 9 como se muestra en la Tabla 1. Los aminoácidos se representan por un código y número de una letra (que indica la secuencia como apareció en el péptido).

- Figura 2 - Gráficos que muestran los cambios de presión superficial a lo largo del tiempo para las monocapas lipídicas DPPC (A) y las monocapas lipídicas DPPG (B) en presencia de los péptidos 1-4 (series G(IKK)<sub>n</sub>I-NH<sub>2</sub> (n=1-4)).
- Figura 3 - Espectros de CD de los péptidos 1-4 (series G(IKK)<sub>n</sub>I-NH<sub>2</sub> (n=1-4)) en fase acuosa (A) que contiene pequeñas vesículas unilamelares (SUV) de 0,5 mg/ml de DPPC en tampón Tris 10 mM (B), y 0,5 mg/ml de DPPG SUV en tampón Tris 10 mM (C). Las concentraciones de los péptidos se mantuvieron a 0,1 mM.
- Figura 4 - Curvas de tasa de supervivencia para las bacterias *E. coli* DH5α (A) y *B. subtilis* 168 (B) en presencia de concentraciones variables de los péptidos 1-4. Los controles fueron bacterias sin péptido.
- Figura 5 - Curvas de tasa de supervivencia para células HeLa (A) y HL60 (B) en presencia de concentraciones variables de los péptidos 1-4. Las curvas se obtuvieron mediante el uso de ensayos de MTT como se describe en la presente.
- Figura 6 - Las actividades hemolíticas de los péptidos 1-4 (series G(IKK)<sub>n</sub>I-NH<sub>2</sub> (n=1-4)) (A) y de los péptidos 3, 5 y 8 (G(IKK)<sub>3</sub>I-NH<sub>2</sub>, G(LLKK)<sub>3</sub>L-NH<sub>2</sub> y GKI (KKII)<sub>2</sub>KII-NH<sub>2</sub>) (B), en glóbulos rojos humanos. Los glóbulos rojos humanos (hRBC) se incubaron en PBS con concentraciones diferentes de los péptidos durante 1 h a 37 °C, seguido de la monitorización de la liberación de hemoglobina a 540 nm.
- Figura 7 - (Tabla 3) Bioactividades y citotoxicidades de los péptidos 1-9, con dos péptidos antibacterianos naturales, el antibiótico ampicilina y el medicamento contra el cáncer Cisplatino que se citan para comparación. MIC: la concentración más baja de péptido/fármaco que inhibe el crecimiento bacteriano; IC<sub>50</sub>: concentración que provoca el 50 % de inhibición del crecimiento de células tumorales y EC<sub>50</sub>: concentración que induce el 50 % de lisis de eritrocitos. (<sup>a</sup> - Citado de Dathe y otros 2001, Cruciani y otros 1991, Wieprecht y otros 1997; <sup>si</sup> - Citado de Asthana y otros 2004; <sup>c</sup> - Citado de Greenwood y otros 1970; <sup>re</sup> - Citado de Takara y otros 2006)
- Figura 8 - Lisis de membrana de *E. coli* DH5α (Paneles A-D) y *B. subtilis* 168 (Paneles E-H) en presencia de MIC del péptido 3 (G(IKK)<sub>3</sub>I-NH<sub>2</sub>) (paneles B, D, F, H) o con control (Paneles A, C, E, G), como se observa mediante microscopía de fluorescencia. Los paneles A, B, E y F se obtienen mediante el uso del colorante DAPI. Los paneles C, D, G, H se obtienen mediante el uso del colorante FITC.
- Figura 9 - Lisis de membrana de *E. coli* DH5α (Paneles A-B) y *B. subtilis* 168 (Paneles C-D) en presencia de MIC del péptido 3 (G(IKK)<sub>3</sub>I-NH<sub>2</sub>) (Paneles B, D) o con el control (Paneles A, C), como se observa mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Figura 10 - (A) Fuga de calceína de las células HeLa en presencia de 0,1 mM de cada uno de los péptidos 1-4, que se incubaron durante 30 minutos, 1 hora y 2 horas. (B) Viabilidad celular de las células HeLa en condiciones similares a las de (A) y evaluadas mediante ensayos MTT.
- Figura 11 - Evidencia del daño de la membrana y la ruptura celular en células HeLa que se incubaron en 10 μM de péptido 3 (G(IKK)<sub>3</sub>I-NH<sub>2</sub>) durante 24 h, y como se observa mediante el uso de imágenes de SEM. (A) Células normales. (B) Ruptura de la membrana. (C) Daño local de la membrana. (D) Apoptosis.
- Figura 12 - Imágenes fluorescentes de la distribución del péptido 3 (G(IKK)<sub>3</sub>I-NH<sub>2</sub>) marcado con FITC en dos sistemas de cultivo que contienen células NIH 3T3 (huésped mamífero modelo) con bacterias *B. subtilis* 168 (panel superior) o células cancerosas HL60 (panel inferior). (A) y (D) son las imágenes que se observan bajo el campo brillante; (B) y (E) son las imágenes que se adquieren bajo luz excitante azul; (C) y (F) son las imágenes superpuestas de (A) y (B), y (D) y (E), respectivamente. En estas imágenes, las células adherentes son NIH 3T3, las células en forma de barra son *B. subtilis* 168 y las células redondeadas en suspensión son HL 60 que se señalan con flechas negras.
- Figuras 13 (a) a (c) - La actividad antibacteriana de los siete péptidos descritos en referencia al Ejemplo 8 y ampicilina contra las bacterias Gram negativas *E. coli*, (EC).
- Figuras 14 (a) a (c) - La actividad antibacteriana de los siete péptidos descritos en referencia al Ejemplo 8 y ampicilina contra las bacterias Gram-positivas *S. aureus* (SA).
- Figura 15 Interacciones de la bacteria *E. coli*, (EC) con tensioactivos y el péptido de membrana de huevo de peso molecular mixto, Mx, todo a la concentración de 1 % en peso (como se describe en el Ejemplo 11). Las nomenclaturas de los tensioactivos y polipéptidos se indican en la sección de Materiales.
- Figura 16 Interacciones de la bacteria *S. aureus* (SA) con tensioactivos y el péptido de membrana de huevo de peso molecular mixto, Mx, todo a la concentración de 1 % en peso (como se describe en el Ejemplo 11). Las nomenclaturas de los tensioactivos y polipéptidos se indican en la sección de Materiales.
- Figura 17 - Niveles de transcripción génica de los genes de citocina IL2 e IL8 de linfocitos que se trataron con G(IKK)<sub>3</sub>I-NH<sub>2</sub> 10 μM. Los niveles de transcripción del gen se evaluaron mediante RT-PCR.
- Breve descripción de las secuencias

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos del péptido 1 (helix-1 en la Tabla 1).

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos del péptido 2 (helix-2 en la Tabla 1).

5 SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos del péptido 3 (helix-3 en la Tabla 1).

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos del péptido 4 (helix-4 en la Tabla 1).

10 SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos del péptido 5 (helix-5 en la Tabla 1).

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos del péptido 6 (helix-6 en la Tabla 1).

SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos del péptido 7 (helix-7 en la Tabla 1).

15 SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos del péptido 8 (helix-8 en la Tabla 1).

SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos del péptido 9 (helix-9 en la Tabla 1).

20 SEQ ID NO: 10 es la secuencia de nucleótidos de un cebador sentido de  $\beta$ -actina descrito en los Ejemplos.

SEQ ID NO: 11 es la secuencia de nucleótidos de un cebador antisentido de  $\beta$ -actina descrito en los Ejemplos.

SEQ ID NO: 12 es la secuencia de nucleótidos de un cebador sentido de aspasa-8 descrito en los Ejemplos.

25 SEQ ID NO: 13 es la secuencia de nucleótidos de un cebador antisentido de aspasa-8 descrito en los Ejemplos.

SEQ ID NO: 14 es la secuencia de nucleótidos de un cebador de sentido fas descrito en los Ejemplos.

30 SEQ ID NO: 15 es la secuencia de nucleótidos de un cebador antisentido fas descrito en los Ejemplos.

SEQ ID NO: 16 es la secuencia de nucleótidos de un cebador de sentido fasL descrito en los Ejemplos.

SEQ ID NO: 17 es la secuencia de nucleótidos de un cebador antisentido fasL descrito en los Ejemplos.

35 SEQ ID NO: 18 es la secuencia de nucleótidos de un cebador sentido de IL2 descrito en los Ejemplos.

SEQ ID NO: 19 es la secuencia de nucleótidos de un cebador antisentido de IL2 descrito en los Ejemplos.

40 SEQ ID NO: 20 es la secuencia de nucleótidos de un cebador sentido de IL8 descrito en los Ejemplos.

SEQ ID NO: 21 es la secuencia de nucleótidos de un cebador antisentido de IL8 descrito en los Ejemplos.

Descripción detallada de la invención

45 *Terminología*

A menos que se indique de cualquier otra manera, los siguientes términos que se usan en la descripción y en las reivindicaciones tienen los siguientes significados que se exponen más abajo.

50 Se comprende que las referencias a "prevenir" o "prevención" se refieren a un tratamiento profiláctico e incluyen la prevención o el retraso de la aparición de los síntomas clínicos del estado, trastorno o afección que se desarrolla en una persona que puede estar aquejada con o predispuesta al estado, trastorno o afección pero aún no experimenta o exhibe síntomas clínicos o subclínicos del estado, trastorno o afección.

55 Se comprenderá que las referencias a "tratamiento" o "tratar" de un estado, trastorno o afección incluyen: (1) inhibir el estado, trastorno o afección, *es decir*, detener, reducir o retrasar el desarrollo de la enfermedad o una recaída de esta (en caso de tratamiento de mantenimiento) o al menos un síntoma clínico o subclínico de esta, (2) aliviar o atenuar la enfermedad, *es decir* provocar regresión del estado, trastorno o afección o al menos uno de sus síntomas clínicos o subclínicos o (3) tratamiento profiláctico.

60 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un mamífero para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar dicho tratamiento para la enfermedad. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará en dependencia del compuesto, la enfermedad y su gravedad y la edad, el peso, etc., del mamífero a tratar.

65

La frase "farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente descripción se refiere a compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuados para el uso en contacto con los tejidos de seres humanos o animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación riesgo/beneficio razonable.

5

A lo largo de toda la descripción y las reivindicaciones de esta descripción, las palabras "comprender" y "contener" y variaciones de las palabras, por ejemplo "que comprende" y "comprende", significan "que incluyen pero no se limitan a", y no pretenden (y no lo hacen) excluir otras porciones, aditivos, componentes, enteros o etapas.

10

A través de toda la descripción y las reivindicaciones de esta descripción, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera otra cosa. En particular, donde se use el artículo indefinido en la descripción, se entiende que contempla los plurales así como los singulares, a menos que el contexto requiera otra cosa.

15

Los rasgos, enteros, características, compuestos, porciones químicas o grupos descritos en conjunto con un aspecto particular, modalidad o ejemplo de la invención se entiende que son aplicables a cualquier otro aspecto, modalidad o ejemplo descrito en la presente a menos que se incompatible con éste.

20

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes que se mencionan en esta descripción se incorporan como referencia en la presente descripción en la misma extensión que si cada publicación, patente o solicitud de patente individual se indicara específicamente e individualmente para incorporarse a la presente descripción como referencia.

25

La nomenclatura que se usa en la presente descripción para definir los péptidos es la que se usa típicamente en la técnica en donde el grupo amino en el extremo N-terminal aparece a la izquierda y el grupo carboxilo en el extremo C-terminal aparece a la derecha. Un aminoácido como se hace referencia en la presente descripción puede comprender un aminoácido natural o un aminoácido sintético. Cuando un aminoácido tiene formas isoméricas, en un aspecto se hace referencia a la forma L.

30

En general, un aminoácido tiene la estructura de  $\text{NH}_2\text{-C(R)(R')\text{-COOH}}$ , en donde R y R' son cada uno, independientemente, hidrógeno o la cadena lateral de un aminoácido (por ejemplo, R =  $\text{CH}_3$  y R' = H para Ala), o R y R' pueden unirse para formar un sistema de anillo. Cuando se incluye en un péptido descrito en la presente descripción, por lo tanto, un aminoácido distinto del aminoácido N-terminal, generalmente tiene la estructura de  $\text{-NH-C(R)(R')\text{-CO-}}$ .

Los códigos de tres letras y una letra para referirse a aminoácidos naturales son bien conocidos en la técnica, y se usan en la presente, como a continuación:

35

| Aminoácido      | Código de tres letras | Código de una letra |
|-----------------|-----------------------|---------------------|
| Alanina         | Ala                   | A                   |
| Isoleucina      | Ile                   | I                   |
| Leucina         | Leu                   | L                   |
| Valina          | Val                   | V                   |
| Fenilalanina    | Phe                   | F                   |
| Triptófano      | Trp                   | W                   |
| Tirosina        | Tyr                   | Y                   |
| Asparagina      | Asn                   | N                   |
| Cisteína        | Cys                   | C                   |
| Glutamina       | Gln                   | Q                   |
| Metionina       | Met                   | M                   |
| Serina          | Ser                   | S                   |
| Treonina        | Thr                   | T                   |
| ácido aspártico | Asp                   | D                   |
| ácido glutámico | Glu                   | E                   |
| Arginina        | Arg                   | R                   |
| Histidina       | His                   | H                   |
| Lisina          | Lys                   | K                   |
| Glicina         | Gly                   | G                   |

60

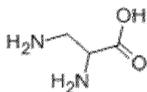
65

|         |     |   |
|---------|-----|---|
| Prolina | Pro | P |
|---------|-----|---|

5 Un aminoácido sintético es típicamente uno que no ocurre en la naturaleza. Los ejemplos de aminoácidos sintéticos se conocen bien en la técnica, y se describen en la presente descripción.

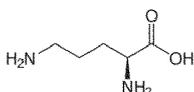
La ornitina (O u Orn) como se refiere en la presente generalmente tiene la estructura:

10



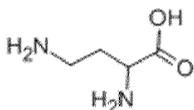
15 El ácido 2,3 diaminopropiónico (Dap) como se menciona en la presente generalmente tiene la estructura:

20



El ácido 2,4 diaminobutírico (Dab) como se menciona en la presente generalmente tiene la estructura:

25



### 30 **Péptidos Anfífilicos**

Como se describió anteriormente, la presente invención se refiere a péptidos anfífilicos nuevos, que tienen una gama de aplicaciones diferentes como consecuencia de, por ejemplo, actividad antimicrobiana y/o anticancerígena.

35 Al llegar a la invención, los inventores evaluaron varias combinaciones de secuencias anfífilicas mediante la alineación de los aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos de manera diferente. Los inventores descubrieron inicialmente que cuando los péptidos contenían una secuencia de repetición simple de IIKK y la relación de isoleucina hidrofóbica (I) a residuos de lisina catiónica (K) era 1:1, se producían grandes variaciones en el comportamiento de la solución.

40 Específicamente, los inventores encontraron que los péptidos, G(IKK)<sub>2</sub>I-NH<sub>2</sub>, G(IKK)<sub>3</sub>I-NH<sub>2</sub> y G(IKK)<sub>4</sub>I-NH<sub>2</sub> (los péptidos 2-4 de la presente descripción) interactúan con monocapas lipídicas de DPPG, y en interacción con vesículas de DPPG (que están cargadas negativamente e imitan las membranas de células bacterianas y tumorales), experimentan un cambio en la estructura secundaria para formar estructuras helicoidales (Ejemplo 1; Figuras 2 y 3). Los péptidos no forman tales estructuras ordenadas en solución acuosa o en vesículas de DPPC (que son zwitteriónicas y, por lo tanto, imitan las membranas normales de las células huésped de los mamíferos). Este resultado sugirió que podría producirse una respuesta estructural similar en la interacción del péptido con las diferentes capas de la membrana celular.

45 Los inventores descubrieron además que los péptidos que contienen (IIKK) y otros péptidos similares (péptidos 5-9 en los presentes Ejemplos) tienen actividad antibacteriana contra *E. coli* y *B. subtilis* (Ejemplo 2; Figuras 4 y 7), y han examinado el mecanismo de esta actividad para mostrar que los péptidos actúan mediante la ruptura de las membranas celulares (Ejemplo 5; Figuras 8 y 9). Los inventores mostraron además que los péptidos tienen actividad antitumoral contra las líneas celulares de cáncer HeLa y HL60 (Ejemplo 3; Figuras 5 y 7), y han examinado el mecanismo de esta actividad para mostrar que los péptidos actúan mediante la ruptura de las membranas celulares (Ejemplo 6; Figuras 10 y 11).

55 Para uso terapéutico, es importante que un péptido que se dirige a la membrana celular de bacterias o células cancerosas, no cause un daño sustancial a las células huésped normales. Los inventores examinaron la actividad hemolítica de los péptidos presentes en los glóbulos rojos humanos, y demostraron que el valor de EC50 (concentración de péptido que se requiere para inducir la lisis del 50 % de las células sanguíneas) era mucho mayor que el valor de la MIC (concentración de péptido más baja que inhibe el crecimiento bacteriano) para *E. coli* o *B. subtilis*, o el valor de IC50 (concentración de péptido que provoca el 50 % de inhibición del crecimiento de células tumorales) en células HeLa o HL60 (Ejemplo 4; Figuras 6 y 7). Los inventores confirmaron además la selectividad para las células bacterianas/cancerosas en comparación con las células huésped normales, mediante el cocultivo de células huésped normales de mamífero (células NIH 3T3) con células bacterianas *B. subtilis* o con células cancerosas HL60, en presencia del péptido 3 (G(IKK)<sub>3</sub>I-NH<sub>2</sub>). El péptido se dirigió selectivamente a las células bacterianas y cancerosas, pero no se unió ni se asoció con las células huésped normales (Ejemplo 7; Figura 12). Para el mejor conocimiento de los inventores, este es el primer ensayo *in vitro* de selectividad que se reporta para tales estudios.

65

En la presente descripción se describe en un primer aspecto, un péptido con la fórmula I o II que se muestra a continuación



20 en donde:

A<sup>1</sup> está ausente o es un aminoácido;

25 v es un número entero que se selecciona de 0, 1, 2 o 3;

A<sup>2</sup> es, independientemente para cada caso, un aminoácido hidrofóbico;

30 w es un número entero que se selecciona de 2 a 10;

A<sup>3</sup> es un aminoácido hidrofílico;

x es un número entero que se selecciona de 1 a 5;

35 y es 1, 2, 3 o 4;

A<sup>4</sup> está ausente o es un aminoácido;

40 z es 0, 1, 2 o 3;

R<sub>1</sub> es un sustituyente terminal que se selecciona de OH, NH<sub>2</sub>, (1-18C)alquilo, N[(1-18C)alquilo]<sub>2</sub> o NH(1-18C)alquilo;

R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> ambos se seleccionan independientemente de H, (1-18C)alquilo o (2-18C)acilo;

45 o una sal de este.

En el primer aspecto, A<sup>2</sup> puede ser cualquier aminoácido hidrofóbico adecuado, ya sea natural o sintético. En ciertos aspectos A<sup>2</sup> puede ser un aminoácido natural y/o la unidad A<sup>2</sup><sub>w</sub> puede comprender solo aminoácidos naturales.

50 Un aminoácido hidrofóbico en general se refiere a un aminoácido que tiene una cadena lateral hidrofóbica que incluye alanina (A), isoleucina (I), leucina (L), valina (V), fenilalanina (F), triptófano (W), tirosina (Y) y glicina (G) y aquellos aminoácidos que son más hidrofóbicos que los aminoácidos cargados y polares, como la metionina, la cisteína y la prolina. En un aspecto, A<sup>2</sup> puede seleccionarse entre A, V, I, L, M, P, F, Y y W. En otro aspecto particular, A<sup>2</sup> es V o I.

55 A<sup>2</sup> también puede ser un aminoácido hidrofóbico sintético, por ejemplo, un análogo sintético de cualquiera de los aminoácidos hidrofóbicos naturales que se mencionaron anteriormente.

Adecuadamente, A<sup>2</sup> se selecciona de I, L, V, F, Y y W. Adecuadamente, A<sup>2</sup> se selecciona de I, L y V, como I o V. Más adecuadamente, A<sup>2</sup> es I.

60 A<sup>3</sup> puede ser cualquier aminoácido hidrofílico adecuado, ya sea natural o sintético. En un caso, A<sup>3</sup> es un aminoácido natural y/o la unidad A<sup>3</sup><sub>x</sub> comprende solo aminoácidos naturales.

65 Un aminoácido hidrofílico se refiere en general a un aminoácido que tiene carga o a un grupo polar en una cadena lateral. Dichos aminoácidos incluyen, por ejemplo: aminoácidos con cadenas laterales cargadas positivamente (catiónicas) tales como histidina (H), lisina (K) y arginina (R); aminoácidos con cadenas laterales cargadas negativamente tales como ácido

aspártico (D), ácido glutámico (E); aminoácidos con cadenas laterales polares sin carga como serina (S), treonina (T), asparagina (N) y glutamina (Q). Sobre una base relativa, algunos aminoácidos débilmente hidrofóbicos pueden considerarse relativamente hidrofílicos, en dependencia de su clasificación relativa en una secuencia peptídica dada. Por ejemplo, la glicina (G) puede considerarse como relativamente hidrofílica en algunos casos.

5

$A^3$  puede ser un aminoácido hidrofílico sintético, por ejemplo, un análogo sintético de cualquiera de los aminoácidos hidrofílicos naturales que se mencionaron anteriormente. Los aminoácidos sintéticos adecuados incluyen aquellos en los que la cadena lateral comprende  $(CH_2)_n-NH_2$  donde  $n=1, 2, 3$  o  $4$ , o aquellos aminoácidos en los que la cadena lateral comprende  $(CH_2)_{norte}-COOH$ , donde  $n=1, 2, 3$  o  $4$ . Por ejemplo,  $A^3$  puede ser un aminoácido catiónico tal como ornitina (O), Dap o Dab como se describe en la presente descripción.

10

Adecuadamente,  $A^3$  es un aminoácido catiónico, como el que se selecciona de H, K, y R, o un análogo sintético de este, como ornitina, Dap o Dab. Más adecuadamente,  $A^3$  es K u O, tal como K.

15

En la presente descripción también se describe, en un segundo aspecto, un péptido con la fórmula I o II que se mostró anteriormente.

en donde:

20

$A^1$  está ausente o es un aminoácido;

v es un número entero que se selecciona de 0, 1, 2 o 3;

25

$A^2$  es, independientemente para cada aparición, un aminoácido hidrofóbico que se selecciona de isoleucina (I) o valina (V);

w es un número entero que se selecciona de 2 a 10;

30

$A^3$  es un aminoácido hidrofílico que se selecciona de lisina (K) u ornitina (O);

x es un número entero que se selecciona de 1 a 5;

y es 2, 3, o 4;

35

$A^4$  está ausente o es un aminoácido;

z es 0, 1, 2 o 3;

40

$R_1$  es un sustituyente terminal que se selecciona de OH,  $NH_2$ , (1-18C)alquilo,  $N[(1-18C)alquilo]_2$  o  $NH(1-18C)alquilo$ ;

$R_2$  y  $R_3$  ambos se seleccionan independientemente de H, (1-18C)alquilo o (2-18C)acilo;

o una sal de este.

45

En un caso del primer y segundo aspectos, v es  $\geq 1$ . En un caso particular del primer y segundo aspecto, v = 1.

En un caso del primer y segundo aspectos, la unidad que se define por  $A^1_v$  bloquea el extremo izquierdo del péptido y mejora la estabilidad del péptido. En un caso del primer y segundo aspectos, el aspecto  $A^1$  es un aminoácido. En un caso particular del primer y segundo aspecto,  $A^1$  es un aminoácido que se selecciona de glicina (G), lisina (K) e isoleucina (I).

50

En un caso particular del primer y segundo aspectos, la unidad  $A^1_v$  se selecciona de G, GKI, o GIK. En un caso preferido del primer y segundo aspectos, la unidad  $A^1_v$  es G.

En un caso del primer y segundo aspectos, z es  $\geq 1$ . En un caso particular del primer y segundo aspectos, z es 1.

55

En un caso del primer y segundo aspectos, la unidad que se define por  $A^4_z$  mejora la estabilidad del péptido. En un caso particular del primer y segundo aspecto,  $A^4$  es un aminoácido. En otro caso del primer y segundo aspecto,  $A^4$  es un aminoácido que se selecciona de isoleucina (I), leucina (L), valina (V) y lisina (K). Adecuadamente, la unidad  $A^4_z$  se selecciona de I, L, V y KII. Más adecuadamente, la unidad  $A^4_z$  es I. En un caso del primer y segundo aspectos, la unidad  $A^4_z$ , o  $A^4$  en el péptido comprende el(los) mismo(s) aminoácido(s) que  $A^2_w$  o  $A^2$ .

60

Los grupos  $A^1$  y/o  $A^4$  pueden seleccionarse para alterar o desestabilizar una superficie hidrofílica y/o hidrofóbica del péptido tras adoptar una estructura helicoidal. Esto se puede evaluar tras dibujar un círculo o rueda helicoidal que represente al péptido, como se describe en la presente descripción. La alteración o desestabilización de dicha superficie puede afectar la fuerza o la propensión de la estructura alfa-helicoidal del péptido, lo que puede afectar la interacción del péptido con las superficies celulares y, por lo tanto, la selectividad celular. Por lo tanto, la selectividad celular puede ajustarse mediante la selección de  $A^1$  y/o  $A^4$ .

65

En un caso del segundo aspecto de la descripción,  $A^2$  es I.

En el primer o segundo aspectos,  $A^2$  se selecciona independientemente, para cada aparición.

5 En un caso particular del primer y segundo aspectos, en la unidad  $A^2_w$ ,  $A^2$  es el mismo aminoácido para todas las apariciones. Por ejemplo, la unidad  $A^2_w$  puede comprender II, LL o VV. Adecuadamente, la unidad  $A^2_w$  es II.

En un caso del primer y segundo aspectos,  $w$  puede ser un número entero que se selecciona de 2 a 7, o de 2 a 5, tal como 2, 3, 4 o 5. En un caso particular,  $w$  es 2.

10

En otro caso del segundo aspecto,  $A^3$  es K.

En un caso del primer y segundo aspectos,  $x$  puede ser un número entero que se selecciona de 1 a 3, o de 1 a 2. En un caso particular,  $x$  es 2.

15

En un caso del primer y segundo aspectos, cuando  $x > 1$ , cada aparición de  $A^3$  se selecciona independientemente. En un caso particular del primer aspecto, cuando  $x > 1$ , la unidad  $A^3_x$  comprende al menos un aminoácido catiónico. La unidad puede comprender aminoácidos hidrofílicos aniónicos o no cargados adicionales tales como los descritos anteriormente, siempre que la unidad conserve una carga positiva global. Estos aminoácidos no catiónicos pueden proporcionar parches catiónicos espaciados y debilitar la distribución de carga catiónica en una rueda helicoidal que representa el péptido. En un caso, cuando  $x > 1$ , cada aparición de  $A^3$  en la unidad  $A^3_x$  es un aminoácido catiónico como se describe en la presente descripción.

20

En un caso particular del primer y segundo aspectos, en la unidad  $A^3_x$ , cuando  $x > 1$ ,  $A^3$  es el mismo aminoácido para todas las apariciones, por ejemplo, el mismo aminoácido catiónico. Por ejemplo, la unidad  $A^3_x$  puede comprender HH, KK o RR u OO. Adecuadamente, la unidad comprende KK u OO, particularmente KK.

25

En un caso del primer y segundo aspectos, la relación de aminoácidos hidrofóbicos a hidrofílicos, por ejemplo catiónicos, en la unidad  $[A^2_w-A^3_x]$  o en la unidad  $[A^3_x-A^2_w]$  es 1: 1. En un caso,  $x = w$  en el péptido. En un caso preferido,  $x = w = 2$ .

30

En un caso particular del primer aspecto, en la unidad  $[A^2_w-A^3_x]$  o en la unidad  $[A^3_x-A^2_w]$ , se selecciona  $A^2_w$  de II, LL y VV, y se selecciona  $A^3_x$  de HH, KK, RR y OO. Así, por ejemplo, puede seleccionarse la unidad  $[A^2_w-A^3_x]$  de IHH, IKK, IIRR, IIOO, LLHH, LLKK, LLRR, LLOO, VVHH, VVKK, VVRR y VVOO, y la unidad  $[A^3_x-A^2_w]$  puede seleccionarse de HHII, HHLL, HHVV, KKII, KKLL, KKV, RRII, RRL, RRVV, OOII, OOLL y OOVV.

35

En un caso particular del segundo aspecto, en la unidad  $[A^2_w-A^3_x]$  o en la unidad  $[A^3_x-A^2_w]$ ,  $A^2_w$  se selecciona de II o VV, y  $A^3_x$  se selecciona de KK y OO. Así, por ejemplo, la unidad  $[A^2_w-A^3_x]$  puede seleccionarse de IKK, IIOO, VVKK y VVOO, y la unidad  $[A^3_x-A^2_w]$  puede seleccionarse de KKII, KKV, OOII y OOVV.

40

En un caso particular del primer aspecto,  $A^2_w$  se selecciona de II, LL y VV, y  $A^3_x$  se selecciona de KK y OO. Los ejemplos incluyen los de los péptidos 1-9 descritos en la presente: IKK, LLKK, VVKK, IIOO y KKII. Las unidades preferidas  $[A^2_w-A^3_x]$  o  $[A^3_x-A^2_w]$  incluyen aquellas donde  $A^2_w$  es II y  $A^3_x$  es KK u OO. Una unidad preferida es IKK, KKII o IIOO.

45

En un caso preferido del segundo aspecto,  $A^2_w$  se selecciona de II y VV, y  $A^3_x$  se selecciona de KK y OO. Los ejemplos incluyen los de los péptidos 1-9 descritos en la presente: IKK, VVKK, IIOO y KKII. Las unidades preferidas  $[A^2_w-A^3_x]$  o  $[A^3_x-A^2_w]$  incluyen aquellas donde  $A^2_w$  es II y  $A^3_x$  es KK u OO. Una unidad preferida es IKK, KKII o IIOO.

En un caso del primer y segundo aspectos, el péptido con la fórmula I (que comprende la unidad  $[A^2_w-A^3_x]$ ).

50

En el primer aspecto,  $v$  puede seleccionarse de 1, 2, 3 o 4. En un caso,  $v > 1$ , tal como 2, 3, o 4. En un caso particular,  $v$  es 3.

En el segundo aspecto,  $v$  puede seleccionarse de 2, 3 o 4. En un caso,  $v$  es 2 o 3. En un caso particular,  $v$  es 3.

55

En un caso particular del primer y segundo aspectos,  $R_1$  se selecciona de  $\text{NH}_2$ , (1-10C)alquilo,  $\text{NH}(1-14\text{C})$ alquilo o  $\text{N}([1-10\text{C})\text{alquilo}]_2$ . Por ejemplo,  $R_1$  puede ser adecuadamente  $\text{NH}_2$ . En un caso particular,  $R_2$  y  $R_3$  se seleccionan independientemente de H (hidrógeno), (1-10C)alquilo y (2-10C)acilo, tal como H, (2-10C)alquilo o (2-10C)acilo.

60

En un caso del primer y segundo aspectos, cuando  $v \geq 1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son ambos H (hidrógeno).

En un caso del primer y segundo aspectos, en un péptido de la descripción:

$A^1$  es G y  $v = 1$ ;

65

$A^2_w$  es II o VV, preferentemente II;

A<sup>3</sup><sub>x</sub> es KK u OO, preferentemente KK;

A<sup>4</sup> es l y z = 1; y

5 y = 2-4, preferentemente 3.

En un caso preferido en el péptido R<sub>1</sub> es NH<sub>2</sub>, y ambos R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son H. Los Ejemplos de péptidos de acuerdo con la descripción incluyen los péptidos 1-9 descritos en la presente descripción en los presentes Ejemplos, y se enumeran en la Tabla 1. Los Ejemplos particulares son: el péptido 2 (G(IKK)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); el péptido 3 (G(IKK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>); el péptido 4 (G(IKK)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>); y el péptido 7 (G(IIOO)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>). Los péptidos particularmente preferidos son los péptidos 3 y 7, tales como el péptido 3.

Un péptido de acuerdo con la descripción es típicamente catiónico y anfifílico. Por catiónico se entiende que el péptido lleva una carga positiva general. En general, esto se refiere a la carga del péptido a un pH dado, por ejemplo, por debajo de pH 10, o a la pKa de cualquier aminoácido catiónico en el péptido. En un aspecto, la carga es como al pH fisiológico, por ejemplo, pH 7 o 7,4. Por ejemplo, un péptido puede comprender carga positiva ≥ 1, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más cargas positivas. Por "anfifílico" se entiende que el péptido comprende ambas propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas (lipofílicas). En general, dicho péptido tiene un grupo polar soluble en agua y un grupo no polar, insoluble en agua, por ejemplo, una cadena de hidrocarburos.

En un aspecto, los péptidos en la presente descripción típicamente adoptan o son capaces de adoptar una estructura helicoidal  $\alpha$ , por ejemplo, tras la interacción con lípidos cargados negativamente. Estos péptidos generalmente pueden representarse en una proyección de rueda Schiffer-Edmundson. Dicha proyección tiene típicamente una superficie predominantemente hidrofóbica y una predominantemente hidrofílica.

En un aspecto, un péptido de la descripción puede comprender menos de o igual a 20 aminoácidos, tal como menos de o igual a 19, 18, 17, 16, 15 o 14 aminoácidos. Un péptido puede comprender, por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 aminoácidos.

En un aspecto un péptido comprende solo aminoácidos naturales. Tal péptido puede considerarse un péptido natural. Los péptidos naturales pueden ser preferidos para aplicaciones particulares.

Una sal adecuada del compuesto con la fórmula I o II es una sal farmacéuticamente aceptable. Dichas sales pueden ser, por ejemplo, una sal de adición de ácido de un compuesto de la descripción que es suficientemente básico, por ejemplo, una sal de adición de ácido con, por ejemplo, un ácido inorgánico u orgánico, por ejemplo, ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, trifluoroacético, fórmico, cítrico o maleico. Además, una sal farmacéuticamente aceptable adecuada de un compuesto de la descripción que es suficientemente ácida es una sal de metal alcalino, por ejemplo, una sal de sodio o potasio, una sal de metal alcalinotérreo, por ejemplo, una sal de calcio o magnesio, una sal de amonio o una sal con una base orgánica que proporciona un catión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, una sal con metilamina, dimetilamina, trimetilamina, piperidina, morfolina o tris-(2-hidroxietil)amina.

#### *Preparación de péptidos.*

Los péptidos pueden sintetizarse y purificarse por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, puede usarse la síntesis de péptidos en fase sólida sobre resina Rink amide MBHA, como en los presentes ejemplos.

Alternativamente, los ácidos nucleicos que codifican los péptidos pueden prepararse por métodos de rutina y expresarse para formar los péptidos. En un aspecto, la presente descripción se refiere a un ácido nucleico que codifica un péptido de la descripción, y al uso del ácido nucleico en la preparación del péptido.

#### *Propiedades funcionales de los péptidos de Fórmula I y II.*

Los péptidos de la presente descripción tienen propiedades tensioactivas. Por lo tanto, los péptidos son capaces de reducir la tensión superficial de un líquido como el agua.

Los péptidos de la presente descripción pueden poseer actividad antibacteriana. Con esto se quiere decir que un péptido es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano en un grado dado como se determina en un ensayo adecuado. Puede mostrarse actividad contra bacterias Gram positivas (tales como *B. subtilis* o *S. aureus*), y/o bacterias Gram negativas (tales como *E. coli*). En un aspecto, la actividad contra las bacterias Gram positivas puede ser mayor que la actividad contra las bacterias Gram negativas. Sin desear limitarse a ninguna teoría en particular, se cree que el péptido interactúa con y daña la membrana celular bacteriana.

Típicamente, la actividad antibacteriana puede expresarse en términos de un valor de MIC (concentración inhibitoria mínima: la concentración más baja de péptido/fármaco que inhibe el crecimiento bacteriano). Preferentemente, un péptido tiene un valor de MIC de 1 - 130  $\mu$ M, por ejemplo, 1-120, 1-110, 1-100, 1-90, 1-80, 1-70, 1-60, 1-50, 1-40, 1-30, 1-20  $\mu$ M y más preferentemente de 1-10  $\mu$ M contra *E. coli*, por ejemplo, como se determina mediante el uso de un ensayo descrito

5 en la presente. Preferentemente un péptido tiene un valor de MIC de 0,5 - 100  $\mu\text{M}$ , por ejemplo, 0,5-90, 0,5-80, 0,5-70, 0,5-60, 0,5-50, 0,5-40, 0,5-30, 0,5-20  $\mu\text{M}$  y más preferentemente de 0,5-10  $\mu\text{M}$  contra *B. subtilis*, por ejemplo, como se determina mediante el uso de un ensayo descrito en la presente. Adecuadamente, un péptido tiene un valor de MIC menor o igual que el que se determina cuando se usan péptidos tales como  $\text{G}(\text{I}(\text{I}(\text{K}(\text{K}))_3)_1\text{-NH}_2$  y  $\text{G}(\text{I}(\text{I}(\text{O}(\text{O}))_3)_1\text{-NH}_2$  descrito en la presente. Adecuadamente, un péptido tiene un valor de MIC menor o igual que el de un antibiótico conocido, como cualquiera de los descritos en la presente descripción (véase la Figura 7).

10 La actividad antibacteriana de un péptido puede analizarse y examinarse por cualquier medio adecuado, que incluye los descritos en la presente descripción en los Ejemplos. Así, por ejemplo, un ensayo para determinar el valor de la MIC puede comprender:

15 Agregar alícuotas (por ejemplo, de 100  $\mu\text{l}$ ) de una suspensión bacteriana de concentración conocida (unidades formadoras de colonias (CFU)/ml) a un volumen dado (por ejemplo, 100  $\mu\text{l}$ ) de solución de péptido en cada pocillo de una placa de pocillos múltiples, donde las soluciones de péptidos se proporcionan como una serie de diluciones (por ejemplo, diluciones seriadas dobles en tampón PBS 10 mM);

incubar durante un tiempo y temperatura adecuados que permita el crecimiento bacteriano en ausencia de péptido (por ejemplo, 18-24 h a 37 °C);

20 evaluar el crecimiento bacteriano por cualquier medio adecuado (por ejemplo, medición de la absorbancia a 600 nm con un lector de microplacas); y

definir la MIC como la concentración más baja de péptido para la cual no hay crecimiento visible.

25 Adecuadamente, un péptido demuestra actividad antibacteriana dentro de los límites de detección del ensayo que se usa. Típicamente para un péptido de Fórmula I o II que tiene actividad antibacteriana, y en la Fórmula I o II es  $> 1$ , por ejemplo  $y = 2, 3$  o  $4$ .

30 Un péptido de la descripción también puede tener actividad antitumoral. Por esto se entiende típicamente que un péptido es capaz de reducir la viabilidad de las células cancerosas (o inhibir el crecimiento de las células cancerosas hasta cierto punto) como se determina en un ensayo adecuado.

35 Un péptido puede ser activo contra cualquier célula cancerosa o línea celular adecuada, por ejemplo células HeLa y/o HL60. La actividad antitumoral puede expresarse en términos de un valor de  $\text{IC}_{50}$  (concentración de péptido que provoca el 50 % de inhibición del crecimiento de células tumorales). Preferentemente un péptido tiene un valor de  $\text{IC}_{50}$  que es menor o igual al que se determina para el péptido  $\text{G}(\text{I}(\text{I}(\text{K}(\text{K}))_3)_1\text{-NH}_2$  o péptido  $\text{G}(\text{I}(\text{I}(\text{O}(\text{O}))_3)_1\text{-NH}_2$  en un ensayo como los descritos aquí (ver Tabla 3, Figura 7). En un aspecto, un péptido puede tener un valor de  $\text{IC}_{50}$  de 1-70  $\mu\text{M}$  para las células HeLa, por ejemplo 1-60, 1-50, 1-40, 1-30, 1-25, 1-20 o 1-10  $\mu\text{M}$ . En un aspecto, un péptido puede tener un valor de  $\text{IC}_{50}$  para las células HL60 de 1-100  $\mu\text{M}$ , por ejemplo, 1-90, 1-80, 1-70, 1-60, 1-50, 1-40, 1-30, 1-20 o 1-10  $\mu\text{M}$  tal como 5-25  $\mu\text{M}$ .

40 La actividad antitumoral de un péptido puede analizarse y examinarse por cualquier medio adecuado, que incluye los descritos en los Ejemplos de la presente descripción. Por ejemplo, puede usarse un ensayo de viabilidad celular de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT), y el valor de  $\text{IC}_{50}$  que se calcula como la concentración de péptido que indujo una inhibición del crecimiento del 50 % en comparación con el control no tratado. MTT es un compuesto amarillo que se reduce a formazán púrpura en las mitocondrias de las células vivas. La reducción requiere enzimas mitocondriales activas y, por lo tanto, puede actuar como un indicador de células viables.

Así, por ejemplo, un ensayo para determinar el valor de  $\text{IC}_{50}$  puede comprender:

50 cultivar células cancerosas en un medio adecuado durante un período de tiempo adecuado (por ejemplo, en una placa de pocillos múltiples adecuada a  $10^5$  células/pocillo en un medio completo, como el medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), con 10 % de suero fetal bovino (FBS) durante 24 h)

55 tratar las células cancerosas con una serie de diluciones de péptidos (por ejemplo, péptidos que se diluyeron dos veces, para dar concentraciones finales de 50, 25, 12,5, 6, 25 y 3  $\mu\text{M}$ )

incubar durante un tiempo adecuado, por ejemplo 24 h

60 añadir una cantidad adecuada de MTT (por ejemplo, 20  $\mu\text{l}$  de una solución de 5 mg/ml por pocillo) e incubar durante un tiempo y temperatura adecuados (por ejemplo, 4 h a 37 °C);

extraer el sobrenadante y añadir una cantidad adecuada de dimetilsulfóxido (DMSO), por ejemplo, 150  $\mu\text{l}$  por pocillo, para disolver los cristales de formazán; y

65 medir la absorbancia a 570 nm, por ejemplo, mediante el uso de un lector de microplacas.

Las muestras sin células para calibrar el espectrofotómetro y las muestras de células sin péptidos pueden tomarse como controles negativos.

Adecuadamente el péptido demuestra actividad antitumoral dentro de los límites de detección del ensayo que se usa.

Típicamente, para un péptido de Fórmula I o II que tiene actividad antitumoral, y en la Fórmula I o II es  $> 1$ , por ejemplo y = 2, 3 o 4.

Adecuadamente un péptido de la descripción interactúa selectivamente con células bacterianas y/o tumorales, y no interactúa sustancialmente ni daña las células huésped normales.

Un huésped como se usa en la presente se refiere generalmente a un organismo que tiene una infección bacteriana y/o células cancerosas, y que debe tratarse con un péptido de la descripción. En general, el huésped es un mamífero, tal como un ser humano. Un huésped puede ser un animal como una mascota doméstica o un animal de granja, por ejemplo, perros, gatos, conejos, caballos, gallinas, cerdos u ovejas. Por células huésped normales se entiende células en o del organismo huésped a las que no se desea marcar con el péptido, o una línea celular derivada de este. Esto incluye, por ejemplo, células huésped diferentes de las bacterianas o cancerosas, o una línea celular derivada de estas. Las células huésped normales o las líneas celulares pueden incluir, por ejemplo, glóbulos rojos humanos, o células NIH 3T3 o células de fibroblastos dérmicos humanos.

La selectividad de un péptido para células bacterianas o cancerosas, en comparación con las células huésped normales, puede determinarse mediante el uso de cualquier ensayo o ensayos adecuados, que incluye los que se usan en los presentes Ejemplos.

En un aspecto, un péptido puede mostrar una interacción selectiva con un imitador lipídico de las membranas de células bacterianas/tumorales (por ejemplo, DPPG) en comparación con un imitador lipídico de las membranas de células huésped normales de mamíferos (por ejemplo, DPPC). Esto puede evaluarse, por ejemplo, mediante la determinación del cambio en la presión de la superficie lipídica en presencia del péptido o mediante el uso de espectros de CD para determinar un cambio en la estructura secundaria del péptido, por ejemplo, la formación de una estructura helicoidal ordenada, en presencia del imitador lipídico (por ejemplo, SUV de lípidos). Los métodos adecuados se describen en el Ejemplo 1 de la presente descripción. Preferentemente, un péptido tiene una afinidad más fuerte y frecuentemente produce un aumento significativamente mayor en la presión superficial en un imitador lipídico de membranas de células bacterianas/tumorales (por ejemplo, DPPG) que un imitador lipídico de membranas de células huésped normales de mamíferos (por ejemplo, DPPC). Preferentemente, un péptido sufre un cambio en la estructura secundaria durante la incubación con SUV de un imitador lipídico de membranas de células bacterianas/tumorales (por ejemplo, DPPG) pero no o en un grado mucho menor durante la incubación con SUV de un imitador lipídico de membranas de células huésped normales de mamífero (por ejemplo, DPPC).

En un aspecto preferido, un péptido muestra actividad antibacteriana y/o actividad antitumoral a una concentración de péptido que no o sustancialmente no produce reducción en la viabilidad de las células huésped normales.

El efecto de un péptido sobre las células huésped normales puede determinarse mediante el uso de cualquier ensayo adecuado. Un ejemplo es un ensayo hemolítico que se realiza en glóbulos rojos, como en el Ejemplo 4, que puede usarse para determinar un valor de  $EC_{50}$  (la concentración de péptido necesaria para inducir un 50 % de lisis de las células sanguíneas en el ensayo). Así, por ejemplo, un ensayo puede comprender:

mezclar una alícuota de una suspensión de glóbulos rojos humanos (hRBC) (por ejemplo, 100  $\mu$ l de hRBC suspendidos en PBS al 8 % (volumen/volumen)) con una alícuota de cada miembro de una serie de dilución de péptidos (por ejemplo, péptidos que se diluyeron dos veces), en una placa de pocillos múltiples;

incubar durante un tiempo y temperatura adecuados (por ejemplo, 1 hora a 37 °C) y centrifugar (por ejemplo, 1000 g durante 5 minutos); y

transferir alícuotas (por ejemplo, 100  $\mu$ l) del sobrenadante a nuevas placas de pocillos múltiples y monitorear la liberación de hemoglobina mediante la medición de la absorbancia a 540 nm (por ejemplo, con un lector de microplacas de ELISA).

Como controles negativos y positivos, pueden emplearse hRBC en PBS y Triton X-100 al 0,1 %. El porcentaje de hemólisis puede calcularse de la siguiente manera:

$$\% \text{ de hemólisis} = \frac{(\text{Abs}_{540\text{nm}} \text{ con péptido} - \text{Abs}_{540\text{nm}} \text{ en PBS})}{[(\text{Abs}_{540\text{nm}} \text{ con Tritón X-100 } 0,1 \% - \text{Abs}_{540\text{nm}} \text{ en PBS})] \times 100}$$

En un aspecto se prefiere que un péptido que es para uso antibacteriano tenga un valor de  $EC_{50}$  que es significativamente más alto que el valor de la MIC del péptido en un ensayo antibacteriano como los descritos en la presente. De manera similar se prefiere que un péptido que es para uso antitumoral tenga un valor de  $EC_{50}$  que es significativamente más alto

que el valor de IC<sub>50</sub> del péptido en un ensayo antitumoral tal como los descritos en la presente. Por ejemplo, un valor de EC<sub>50</sub> para un péptido puede ser al menos 10 veces mayor, tal como 20 veces mayor o más que un valor de MIC correspondiente. Del mismo modo, un valor de EC<sub>50</sub> para un péptido puede ser al menos 5 veces, 6 veces, 7 veces o al menos 10 veces más alto, como 20 veces más alto o más que el valor de IC<sub>50</sub> correspondiente. La selectividad de un péptido puede determinarse adicionalmente mediante el cultivo conjunto de diferentes células en presencia del péptido. Típicamente, las células diana (por ejemplo, células bacterianas y/o cancerosas, como cualquiera de las descritas en la presente) se cultivan conjuntamente con células diferentes de las diana (células huésped normales, como cualquiera de las descritas en la presente). El cocultivo se incuba con péptido marcado de forma detectable (por ejemplo, péptido que lleva un marcador fluorescente tal como FITC). La distribución del péptido se evalúa después mediante la detección del marcador (por ejemplo, mediante microscopía, tal como microscopía de fluorescencia). Preferentemente el péptido se asocia con o en las células diana, y no se asocia con o en las células diferentes de las diana. Dicho cocultivo se describe para el péptido 3 en el Ejemplo 7 de la presente descripción.

#### 15 *Aplicaciones*

##### *Usos*

Los péptidos con la fórmula I o II tienen una variedad de usos.

20 Los péptidos del primer o segundo aspecto de la descripción pueden usarse como tensioactivos. Los tensioactivos se emplean habitualmente en una amplia variedad de productos y procesos, donde se desea reducir la tensión superficial, lo que incluye los agentes de limpieza, humectación, dispersión, emulsión, espuma y antiespuma. Por ejemplo, los tensioactivos pueden encontrar uso en: composiciones de limpieza, tales como detergentes, suavizantes de telas; formulaciones agroquímicas tales como herbicidas e insecticidas; biocidas (desinfectantes); composiciones para el cuidado personal, tales como champús, acondicionadores; composiciones químicas tales como emulsiones, pinturas, adhesivos, tintas; o en composiciones farmacéuticas.

30 Los péptidos de Fórmula I o II del primer o segundo aspecto de la descripción que tienen actividad antibacteriana pueden usarse como conservantes, para evitar la descomposición o el cambio químico indeseable en una sustancia o composición debido al crecimiento bacteriano. Por ejemplo, pueden adicionarse conservantes a alimentos, productos farmacéuticos, pinturas, muestras biológicas o madera.

35 Los péptidos del primer o segundo aspecto de la descripción que tienen actividad antibacteriana pueden usarse como agentes antibacterianos, con fines terapéuticos o no terapéuticos. El uso no terapéutico de un agente antibacteriano puede incluir, por ejemplo, el uso en productos de limpieza, o composiciones para el cuidado personal. El uso no terapéutico puede ser *in vitro*. El uso terapéutico de un agente antibacteriano se describe adicionalmente en la presente descripción.

40 Los péptidos de Fórmula I o II del primer o segundo aspectos de la descripción que tienen actividad antitumoral pueden usarse como agentes anticancerígenos. Esto se describe más adelante en este documento.

45 Por consiguiente, en un aspecto, la descripción proporciona el uso de un péptido de Fórmula I o II como tensioactivo. La descripción proporciona además el uso de un péptido de Fórmula I o II como conservante. La descripción proporciona además el uso de un péptido de Fórmula I o II como agente antibacteriano. La descripción proporciona además el uso de un péptido de Fórmula I o II como agente anticancerígeno.

50 Es evidente que, en uso, un péptido puede realizar más de una función. Por ejemplo, un péptido que se usa en una composición limpiadora puede actuar tanto como agente antibacteriano como tensioactivo. De manera similar, un péptido que se usa en una composición farmacéutica para tratar el cáncer, puede actuar como agente tensioactivo y antitumoral. En consecuencia, la descripción también proporciona el uso de un péptido de Fórmula I o II para uno o más de los propósitos anteriores simultáneamente.

También es evidente que uno o más péptidos de Fórmula I o II pueden usarse juntos en cualquier aplicación dada.

#### 55 *Metodos médicos*

Los péptidos con la fórmula I o II del primer o segundo aspecto de la descripción que tienen actividad antibacteriana o antitumoral tienen además aplicaciones terapéuticas, en el tratamiento de infecciones bacterianas o cáncer en un sujeto.

60 Por consiguiente, la descripción proporciona un péptido con la fórmula I o II del primer o segundo aspecto de la descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en el tratamiento de la infección.

65 La descripción proporciona además un método para tratar la infección que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de Fórmula I o II del primer o segundo aspecto de la descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a un individuo que necesita dicho tratamiento.

La descripción proporciona además un péptido con la fórmula I o II del primer o segundo aspecto de la descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en el tratamiento del cáncer.

5 La descripción proporciona además un método para tratar el cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de Fórmula I o II del primer o segundo aspectos de la descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a un individuo que necesita dicho tratamiento.

10 Un sujeto o individuo que se trate de acuerdo con la descripción es típicamente un sujeto mamífero, tal como un ser humano. Un sujeto puede ser un animal tal como una mascota doméstica o un animal de granja descrito en la presente.

Una infección a tratar de acuerdo con los presentes métodos es típicamente una infección bacteriana. La infección es en general de una bacteria que es susceptible al péptido como se describe en la presente. La infección puede asociarse o provocarse por bacterias Gram negativas y/o bacterias Gram positivas.

15 Pueden observarse ejemplos de infecciones bacterianas patógenas humanas, por ejemplo, en [http://en.wikipedia.org/wiki/Pathogenic\\_bacteria](http://en.wikipedia.org/wiki/Pathogenic_bacteria). Los ejemplos incluyen: vaginosis bacteriana, meningitis bacteriana, neumonía bacteriana, infecciones del tracto urinario, gastroenteritis bacteriana e infecciones bacterianas de la piel.

20 Las infecciones bacterianas comunes ocurren en la piel. Las bacterias como *Staphylococcus* o *Streptococcus* son parte de la flora humana normal y generalmente existen en la piel o en la nariz sin provocar enfermedades, pero potencialmente pueden provocar infecciones de la piel, neumonía, meningitis e incluso sepsis aguda, en dependencia de las condiciones de salud del huésped y otras circunstancias relacionadas. El impétigo y la erisipela son, por ejemplo, infecciones bacterianas comunes de la piel provocadas principalmente por *Staphylococcus aureus*, y a veces por *Streptococcus pyogenes*. La celulitis es una inflamación difusa del tejido conectivo con inflamación de las capas cutáneas y subcutáneas de la piel. La celulitis puede provocarse por la flora normal de la piel o por bacterias exógenas, y a menudo ocurre donde la piel se ha roto previamente, por ejemplo, grietas en la piel, cortes, ampollas, quemaduras, picaduras de insectos, heridas quirúrgicas, inyecciones intravenosas de drogas o sitios de inserción un de catéter intravenoso. La piel de la cara o la parte inferior de las piernas se afecta más comúnmente por esta infección. Las bacterias también provocan frecuentemente infecciones del tracto urinario (ITU) y el principal agente causal es *E. coli*.

30 Además, la gastroenteritis bacteriana y las infecciones relacionadas del sistema digestivo que se asocian con la ingesta de alimentos y bebidas, se provocan por bacterias entéricas patógenas que por lo general se distinguen de las bacterias generalmente inofensivas en la flora intestinal normal, aunque la distinción frecuentemente no es muy obvia. Nuevamente, *E. coli* frecuentemente es el agente causal en este grupo de bacterias patógenas infecciosas.

35 El cáncer que se tratará mediante la descripción puede ser de cualquier tipo de cáncer. Típicamente, las células cancerosas que se marcan son células que son susceptibles al péptido de tratamiento como se describe en la presente. Los presentes péptidos han mostrado actividad contra las células HeLa derivadas del cáncer cervical y las células HL60 derivadas de la leucemia promielocítica humana como se describe en la presente. Así, en un aspecto los péptidos pueden usarse para tratar el cáncer de cuello uterino o la leucemia promielocítica. Los ejemplos de cánceres incluyen, por ejemplo, tumores malignos epiteliales de ovario, cánceres de piel, cáncer de mama, cáncer de huesos, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de laringe, vesícula biliar, páncreas, recto, paratiroides, tiroides, suprarrenales, tejido neural, cabeza y cuello, estómago, colon, estómago, bronquios, riñones, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas de tipo ulcerante y papilar, carcinoma de piel metastásico, osteo sarcoma, sarcoma de Ewing, sarcoma de células veticulares, mieloma, tumor de células gigantes, tumor pulmonar de células pequeñas, cálculos biliares, tumor de células de los islotes, tumor cerebral primario, tumores linfocíticos y granulocíticos agudos y crónicos, leucemia de células pilosas, adenoma, hiperplasia, carcinoma medular, feocromocitoma, neuronas de la mucosa, ganglioneuomas intestinales, tumor del nervio corneal hiperplásico, tumor del hábito marfanoide, tumor de Wilm, seminoma, tumor de ovario, tumor de leiomiomater, displasia cervical y carcinoma *in situ*, neuroblastoma, retinoblastoma, sarcoma de tejido blando, carcinoide maligno, lesión cutánea tóxica, micosis fungoide, rbdomiosarcoma, sarcoma de Kaposi, sarcoma osteogénico y otros, hipercalcemia maligna, tumor de células renales, policitemia vera, adenocarcinoma, glioblastoma multiforme, leucemias, linfomas, melanomas malignos, carcinomas epidermoides y otros carcinomas y sarcomas. Otras afecciones cancerosas incluyen leucemia mielóide aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfoblástica crónica, enfermedad de Hodgkin y linfomas no Hodgkin.

Las vías de administración y los niveles de dosificación para su uso en los presentes métodos se describen más adelante.

60 En un aspecto, un péptido antibacteriano o antitumoral de la descripción puede usarse en combinación con uno o más de otros agentes activos, para tratar infección o cáncer. Esto se describe más abajo.

#### *Productos combinados y métodos*

65 Según lo anterior, un péptido de Fórmula I o II puede usarse en terapia en combinación con uno o más de otros fármacos. Por ejemplo, un péptido antibacteriano puede usarse en combinación con otros agentes antibacterianos tales como cualquiera de los descritos en la presente. Puede usarse un péptido antitumoral en combinación con otras terapias

anticancerígenas como cualquiera de las descritas en la presente. De manera similar, un péptido de Fórmula I o II puede usarse de manera no terapéutica como un agente antibacteriano en combinación con uno o más agentes diferentes, por ejemplo, en una composición antibacteriana o para el cuidado personal. Los Ejemplos de combinaciones se describen en la presente.

5

Los diversos ingredientes activos que son para uso combinado pueden administrarse simultáneamente, secuencialmente o por separado. Los fármacos o agentes pueden suministrarse en la misma composición, o en diferentes composiciones para uso combinado, por ejemplo, en forma de kit.

10

Por lo tanto, en un aspecto, la descripción se refiere a productos para uso combinado en el tratamiento o prevención de infección bacteriana, los productos que comprenden un péptido antibacteriano de Fórmula I o II y uno o más agentes antibacterianos para su administración por separado, secuencialmente o simultáneamente. La descripción se refiere además a productos para uso combinado en el tratamiento o prevención del cáncer, los productos que comprenden un péptido antitumoral de Fórmula I o II y uno o más agentes anticancerígenos para su administración por separado, secuencialmente o simultáneamente. La descripción proporciona además productos para uso antibacteriano no terapéutico combinado, los productos que comprenden un péptido antibacteriano de Fórmula I o II y uno o más agentes adicionales para su uso por separado, secuencialmente o simultáneamente.

15

20

Por lo tanto, los presentes péptidos antimicrobianos pueden usarse solos en formulaciones como el agente antimicrobiano único o principal, o en combinación con otros agentes. Sin desear limitarse a una teoría, se cree que los péptidos matan las bacterias mediante la ruptura de la membrana bacteriana. Este es un proceso único, diferente al de los antimicrobianos farmacéuticos tanto los que se conocen bien y los que se han desarrollado recientemente tales como, penicilina, metronidazol, tinidazol, cefamandol, latamoxef, cefoperazona, cefmenoxima y furazolidona. Cuando se combinan con otros antimicrobianos para tratar la infección bacteriana, los presentes péptidos pueden proporcionar efectos sinérgicos y, por lo tanto, pueden usarse dosis reducidas ya que tienen proporcionan diferentes mecanismos de tratamiento.

25

30

Para el cuidado personal general, las necesidades de eficacia antimicrobiana varían y los propósitos generalmente se asocian con la protección y la prevención. Generalmente no se requieren las mayores eficacias que se necesitan en el uso farmacéutico, y pueden usarse péptidos de eficacia antimicrobiana más baja. Por lo tanto, en las composiciones para el cuidado personal, como ingredientes, o como desinfectantes, los péptidos pueden formularse junto con otros antimicrobianos, que incluyen los naturales como el ácido láctico, el ácido cítrico, el ácido acético, y sus sales. Esta lista también se extiende a extractos de plantas y aceites vegetales con diversas actividades antimicrobianas, que incluyen aceite de canela, aceite de clavo, aceite de eucalipto, ajo, aceite de orégano, aceite de lavanda, aceite de leleshwa, aceite de limón, aceite de menta, aceite de neem, nigella sativa, aceite de menta, aceite de sándalo, sideritis, aceite de té, aceite de tomillo. Los fenoles y terpenos derivados de plantas se usan ampliamente como conservantes para alimentos y son atractivos como antimicrobianos para productos de cuidado personal. Sus usos combinados con péptidos en productos formulados ofrecen beneficios en sinergia y eficacia.

35

40

Los antimicrobianos activos sintéticos que se usan ampliamente en el cuidado personal y la limpieza general de la superficie son principalmente gluconato de clorhexidina (catiónico), yodo y yodóforos (que requieren estabilización con un polímero y tensioactivos no iónicos etoxilados para reducir la irritación del yodo), compuestos de amonio cuaternario (los que más se usan son los alquil cloruros de benzalconio) y triclosán (no iónico, fácil de formular con una variedad de tensioactivos). Los ingredientes sinérgicos inactivos o leves son agua, cocaminopropil betaína, propilenglicol, alantoína, cloruro de cetrimonio, cuaternio 12, óxido de cocaminopropilamina, diazolidinil urea, cuaternio 15, metil parabeno, propil parabeno, agente colorante, fragancia, TEA, ácido cítrico.

45

50

En vista de la toxicidad conocida y los efectos secundarios de tales antimicrobianos químicos, su uso reducido o reemplazo por péptidos antimicrobianos como los descritos en la presente descripción tiene beneficios para los usuarios y el medio ambiente.

55

Las terapias contra el cáncer que pueden usarse en combinación con los péptidos presentes incluyen cualquier tratamiento adecuado contra el cáncer, tal como quimioterapia o radioterapia. Los fármacos contra el cáncer incluyen, por ejemplo, cisplatino, a los que se hace referencia en la presente.

60

Como se describe en los presentes Ejemplos, los presentes péptidos pueden usarse en combinación con uno o más tensioactivos, particularmente en productos o composiciones que se destinan a la aplicación en la piel o el cabello. Se ha demostrado que varios tensioactivos mejoran el efecto antibacteriano de los presentes péptidos. Se ha demostrado que el polipéptido de superficie activa de la membrana del huevo Mx, por ejemplo, mejora la actividad antibacteriana de los péptidos, por ejemplo, los péptidos GO y G3 (Ejemplo 12), a pesar de una aparente falta de actividad antibacteriana para el polipéptido Mx cuando se usa solo. Por consiguiente, en un aspecto, la descripción proporciona productos para uso combinado en el tratamiento o prevención de infección bacteriana, los productos que comprenden un péptido antibacteriano de Fórmula I o II y uno o más tensioactivos para administración por separado, secuencialmente o simultáneamente. La descripción también proporciona productos para uso antibacteriano combinado no terapéutico, los productos que comprenden un péptido antibacteriano de Fórmula I o II y uno o más tensioactivos para uso por separado, secuencialmente o simultáneamente. Cuando los productos o composiciones se destinan a un uso biológico, el o los

65

tensioactivos son típicamente biocompatibles. En un aspecto, el o los tensioactivos comprenden el polipéptido Mx como se describe en la presente.

### *Composiciones*

- 5 En un aspecto, la descripción se refiere a composiciones que comprenden uno o más péptidos de Fórmula I o II del primer o segundo aspecto de la descripción.
- 10 Una composición puede ser una composición que contiene tensioactivo, o una composición que contiene conservantes como cualquiera de las descritas en la presente en relación con el uso de péptidos, que incluyen composiciones farmacéuticas y composiciones para el cuidado personal.
- Una composición de la descripción puede ser una composición antibacteriana.
- 15 La composición puede ser para uso no terapéutico (por ejemplo, un aerosol, gel o líquido desinfectante, para el lavado de manos, un enjuague bucal, un champú o una crema, pomada o aerosol cosmético) o puede ser una composición farmacéutica para uso terapéutico como se describe además en la presente descripción.
- 20 Por consiguiente, en un aspecto, la descripción proporciona además una composición antibacteriana que comprende un péptido de Fórmula I o II del primer o segundo aspecto de la descripción.
- La descripción también proporciona una composición para el cuidado personal que comprende un péptido de Fórmula I o II del primer o segundo aspecto de la descripción.
- 25 La descripción proporciona además una composición farmacéutica que comprende un péptido de Fórmula I o II del primer o segundo aspecto de la descripción o una sal farmacéuticamente aceptable de esta, en mezcla con uno o más excipientes, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
- 30 Una composición farmacéutica que comprende un péptido de Fórmula I o II puede ser una composición para tratar una infección bacteriana, o para tratar el cáncer, en la que el péptido es un ingrediente activo (antibacteriano o antitumoral). Sin embargo, como anteriormente, la descripción también se refiere a composiciones farmacéuticas en las que el péptido de Fórmula I o II no es un ingrediente activo, sino que actúa como un tensioactivo o conservante.
- 35 Una composición farmacéutica generalmente incluye al menos un ingrediente activo y un excipiente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, vehículo o diluyentes).
- Una composición para tratar una infección bacteriana, o para tratar el cáncer, que comprende un péptido de Fórmula I o II como ingrediente activo puede incluir adicionalmente uno o más de otros agentes activos, por ejemplo, uno o más de otros agentes antibacterianos, o uno o más otras terapias anticancerígenas.
- 40 Una composición de acuerdo con la descripción, como cualquiera de las descritas en la presente, puede comprender uno o más péptidos de Fórmula I o II del primer o segundo aspectos de la descripción y uno o más tensioactivos, por ejemplo, el polipéptido Mx.
- 45 Los excipientes farmacéuticamente aceptables útiles en los métodos descritos en la presente son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, por E. W. Martin, Mack Publishing Co, Easton, PA, 15a Edición (1975)), describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de los péptidos descritos en la presente.
- 50 Dichas preparaciones pueden contener habitualmente concentraciones farmacéuticamente aceptables de sales, agentes tampones, conservantes, antioxidantes, vehículos compatibles, y como anteriormente, otros agente terapéuticos opcionalmente.
- 55 Las formulaciones también pueden incluir antioxidantes y/o conservantes. Como antioxidantes pueden mencionarse tocoferoles, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, sales de ácido sulfuroso (por ejemplo, sulfato de sodio, bisulfito de sodio, bisulfito de sodio-acetona, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio, sulfoxilato de sodio-formaldehído, tiosulfato de sodio) y ácido nordihidroguaiarético. Los conservantes adecuados pueden ser, por ejemplo, fenol, clorobutanol, alcohol bencílico, metil parabeno, propil parabeno, cloruro de benzalconio y cloruro de cetilpiridinio.
- 60 Una composición farmacéutica puede tener varias formas diferentes en dependencia de, por ejemplo, cómo se administrará la composición.
- 65 Puede usarse cualquier vía de administración y/o medio de administración adecuado para administrar un péptido o una composición a un sujeto, por ejemplo, oral, parenteral, transdérmico, intradérmico, interarterial o intravenoso. La administración puede ser tópica. En un ejemplo, la administración puede ser mediante inyección o infusión intravenosa, interarterial o subcutánea, o mediante administración oral. En un ejemplo, el péptido puede administrarse en forma de un ácido nucleico que codifica el péptido. Los métodos para la administración de ácidos nucleicos se conocen en la técnica.

5 En un caso, una composición es para administración oral. Una formulación farmacéutica oral puede ser para administración repetida, por ejemplo, una al día, dos al día o una frecuencia mayor. Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, tabletas (también llamadas píldoras), polvos, y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se mezcla típicamente con al menos un excipiente o vehículo inerte, farmacéuticamente aceptable, tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o uno o más rellenos, extendedores, humectantes, adyuvantes de disolución, agentes iónicos de superficie activa. Los compuestos activos pueden estar además en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más excipientes.

10 Las formas de dosificación líquidas para la administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes que se usan comúnmente en la técnica, tales como agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes.

15 En un ejemplo, una composición puede ser para administración parenteral. Las preparaciones parenterales pueden administrarse por una o más vías, tales como intravenosa, subcutánea, intradérmica e infusión; un ejemplo particular es intravenoso. Una formulación descrita en la presente descripción pueden administrarse mediante el uso de una jeringa, inyector, émbolo para formulaciones sólidas, bomba, o cualquier otro dispositivo que se reconoce en la técnica para la administración parenteral.

20 Los niveles de dosificación reales del ingrediente activo (por ejemplo, un péptido) en las composiciones farmacéuticas pueden variarse para obtener una cantidad de ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica que se desea, para un sujeto, composición, y modo de administración particulares (a los que se hace referencia en la presente descripción como una "cantidad terapéuticamente eficaz").

25 El nivel de dosificación que se seleccione puede depender, por ejemplo, de la actividad del ingrediente activo particular, la gravedad de la afección que se trata y la afección y el historial médico previo del paciente que se trata. Sin embargo, dentro de la experiencia de la técnica está comenzar con dosis a niveles más bajos que los que se requieren para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logra el efecto deseado.

### 30 EJEMPLOS

Ahora se describirá la invención en mayor detalle con referencia a los siguientes ejemplos específicos.

#### 35 *Ejemplos 1 al 7*

#### Materiales y métodos

#### Síntesis y purificación de péptidos

40 Los aminoácidos protegidos (Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH Fmoc-Gly-OH), 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-hexafluorofosfato de tetrametiluronio (HBTU), 1-hidroxibenzotriazol anhidro (HOBt anhidro), diisopropil etilamina (DIEA) y resina de amida de Rink MBHA se adquirieron de GL Biochem (Shanghai) Ltd. y se usaron como se recibieron. Se obtuvieron otros reactivos y solventes de Sigma y se usaron sin purificación adicional a menos que se indique de cualquier otra manera. El diclorometano (DCM) y la dimetilformamida (DMF) se redistilaron y posteriormente se secaron con tamices moleculares antes de su uso. Los péptidos se sintetizaron mediante el uso de una forma de estrategia de fase sólida Fmoc estándar en un sintetizador de microondas comercial CEM Liberty. Se usó la resina de amida de Rink MBHA (0,83 mmol/g) como soporte para permitir que se amidara el extremo C-terminal. La escisión de la resina y la desprotección de la cadena lateral se llevaron a cabo mediante el uso de una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA), agua, triisopropilsilano (TIS) (95: 2,5: 2,5 volumen/volumen) durante 3 h a temperatura ambiente. Los péptidos crudos se lavaron repetidamente con éter etílico frío al menos ocho veces y después se purificaron mediante HPLC-RP (> 95 %).

55 Se confirmaron las identidades de los péptidos resultantes mediante análisis de masas MALDI-TOF. Para el análisis de masas MALDI-TOF, las mediciones se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas de desorción/ionización por láser asistido por matriz Bruker Biflex III (MALDI-TOF) equipado con un láser de nitrógeno de 337 nm y se usó ácido 4-hidroxialfa-cianocinámico como matriz. La muestra se disolvió con la matriz en la mezcla de acetonitrilo y agua (1:1, volumen/volumen) que contenía ácido trifluoroacético al 1 %. Se colocaron alrededor de 0,5 µl de la solución de la muestra en una placa de muestra de metal y después se dejaron secar al aire a la temperatura ambiente de alrededor de 20 °C. Los espectros de masas se adquirieron en modo lineal positivo y se usó un voltaje de aceleración de 19 kV. La calibración de masas externa se realizó mediante el uso de una mezcla de péptidos estándar y la potencia del láser se ajustó cerca del umbral de ionización. Generalmente se adquirieron y promediaron 100 pulsos.

60 El G(IKK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> marcado con FITC en el extremo N-terminal se sintetizó también por el método de fase sólida como se informó en Julian y otros 2009. Debido a que se cree que puede ocurrir degradación durante el último proceso de escisión en un entorno ácido por un mecanismo similar a la degradación de Edman inducida por feniltioisocianato y producir fluoresceín tiohidantoína (FTH) cuando se une directamente el FITC en la amina N-terminal de los péptidos anclados, introdujimos ácido 6-aminohexanoico (Ahx) entre el último aminoácido y el enlace de tiourea que se genera a través de la

reacción de isotiocianato y amina. Los procedimientos detallados fueron los siguientes: en primer lugar, se sintetizó el Ahx-G(IKK)<sub>3</sub>I-resion en el sintetizador de microondas que toma el Fmoc-Ahx como aminoácido junto con el aminoácido N-terminal. La porción de fluoresceína (FI) se unió mediante el tratamiento de un Ahx-G(IKK)<sub>3</sub>I (0,25 mmol) unido a resina con FITC (1,0 mM) y diisopropil etil amina (DIEA, 5 mM) en 10 ml de DMF durante 24 h con exclusión de la luz. Se usó la prueba de ninhidrina para verificar la finalización de la reacción. Las moléculas de FITC sin reaccionar se extrajeron mediante un filtro y se lavaron repetidamente con DCM hasta que el filtrado se volvió transparente. Los péptidos marcados con FITC se escindieron de la resina mediante el uso de TFA/TIS 95:5 durante 3 h a temperatura ambiente. La purificación del producto crudo fue similar.

10 Determinación de la actividad superficial y la penetración en monocapas lipídicas

Este experimento se realizó mediante la aplicación de la medición de la tensión superficial desde un Langmuir a una placa de pocillos, donde cada pocillo contenía 350 µl de solución tampón Tris 10 mM (que también contenía NaCl 154 mM). El lípido (DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina) o DPPG (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-glicerol) se cargó tras dejar caer cuidadosamente una pequeña gota de solución de cloroformo con la tensión superficial equilibrada que se controló inicialmente a 30 mN/m. Después se añadió la solución del péptido para alcanzar una concentración final de 3 µM, seguido de la posterior monitorización de la tensión superficial contra el tiempo.

20 Espectroscopía de dicroísmo circular (CD)

Los espectros de CD se midieron en un espectrómetro Bio-Logic MOS 450 mediante el uso de una celda de cuarzo de 1 mm de longitud de trayectoria. Los espectros se registraron de 190-250 nm a una velocidad de exploración de 50 nm/min. Los péptidos se disolvieron en agua y se prepararon diferentes vesículas unilamelares pequeñas (SUV) de fosfolípidos en tampón tris-HCl 10 mM (pH 7,4). En todas las pruebas, las concentraciones de péptidos se fijaron a 0,1 mM. Los espectros de línea de base para cada solvente se obtuvieron de antemano. Se promediaron tres exploraciones para mejorar la relación señal/ruido. Todas las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente y los datos de CD se expresaron como elipticidad molar residual media.

30 Preparación de las SUV de fosfolípidos

Se prepararon dos vesículas unilamelares pequeñas (SUV) de diferentes composiciones de fosfolípidos, DPPC o DPPG, mediante tratamiento ultrasónico. Típicamente, los lípidos secos se disolvieron en cloroformo en un recipiente pequeño de vidrio y los solventes se eliminaron mediante evaporación al vacío durante la noche para formar una película delgada en la pared del recipiente de vidrio. Las películas finas secas se rehidrataron en tampón Tris 10 mM (Debido a la interferencia para la señal de CD de Cl<sup>-</sup>, usamos una pequeña cantidad de HF en lugar de HCl para modular el pH del tampón Tris a 7,4) mediante la mezcla en agitador y las dispersiones de lípidos se sonicaron en agua helada durante 10 minutos con un ultrasonido con punta de titanio hasta que la solución se volvió transparente.

40 Ensayo antimicrobiano

Para determinar la actividad antibacteriana de los péptidos, se construyeron curvas de tasa de supervivencia. Las bacterias (*E.coli* DH5α o *B. subtilis* 168) se incubaron con péptido a concentraciones variables del péptido a 37 °C durante 1 h. Se extrajeron alícuotas de 2 µl, se diluyeron y se extendieron sobre placas de agar. Después de la incubación durante la noche a 37 °C, las bacterias supervivientes se expresaron como el porcentaje de células totales y se trazaron curvas de supervivencia (Figura 4). Los controles fueron bacterias sin péptido.

Las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) de cada péptido se midieron por el método estándar de microdilución. La prueba se realizó en placas estériles de 96 pocillos en un volumen final de 200 µl. Se añadieron alícuotas (100 µl) de una suspensión bacteriana a  $1 \times 10^5$  (unidades formadoras de colonias (CFU)/ml) en medio de cultivo a 100 µl de la solución del péptido (diluciones seriadas dobles en tampón PBS 10 mM). Después de la incubación durante 18-24 h a 37 °C, se evaluó la inhibición del crecimiento bacteriano mediante la medición de la absorbancia a 600 nm con un lector de microplacas de ELISA. La MIC se definió como la concentración más baja de péptido para la cual no hubo crecimiento visible. Cada determinación se realizó al menos tres veces.

55 Actividad antitumoral

Las actividades antitumorales de los péptidos se midieron mediante el uso del ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,-difenil tetrazolio bromuro (MTT) y el valor de IC<sub>50</sub> se calculó como la concentración de péptido que indujo una inhibición del crecimiento del 50 % en comparación con el control no tratado.

Las células HeLa y HL60 se cultivaron en placas de 96 pocillos (10<sup>5</sup> células/pocillo) en un medio completo [medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM)] con suero fetal bovino (FBS) al 10 % durante 24 h antes del tratamiento con el péptido. Al día siguiente, las células se trataron con péptidos, para dar concentraciones finales de 50, 25, 12,5, 6 y 3 µM, y se incubaron durante 24 h más. Después de la incubación con péptidos, se añadieron a cada pocillo 20 µl de una solución de 5 mg/ml del reactivo MTT y se incubaron durante 4 h a 37 °C. Después de extraer el sobrenadante, se añadieron 150 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver los cristales de formazán que quedaron en los pocillos. Se

determinó la absorbancia mediante el uso de un lector de microplaca de ELISA a 570 nm. Los pocillos sin células para calibrar el espectrofotómetro y las células sin péptidos se tomaron como controles negativos.

Actividad hemolítica

5 Las actividades hemolíticas de los péptidos se midieron mediante la determinación de la liberación de hemoglobina mediante suspensiones de eritrocitos humanos frescos al 4 % (volumen/volumen) a 540 nm. Los glóbulos rojos humanos frescos (hRBC) se centrifugaron y se lavaron tres veces con PBS (pH 7,4). Se mezclaron 100 µl de hRBC suspendidos en PBS al 8 % (volumen/volumen) con 100 µl de diferentes series de péptidos que se diluyeron dos veces en una placa estéril de 96 pocillos. Las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C y se centrifugaron a 1000 g durante 5 min. Se transfirieron alícuotas de 100 µl del sobrenadante a nuevas placas de 96 pocillos, y se monitorizó la liberación de hemoglobina mediante la medición de la absorbancia del sobrenadante a 540 nm con un Lector de microplacas de ELISA. Como controles negativos y positivos, se emplearon hRBC en PBS y Triton X-100 al 0,1 %. Se calculó el porcentaje de hemólisis mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$15 \quad \% \text{ de hemólisis} = \frac{(\text{Abs}_{540\text{nm}} \text{ con péptido} - \text{Abs}_{540\text{nm}} \text{ en PBS})}{[(\text{Abs}_{540\text{nm}} \text{ con Tritón X-100 } 0,1 \% - \text{Abs}_{540\text{nm}} \text{ en PBS})] \times 100}$$

Observación de la lisis de la membrana bacteriana mediante microscopía de fluorescencia

20 Se incubó el péptido G(IKK)<sub>3</sub>I-NH<sub>2</sub> a su MIC con las bacterias *E. coli* o *B. subtilis* durante 1 h, seguido de incubación con los colorantes DAPI (4',6-Diamidino-2-Fenilindol) y FITC (isotiocianato de fluoresceína). Los sistemas se observaron mediante microscopía de fluorescencia. El FITC solo puede entrar a las células permeables con daños en la membrana.

25 Observación de la lisis de la membrana bacteriana mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

El Péptido G(IKK)<sub>3</sub>I-NH<sub>2</sub> a su MIC se incubó con las bacterias *E. coli* o *B. subtilis* durante 1h. Después de la fijación con aldehído al 2,5 %, la deshidratación en gradiente, el secado por punto crítico y la pulverización con oro, se tomaron imágenes de SEM de estas muestras.

30 Evaluación del daño de la membrana celular en células HeLa mediante la determinación de la fuga de calceína

35 Las células HeLa se tiñeron primero mediante incubación con el colorante calceína-AM (calceín acetoximetil éster). Después se añadió el péptido 0,1 mM durante 30 minutos, 1 hora y 2 horas. Se extrajo la solución transparente superior y se midió la intensidad de fluorescencia residual del cuerpo celular (el control negativo fue con PBS y el control positivo fue con Triton X100 0,1 % para proporcionar 0 y 100 % de liberación respectivamente).

En condiciones similares, se usaron ensayos de MTT para verificar la viabilidad celular de modo que la extensión del daño de la membrana celular pueda vincularse con la viabilidad celular.

40 Evaluación del daño de la membrana celular y la ruptura celular en células HeLa mediante SEM

Las células HeLa se incubaron en G(IKK)<sub>3</sub>I-NH<sub>2</sub> 10 µM durante 24 h. Después de la fijación, la deshidratación en gradiente, el secado por punto crítico y la pulverización con oro, se tomaron imágenes de SEM.

45 Selectividad de G(IKK)<sub>3</sub>I-NH<sub>2</sub>

50 Para verificar adicionalmente la citotoxicidad selectiva de G(IKK)<sub>3</sub>I-NH<sub>2</sub> *in vitro*, añadimos el G(IKK)<sub>3</sub>I-NH<sub>2</sub> marcado con FITC a los dos sistemas de cocultivo que contienen la línea celular de mamíferos NIH 3T3 (huésped modelo) y la bacteria *B. subtilis* 168 o la línea de células cancerosas (HL 60). Específicamente, las células NIH 3T3 se cultivaron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> en IMDM suplementado con FBS al 10 %. Después de alcanzar una confluencia superior al 80 %, las células se transfirieron a una placa de 6 pocillos que contenía cubreobjetos estériles en el fondo hasta una concentración final de 1 × 10<sup>5</sup> células/pocillo. Después de un cultivo de una noche a 37 °C, se reemplazó el medio con 1 ml de *B. subtilis* 168 suspendido en PBS con una densidad de 1 × 10<sup>8</sup> CFU/ml o 1 ml de células HL 60 suspendidas en PBS con una densidad de 1 × 10<sup>5</sup> células/ml. Mientras tanto, el G(IKK)<sub>3</sub>I-NH<sub>2</sub> marcado con FITC que se disolvió en el mismo tampón también se añadió a cada pocillo a la concentración final de 20 µM. Después de la incubación a 37 °C durante 1 h, el sobrenadante que contiene bacterias o células HL 60 se separó de las células adherentes y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Tanto las células como las bacterias se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con glutaraldehído al 2,5 % durante 1 hora a temperatura ambiente, por separado. Finalmente, se colocaron 20 µl de las suspensiones de bacterias o de células HL 60 sobre el cubreobjetos y se observó la localización del G(IKK)<sub>3</sub>I-NH<sub>2</sub> marcado con FITC mediante un microscopio de fluorescencia Nikon TS100-F equipado con un lente de inmersión en aceite.

Resultados

65 Ejemplo 1 - Diseño, síntesis y propiedades físicas de una serie de péptidos catiónicos

Se diseñaron nueve péptidos (Hélice-1 a Hélice-9) como se enumera en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Lista de péptidos antibacterianos que se estudiaron

| Código    | Secuencia                                  | Núm. de aminoácidos | Cargas catiónicas | Estimaciones de longitudes de cadenas completamente estiradas/Å |
|-----------|--|---------------------|-------------------|---|
| Hélice-1  | G(IIKK)I-NH <sub>2</sub>                   | 6                   | 3                 | 20  |
| Hélice-2  | G(IIKK) <sub>2</sub> I-NH <sub>2</sub>     | 10                  | 5                 | 30  |
| Hélice-3  | G(IIKK) <sub>3</sub> I-NH <sub>2</sub>     | 14                  | 7                 | 42  |
| Hélice-4  | G(IIKK) <sub>4</sub> I-NH <sub>2</sub>     | 18                  | 9                 | 54  |
| Hélice-5  | G((LLKK) <sub>3</sub> L-NH <sub>2</sub>    | 14                  | 7                 | 42  |
| Hélice-6  | G(VVKK) <sub>3</sub> V-NH <sub>2</sub>     | 14                  | 7                 | 42  |
| Hélice-7* | G(IIOO) <sub>3</sub> I-NH <sub>2</sub>     | 14                  | 7                 | 42  |
| Hélice-8  | GKI(KKII) <sub>2</sub> KII-NH <sub>2</sub> | 14                  | 7                 | 42  |
| Hélice-9  | GIK(KKII) <sub>2</sub> KII-NH <sub>2</sub> | 14                  | 7                 | 42  |

\*O en Hélice-7 es ornitina (Orn), un aminoácido catiónico como se describe en la presente descripción.

Los péptidos se sintetizaron mediante síntesis de péptidos en fase sólida en resina de amida de Rink MBHA como en los Materiales y Métodos, y todos se purificaron hasta > 95 % de homogeneidad.

Todos los péptidos estaban cubiertos con Gly en el extremo N-terminal y amidación en el extremo C-terminal, lo que se creía que no solo proporcionaban resistencia a las peptidasas, sino que también favorecía el enlace de hidrógeno  $\alpha$ -helicoidal (Tossi y otros 1997; Tossi y otros 2000). En los péptidos, el C terminal izquierdo está desbloqueado, por lo tanto con 1 carga catiónica. En la presente descripción, el bloqueo del extremo derecho NH<sub>2</sub> puede abreviarse, por ejemplo, G(IIOO)<sub>3</sub>I-NH<sub>2</sub> puede escribirse como G(IIOO)<sub>3</sub>I. La masa molecular (MW) de cada péptido se confirmó mediante MALDI-ToF MS (Tabla 2 a continuación).

Tabla 2. Las masas de los péptidos sintéticos que se usaron

| Péptidos                                   | Mw Teórico | MW reales/[M ± H] |
|--|------------|-------------------|
| G(IIKK)I-NH <sub>2</sub>                   | 669,9      | 670,5             |
| G(IIKK) <sub>2</sub> I-NH <sub>2</sub>     | 1152,6     | 1153,2            |
| G(IIKK) <sub>3</sub> I-NH <sub>2</sub>     | 1635,2     | 1635,6            |
| G(IIKK) <sub>4</sub> I-NH <sub>2</sub>     | 2117,9     | 2117,9            |
| G((LLKK) <sub>3</sub> L-NH <sub>2</sub>    | 1635,2     | 1635,5            |
| G(VVKK) <sub>3</sub> V-NH <sub>2</sub>     | 1537,1     | 1537,5            |
| G(IIOO) <sub>3</sub> I-NH <sub>2</sub>     | 1550,1     | 1551,5            |
| GKI(KKII) <sub>2</sub> KII-NH <sub>2</sub> | 1635,2     | 1635,1            |
| GIK(KKII) <sub>2</sub> KII-NH <sub>2</sub> | 1635,2     | 1635,1            |

Ninguna de las muestras estudiadas tenía picos que indicaran la presencia de impurezas.

Se realizó una proyección de la rueda de Schiffer-Edmundson de los péptidos helicoidales 2, 3, 4, 8 y 9 (Figura 1).

5 Se examinaron los péptidos helicoidales 1-4 (el  $G(IKK)_nI-NH_2$ ,  $n =$  series 1-4) para determinar la actividad superficial y la penetración en monocapas lipídicas (DPPC o DPPG), como se describe en Materiales y Métodos. Como se muestra en la Figura 2, los péptidos interactúan más fuertemente con el DPPG cargado negativamente que el DPPC zwitteriónico, lo que resulta en un mayor aumento de la tensión superficial.

10 La espectroscopía de dicroísmo circular (CD) se usó para evaluar las estructuras plegadas de los péptidos 1-4 en solución acuosa y en vesículas lipídicas miméticas de membrana (DPPC o DPPG) como en los Materiales y Métodos.

15 Los péptidos se desplegaron en la solución acuosa (Figura 3A) debido al enlace de hidrógeno intermolecular considerable entre las cadenas peptídicas y las moléculas de disolvente y también a la repulsión catiónica intramolecular entre los residuos de lisina vecinos. En las SUV de DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina) zwitteriónico, que imitan las membranas normales de la célula huésped de mamífero, todos los péptidos permanecieron sin estructurar (Figura 3B).

20 En los DPPG (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol) cargados negativamente, pequeñas vesículas unilamelares (SUV) que imitan las membranas de células tumorales y bacterianas, todos los péptidos excepto  $G(IKK)I-NH_2$  adoptaron la estructura típica de hélice  $\alpha$ , con valores mínimos medios de elipticidad molar residual a 208 y 222 nm (Figura 3C). Por lo tanto, hay un cambio estructural claro que se debe a la interacción con las vesículas lipídicas.

25 Todos los demás péptidos helicoidales que se estudiaron mostraron respuestas estructurales similares tras la exposición a las dos SUV lipídicas. Se encontró que la propensión a formar una estructura helicoidal aumenta con la longitud del péptido.

30 Por lo tanto, las mediciones de CD revelaron no solo la delicada interacción entre el efecto hidrofóbico, la interacción de carga y el enlace de hidrógeno crucial para la formación de la hélice, sino también las bases moleculares de la selectividad peptídica entre las diferentes membranas celulares.

Ejemplo 2 - Evaluación de la actividad antimicrobiana de los péptidos

35 Las actividades antimicrobianas de los péptidos se midieron contra Gramnegativas *Escherichia coli* (*E. coli* DH 5  $\alpha$ ) y Gram-positivas *Bacillus subtilis* (*B. subtilis* 168).

Se construyeron curvas de tasa de supervivencia para los péptidos 1-4 como en los Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la Figura 4.

40 Se determinaron los valores de MIC (concentración inhibitoria mínima: la concentración más baja de péptido/fármaco que inhibe el crecimiento bacteriano) para cada uno de los péptidos 1-9, también como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la Tabla 3 (Figura 7) con los resultados de dos péptidos antibacterianos naturales (magainina-2 y melitina), antibiótico ampicilina, y el fármaco anticancerígeno cisplatino que se citan para comparación.

45 El  $G(IKK)I-NH_2$  tiene la actividad más débil y no mostró mucho efecto antimicrobiano incluso hasta la concentración de 1 mM, consistente con su corta longitud ( $n = 1$ ) y la falta de respuestas estructurales. La actividad bactericida aumentó significativamente con el aumento de la longitud del péptido o la unidad de repetición, de acuerdo con la estructura helicoidal mejorada, la anfipaticidad y la cationicidad.

50 El  $G(IKK)_3I-NH_2$  y el  $G(IKK)_4I-NH_2$  son particularmente efectivos contra ambas bacterias, con MIC en el rango de 0,5-8  $\mu$ M. Estos valores de MIC son altamente comparables a los de la melitina y la ampicilina con MIC de alrededor de 2-10  $\mu$ M, lo que los hace tan potentes como muchos AMP naturales y antibióticos comerciales (Dathe y otros 2001, Cruciani y otros 1991, Wieprecht y otros 1997, Asthana y otros 2004, Greenwood y otros 1970). Los péptidos diseñados son más efectivos contra la Gram-positiva *B. subtilis* que la Gram-negativa *E. coli*. Esta tendencia es similar a la Melitina y la Ampicilina pero los péptidos diseñados son más efectivos.

55 Ejemplo 3 - Evaluación de la actividad antitumoral de los péptidos

60 La actividad antitumoral de los péptidos se midió en líneas celulares de cáncer HeLa y HL60, como se describe en los Materiales y Métodos. En la Figura 5 se muestran las curvas de tasa de supervivencia para los péptidos 1-4. Los valores de  $IC_{50}$  (concentración de péptido que provoca el 50 % de inhibición del crecimiento de células tumorales) para los péptidos 1-9 se muestran en la Tabla 3 (Figura 7) con resultados para dos péptidos antibacterianos naturales (magainina-2 y melitina), el antibiótico ampicilina y el fármaco anticancerígeno cisplatino que se citan para comparación.

65 Los péptidos muestran altas actividades contra las células tumorales. Los resultados antitumorales que se evaluaron de las líneas celulares de cáncer HeLa y HL60 muestran una tendencia similar a las actividades antibacterianas con el aumento de la potencia con la  $n$  en la serie  $G(IKK)_nI-NH_2$ ,  $n = 1-4$  (Figura 7 (Tabla 3)).

El G(IKK)<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub> tiene la actividad más débil y no mostró mucho efecto antitumoral incluso hasta la concentración de 1 mM, consistente con su corta longitud (n = 1) y la falta de respuestas estructurales.

El G(IKK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>, el G(IKK)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>, GKI (KKII)<sub>2</sub>KII-NH<sub>2</sub> y G(IIOO)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> muestran alta potencia contra ambos tipos de líneas celulares de cáncer, con valores de IC<sub>50</sub> en el rango de 4-25 μM (Figura 7 (Tabla 3)). Las actividades de G(IKK)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> y G(IIOO)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> contra las células HeLa son comparables al cisplatino, uno de los agentes quimioterapéuticos que más se usan y potentes contra el cáncer (Takara y otros 2006).

Ejemplo 4 - Evaluación de la actividad hemolítica de los péptidos en glóbulos rojos humanos

Se evaluó la toxicidad de los péptidos contra las células huésped normales mediante la evaluación de la actividad hemolítica en los glóbulos rojos humanos.

La actividad hemolítica se determinó mediante el uso de glóbulos rojos humanos frescos (hRBC) como se describe en los Materiales y Métodos. Las curvas de dosis-respuesta para las actividades hemolíticas de los péptidos 1-5 y 8 se muestran en la Figura 6. Los valores de EC<sub>50</sub> (concentración que provoca el 50% de lisis de eritrocitos) para los péptidos 1-9 se muestran en la Figura 7 (Tabla 3), con resultados para dos péptidos antibacterianos naturales (magainina-2 y melitina), el antibiótico ampicilina y fármaco anticancerígeno cisplatino que se citan para comparación.

La tendencia general es similar a la que se encuentra en las actividades antimicrobianas y antitumorales, es decir, la potencia aumenta con el aumento de n en las series G(IKK)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, n = 1-4. Sin embargo, de manera importante, sobre los rangos de concentraciones activas contra bacterias y células cancerosas, hay poca actividad o toxicidad contra los hRBC. Esta característica es importante para la aplicación terapéutica de los péptidos.

Específicamente, los dos péptidos cortos G(IKK)<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub> y G(IKK)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> son inactivos hasta 250 μM. Aunque el péptido G(IKK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> mostró cierta actividad hemolítica, solo provocó menos del 10 % de hemólisis de eritrocitos a 10 veces la MIC (80 μM) contra *E. coli* y muy poca hemólisis a 10 veces la MIC (20 μM) contra *B. subtilis*. El G(IKK)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> tuvo la mayor actividad hemolítica en las series G(IKK)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub> n = 1-4 estudiadas, lo que produce ~el 25 % de lisis de eritrocitos a 10 veces la MIC (20 μM) contra *E. coli*. En general, el G(IKK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> ofrece una selectividad óptima contra bacterias y células cancerosas mientras que su toxicidad para los hRBC se mantuvo baja, lo que refleja el equilibrio de los efectos de la longitud del péptido. La desestabilización de la superficie helicoidal hidrofóbica cuando se usa GKI(KKII)<sub>2</sub>KII-NH<sub>2</sub> condujo a la mejora en la hemólisis con actividades antibacterianas similares, particularmente contra el rendimiento de G(IKK)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>. El G(IIOO)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> mostró la mejor selectividad, evidente a partir de las MIC más bajas y la IC<sub>50</sub> más baja con la EC<sub>50</sub> más alta entre los mejores resultados.

Ejemplo 5 - Examen del mecanismo antibacteriano

La lisis de membrana en las células de *E. coli* y *B. subtilis*, en presencia de G(IKK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>, se observó mediante microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido (SEM) como se describe en los Materiales y Métodos.

Los resultados se muestran en las Figuras 8 (fluorescencia) y 9 (SEM). El colorante fluorescente puede observarse en las células bacterianas después de la incubación con los péptidos, lo que indica daños en la membrana que conducen a la ruptura celular.

Ejemplo 6 - Examen del mecanismo antitumoral

El daño de la membrana celular en las células HeLa en presencia de los péptidos 1-4 se determinó mediante la medición de la fuga de calceína, como se describe en los Materiales y Métodos. Los ensayos de MTT se llevaron a cabo en las mismas condiciones que se describen en la presente, de modo que el grado de daño de la membrana podría compararse con la viabilidad celular. Los resultados se muestran en la Figura 10.

El daño de la membrana y la ruptura celular en células HeLa en presencia de G(IKK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> también se evaluó mediante SEM como se describe en la presente descripción. Los resultados se encuentran en la Figura 11, que ilustra la fusión de la membrana (B), el daño local de la membrana (C) y la apoptosis (D).

Ejemplo 7 - Cocultivo para determinar la selectividad celular de los péptidos

Para confirmar aún más las respuestas selectivas y la citotoxicidad de los péptidos, se sintetizó el G(IKK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> marcado con FITC de acuerdo con el método descrito anteriormente por Jullian M, y otros (Julian y otros 2009). El péptido marcado se añadió a dos sistemas de cocultivo que contienen ambas bacterias (*B. subtilis* 168) o células cancerosas HL60 y células modelo de mamífero huésped (NIH 3T3) (véase Materiales y Métodos). Después de la incubación durante 1 hora, se observó la distribución de FITC-G(IKK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> mediante el uso de microscopía de fluorescencia y los resultados se muestran en la Figura 12. En las imágenes, las células adherentes son NIH 3T3, las células en forma de barra son *B. subtilis* y las células redondeadas en suspensión son HL60, que se señalan con flechas negras.

Como se muestra, la fluorescencia verde de FITC-G(IKK)<sub>3</sub>I-NH<sub>2</sub> se concentró en los grupos bacterianos o en las células HL60 pero no en ninguna parte de las células 3T3. Esto confirma además que el G(IKK)<sub>3</sub>I-NH<sub>2</sub> muestra respuestas rápidas y un reconocimiento altamente efectivo de las bacterias patógenas y las células tumorales en el medio del cocultivo, sin unión o asociación con las células huésped modelo. Dicho sistema de cocultivo puede imitar el medio infectado *in vivo* mejor que los ensayos paralelos que se usan comúnmente.

#### Ejemplos 8 al 14

Se realizaron investigaciones adicionales sobre los efectos de los tensioactivos y polímeros como aditivos sobre las actividades antibacterianas de los péptidos de la presente descripción y sus toxicidades para las células de fibroblastos dérmicos humanos. Dichos péptidos antibacterianos tienen aplicaciones en diversas áreas, que incluyen una gama de productos para el cuidado personal.

Los tensioactivos y los polímeros de superficie activa son necesarios en casi todas las formulaciones de productos, que incluyen el cuidado de la piel y el cabello, y muchas formulaciones farmacéuticas. Sus funciones son variadas, desde ayudar a dispersar los ingredientes activos y proporcionar estabilización del sistema hasta mejorar el rendimiento del producto. Sin embargo, la adición de especies de superficie activa puede alterar el rendimiento antibacteriano de los péptidos de diseño corto. Por lo tanto, es útil evaluar la compatibilidad de la formulación. La superficie activa o actividad de superficie en este trabajo se refiere a la capacidad del tensioactivo o polímero para reducir la tensión superficial, que posee la capacidad de adsorberse en la interfaz o reemplazar otras especies de superficie activa que ya se han adsorbido en la interfaz. Por otro lado, la configuración experimental actual también proporciona una evaluación sistemática de la biocompatibilidad de los sistemas que contienen tensioactivos y polímeros de superficie activa.

#### Materiales

Péptidos: Una lista de péptidos antibacterianos de diseño corto que se investigaron:

G2 = G(IKK)<sub>2</sub>I - NH<sub>2</sub> (helix-2);

30 G3 = G(IKK)<sub>3</sub>I - NH<sub>2</sub> (helix-3);

G4 = G(IKK)<sub>4</sub>I - NH<sub>2</sub> (helix-4);

35 GO = G(IIO)<sub>3</sub>I - NH<sub>2</sub> (helix-7);

GKI = GKI(KKII)<sub>2</sub>KII - NH<sub>2</sub> (helix-8);

GIK = GIK(KKII)<sub>2</sub>KII - NH<sub>2</sub> (helix-9);

40 GL = G(LLKK)<sub>3</sub>L - NH<sub>2</sub> (helix-5).

Células mamíferas: Las principales células de la piel humana que se usaron fueron las células de fibroblastos, Neonatales (HDFn) y Adultas (HDFa) que se obtuvieron de Invitrogen. En casi todos estos estudios, se realizaron mediciones paralelas mediante el uso de la línea celular de fibroblastos 3T3 para comparación directa. El medio que se usó fue M106 suplementado con un suplemento de crecimiento sérico bajo (LSGS), los antibióticos amoxicilina y penicilina. El MTT (Bromuro de Tetrazolio Azul de Tiazolilo) que se usó en este experimento para la evaluación de la viabilidad se adquirió de SIGMA Catálogo núm.: M565.

50 Bacterias: los principales microorganismos que se usaron en esta investigación fueron la Gram-negativa *Escherichia coli* o *E. coli*, (EC) y la cepa de bacterias grampositivas *Staphylococcus aureus* o *S. aureus*, (SA). Se incubaron en medio LB (Luria-Bertani).

Tensioactivos: La mayoría de los productos cosméticos contienen ingredientes que incluyen tensioactivos, espesantes y agentes espumantes. Aquí hemos evaluado varios tensioactivos para investigar su influencia sobre el efecto antibacteriano y la citotoxicidad para las células humanas. Los tensioactivos que se investigaron fueron tensioactivos catiónicos (Bromuro de dodecil trimetilamonio, C12TAB), aniónicos (Dodecil sulfato de sodio, SDS) y no iónicos (Pentaetilenglicol monododecil éter, C12E5; Hexaetilenglicol monododecil éter, C12E6), polímeros no iónicos (PLURONIC; Copolímero P123 de Bloque de Óxido de Etileno/Óxido de Propileno disponible comercialmente, copolímero tribloque F127 fabricado por BASF Corporation) y una mezcla comercial de tensioactivos (antibacteriano para el lavado de las manos BYOTROL). Algunos ingredientes cosméticos comunes que se incluyen en la investigación fueron las etanolaminas de cocamida (CMEA, un agente espumante blanco lechoso, COMPERLAN 100); cocamidopropyl aetaine (Tt, un detergente anfotérico, TEGO BETAINE); lauril éter sulfato de sodio (SLES, un agente espumante y detergente, TEXAPON N 701).

65 Los polipéptidos nuevos que se evaluaron se derivaron de membranas de cáscara de huevo, uno de peso molecular pequeño (SL, con distribución de peso molecular centrada de alrededor de 5-10 kDa) y uno de una mezcla de peso molecular alto (Mx, con distribución de peso molecular centrada alrededor de 30 -40 kDa). Además, se obtuvo un péptido

natural adicional a partir de capullos de gusano de seda con una distribución de peso molecular de más de 10 kDa. Todos estos péptidos fueron, por lo tanto, polímeros altamente mezclados y fueron solubles en agua en condiciones fisiológicas que se evaluaron. En aras de la claridad, estos péptidos se denominan polipéptidos.

5 Ensayo de MTT: La viabilidad y proliferación celular se evalúa ampliamente mediante el ensayo de MTT como ya se describió anteriormente.

10 RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Inversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real): Para determinar las actividades que se relacionan con la transcripción de genes sobre la apoptosis de las células HeLa y los efectos inmunológicos de los linfocitos, se realizaron ensayos de RT-PCR. Brevemente, las células HeLa se incubaron con G(IKK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> 10 μM para diferentes intervalos de tiempo (1, 3, 6 y 12 h) y los linfocitos se incubaron con G(IKK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> 10 μM durante 1 h. Se extrajo el ARN total de las células mediante Trizol, se siguieron las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Gran Bretaña). El ARN total (1 μg) se sometió a síntesis de ADNc con cebadores aleatorios (PrimeScript Reverse Transcriptase, Takara, Japón). El PCR en tiempo real se realizó con el kit SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Estados Unidos) mediante el uso de un sistema de PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems, Estados Unidos) de acuerdo con el protocolo del fabricante, y los datos se analizaron mediante el método de la cuantificación relativa de los 2<sup>-ΔΔCt</sup>. Los niveles de transcripción de genes relacionados se normalizaron a los valores del gen centinela β-actina. Se usaron los siguientes cebadores: sentido de β-actina: 5'-ATGCCAGGGTACATGGTGGT-3', antisentido: 5'-TCGTGCGTGACATTAAGGAG-3'; sentido de la aspasa-8: 5'-ATGGACTTCAGCA GAAATCTT-3', antisentido: 5'-CATGTCATCATCCAGTTTGC-3'; sentido fas: 5'-ATTATCGTCCAAAAGTGTTA-3', antisentido: 5'-TCACACAATCTACATCTT CTG-3'; sentido literal: 5'-ATGCAGCAGCCCTTCAATTAC-3', antisentido: 5'-CAATCCTACCAAGGCAACC-3'; sentido IL2: 5'-CACATTAACCTCAACTCC TGCCAC-3', antisentido: 5'-CGTTGATATTGCTGATTAAGTCCCTG-3'; sentido IL8: 5'-CGGAAGGAACCATCTCACTGTG-3', antisentido: 5'-AGAAATCAGGAAG GCTGCCAAG-3'.

#### 25 Ejemplo 8 - Actividades antibacterianas péptidas

Las bacterias *E. coli*, (EC) y *S. aureus* (SA) se cultivaron en medio LB a 37 °C con agitación continua durante 24 horas. La concentración bacteriana se ajustó de tal manera que la absorbancia a 600 (A600) se controló a aproximadamente 0,2 unidades. Las suspensiones bacterianas con los péptidos se incubaron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos. El volumen medio total en cada pocillo fue de 200 μl. Se usaron concentraciones de 25, 50 y 100 μM para cada uno de los siete péptidos y se usó ampicilina (antibiótico betalactámico) como referencia estándar. Los controles con medio solamente y medio con bacterias solamente se corrieron junto con las suspensiones mixtas péptido-bacteria. Las mediciones se tomaron en el tiempo t = 0, t = 20 y t = 72 horas mediante el uso de un lector de placa celular de densidad óptica. La densidad óptica (OD) es representativa de la cantidad relativa del crecimiento bacteriano dentro del medio.

35 Los resultados se presentan en las Figuras 13 y 14. El crecimiento bacteriano después de 20 horas dentro del control (sin ningún agente antibacteriano) fue casi unitario. En comparación, el crecimiento de bacterias dentro de los pocillos que contenían los agentes antibióticos se redujo a t = 20 horas, lo que indica una clara actividad antibiótica de los péptidos. Para todos los péptidos de diseño corto hubo un efecto antibacteriano mayor ya que la concentración del péptido aumentó de 25 μM a 100 μM. Se demostró que el péptido G2 no es un péptido antibacteriano muy eficaz. Sin embargo, como las unidades IKK aumentaron de 2 a 3 y 4 en los péptidos G3 y G4 respectivamente, la actividad antibacteriana mejoró significativamente. Se demostró que el péptido G4 es efectivo incluso a la concentración baja de 25 μM contra ambos *S. aureus* y *E. coli*. En contraste, G3 solo fue efectivo a la concentración más alta de 100 μM. GL tenía cierta actividad antibacteriana, pero esto no mejoró mucho al aumentar su concentración. En relación con la actividad de la ampicilina, se encontró que los péptidos antibióticos más efectivos fueron G4, GO, GKI y GIK. Estos se seleccionaron para una mayor investigación con células y tensioactivos.

#### Ejemplo 9 - Interacciones de células humanas con péptidos cortos diseñados

50 Las células fibroblastos, Neonatales (HDFn) y Adultas (HDFa), ambas crecieron hasta más del 80 % de confluencia. Después, las células se cultivaron y se sembraron en una microplaca de pocillos a densidades celulares de 5000 células/pocillo en un volumen de 100 μl de medio. Después de 24 horas de incubación, el medio de cultivo se reemplazó por medio fresco que contenía una cantidad apropiada del péptido de la investigación. Los pocillos controles que contienen medio con células pero sin péptido y los pocillos en blanco con medio solo se incluyeron también para calcular los resultados del MTT. Se prepararon concentraciones de péptidos de 5, 25, 50 y 100 μM y también se incluyó ampicilina en el experimento para comparación.

60 La viabilidad de las células en presencia de los péptidos se evaluó mediante el ensayo MTT durante tres días. Los resultados para los fibroblastos, células Adultas (HDFa) y Neonatales (HDFn) se muestran en la Tabla 4 y la Tabla 5, respectivamente. Para todos los péptidos, a una concentración de 25 μM e inferior, la viabilidad de ambos fibroblastos (HDFa y HDFn) fue comparable a la de la ampicilina. En presencia de péptido 50 μM, la viabilidad de ambas células se redujo hasta en un 10-25 %, en particular el día tres. Para los péptidos GL y G4 esta reducción en la viabilidad fue significativamente mayor tanto en HDFa como en HDFn. Para todos los péptidos a la concentración de 100 μM, la viabilidad de las células HDFa y HDFn se redujo aún más en hasta un 20 % - 30 %. Nuevamente, se encontró que G4, GIK y en particular GL eran significativamente más tóxicos para las células. Se observaron resultados similares a partir de células de fibroblastos 3T3.

| Conc. Péptido (µM) | G2   |      |      |      | G3   |      |      |      | G4   |      |      |      | Ampicilina |      |      |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------|------|------|
|                    | 5    | 25   | 50   | 100  | 5    | 25   | 50   | 100  | 5    | 25   | 50   | 100  | 25         | 50   | 100  |
| Día 1              | 1,01 | 0,98 | 0,92 | 0,91 | 0,91 | 0,88 | 0,87 | 0,78 | 0,90 | 0,87 | 0,85 | 0,81 | 0,97       | 1,01 | 1,00 |
| Día 2              | 0,96 | 0,90 | 0,90 | 0,88 | 0,92 | 0,85 | 0,84 | 0,75 | 0,84 | 0,81 | 0,78 | 0,70 | 1,01       | 1,02 | 1,01 |
| Día 3              | 0,95 | 0,88 | 0,79 | 0,80 | 0,81 | 0,80 | 0,75 | 0,71 | 0,81 | 0,78 | 0,65 | 0,55 | 0,79       | 0,85 | 0,85 |

| Conc. Péptido (µM) | GO   |      |      |      | GKI  |      |      |      | GIK  |      |      |      | GL   |      |      |      |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                    | 5    | 25   | 50   | 100  | 5    | 25   | 50   | 100  | 5    | 25   | 50   | 100  | 5    | 25   | 50   | 100  |
| Día 1              | 1,01 | 0,98 | 0,95 | 0,88 | 0,95 | 0,93 | 0,90 | 0,85 | 0,97 | 0,92 | 0,87 | 0,85 | 0,91 | 0,90 | 0,87 | 0,63 |
| Día 2              | 0,95 | 0,92 | 0,83 | 0,75 | 0,82 | 0,81 | 0,80 | 0,75 | 0,95 | 0,93 | 0,78 | 0,74 | 0,90 | 0,88 | 0,75 | 0,57 |
| Día 3              | 0,90 | 0,82 | 0,78 | 0,70 | 0,81 | 0,75 | 0,71 | 0,70 | 0,91 | 0,90 | 0,73 | 0,65 | 0,87 | 0,74 | 0,46 | 0,11 |

Tabla 4. Resultados de MTT para células fibroblastos Adultos (HDFa) a cuatro concentraciones de péptido diferentes en tres días. Las lecturas bajas de MTT indican viabilidad baja. Los cambios en las lecturas relativas de MTT indican viabilidades celulares variables contra tiempo y concentración de péptido. Las nomenclaturas de los péptidos se indicaron previamente en la sección de Materiales.

| Conc. Péptido (µM) | G4   |      |      |      | GKI  |      |      |      | Ampicilina |      |      |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------|------|------|
|                    | 5    | 25   | 50   | 100  | 5    | 25   | 50   | 100  | 25         | 50   | 100  |
| Día 1              | 0,95 | 0,85 | 0,81 | 0,73 | 0,95 | 0,87 | 0,81 | 0,69 | 1,04       | 0,97 | 1,01 |
| Día 2              | 0,92 | 0,77 | 0,71 | 0,65 | 0,90 | 0,83 | 0,75 | 0,60 | 0,98       | 1,01 | 1,02 |
| Día 3              | 0,79 | 0,74 | 0,65 | 0,53 | 0,88 | 0,78 | 0,71 | 0,55 | 0,87       | 0,90 | 0,87 |

| Conc. Péptido (µM) | GO   |      |      |      | GL   |      |      |      | GIK  |      |      |      |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                    | 5    | 25   | 50   | 100  | 5    | 25   | 50   | 100  | 5    | 25   | 50   | 100  |
| Día 1              | 0,95 | 0,91 | 0,88 | 0,83 | 0,98 | 0,88 | 0,85 | 0,80 | 0,93 | 0,98 | 0,92 | 0,85 |
| Día 2              | 0,91 | 0,85 | 0,81 | 0,75 | 0,87 | 0,84 | 0,74 | 0,65 | 0,87 | 0,84 | 0,81 | 0,78 |
| Día 3              | 0,85 | 0,80 | 0,75 | 0,65 | 0,83 | 0,81 | 0,67 | 0,35 | 0,83 | 0,78 | 0,75 | 0,71 |

Tabla 5. Resultados de MTT para células fibroblastos Neonatales (HDFn) a cuatro concentraciones de péptido diferentes en tres días. Las lecturas bajas de MTT indican viabilidad baja. Los cambios en las lecturas relativas de MTT indican viabilidades celulares variables contra tiempo y concentración de péptido. Las nomenclaturas de los péptidos se indicaron previamente en la sección de Materiales.

Ejemplo 10 - Interacciones de los ensioactivas con las células

La viabilidad de los fibroblastos, células Adultas (HDFa) y Neonatales (HDFn) en presencia de tensioactivos se evaluó mediante el ensayo MTT durante tres días en relación con los pocillos controles que contienen células solamente. En la Tabla 6 se muestran los resultados para HDFa con todos los tensioactivos que se evaluaron. Los datos muestran que las células no pueden sobrevivir en presencia de los tensioactivos catiónicos, aniónicos o no iónicos que se seleccionaron. Esto también fue cierto para los tensioactivos de uso común, SLES, CMEA y Tt. Los polímeros de superficie activa de uso popular tienden a mostrar la misma tendencia. En contraste con este resultado, el tensioactivo polimérico que no causó una citotoxicidad importante en estas células de mamíferos fue el F127 plurónico. Los sistemas que contienen polipéptidos derivados de la membrana de la cáscara de huevo y polipéptidos de seda como aditivos mostraron una alta compatibilidad con las células fibroblastos, es decir, estos polipéptidos no provocaron ninguna inhibición importante del crecimiento celular contra el control. Se observaron tendencias similares cuando se usaron células fibroblastos Neonatales (HDFn).

Tabla 6. Resultados de MTT para células fibroblastos Adultos (HDFa) en sistemas de cultivo que contienen tensioactivos al 1 % de concentración durante tres días. Las lecturas bajas de MTT indican baja viabilidad. Los cambios en las lecturas relativas de MTT indican las viabilidades celulares variables contra el tiempo y la concentración del péptido. Las nomenclaturas de tensioactivo y polipéptido se indican previamente en la sección de Materiales.

| Surf  | C12E5  | C12E6 | SDS  | SL   | Mx   | Bx   | P123 | F127 | Tt   | SLES | CMEA | SILK | C12TAB |
|-------|--------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|
| Conc  | 0,50 % | 1 %   | 1 %  | 1 %  | 1 %  | 1 %  | 1 %  | 1 %  | 1 %  | 1 %  | 1 %  | 1 %  | 1 %    |
| Día 1 | 0,01   | 0,01  | 0,01 | 1,23 | 1,30 | 0,21 | 0,09 | 0,81 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 1,03 | 0,00   |
| Día 2 | 0,01   | 0,01  | 0,01 | 0,82 | 0,95 | 0,12 | 0,06 | 0,78 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,75 | 0,00   |
| Día 3 | 0,01   | 0,01  | 0,01 | 0,80 | 1,07 | 0,16 | 0,14 | 0,75 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,85 | 0,00   |

Ejemplo 11 - Interacciones del tensioactivo con las bacterias

También se estudiaron las interacciones de las bacterias *E. coli*, (EC) y *S. aureus* (SA) con los tensioactivos. Las bacterias se cultivaron en medio LB a 37 °C con agitación continua durante 24 horas. La concentración bacteriana se ajustó de tal manera que la absorbancia a 600 (A600) se controló a aproximadamente 0,2 unidades. Las suspensiones bacterianas con tensioactivos se incubaron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos. El volumen medio total en cada pocillo fue de 200 µl. Nuevamente, se usaron concentraciones del tensioactivo del 1 %. Los controles con medio solamente y medio con bacterias solamente se corrieron junto con las suspensiones mixtas de tensioactivo-bacteria. Las mediciones se tomaron en el tiempo t = 0, t = 20 y t = 72 horas mediante el uso del lector de placa celular de densidad óptica nuevamente.

Los resultados a continuación se muestran para tensioactivos que se seleccionaron contra *E. coli*, (EC) en la Figura 15 y *S. aureus* (SA) en la Figura 16, respectivamente. El tensioactivo catiónico C12TAB tiene una actividad antibacteriana significativa contra SA y EC. Incluso después de 72 horas no hubo crecimiento de bacterias. Por el contrario, tanto Tt como SLES muestran cierta influencia antibacteriana pero en menor medida que C12TAB. En comparación, el PLURONIC F127 no iónico y el péptido de huevo Mx de peso molecular mixto no mostraron actividad antibacteriana significativa.

Ejemplo 12 - Actividades antibacterianas de mezclas de péptido-tensioactivo/polímero

Se investigaron las actividades antibacterianas de los péptidos cortos diseñados en presencia de tensioactivos seleccionados para determinar si los péptidos mantendrían su rendimiento antibacteriano cuando los tensioactivos están presentes. Las bacterias *E. coli*, (EC) y *S. aureus* (SA) se cultivaron en medio LB a 37 °C con agitación continua durante 24 horas. Las concentraciones bacterianas se ajustaron entonces de manera que la absorbancia a 600 (A600) se controlara a aproximadamente 0,2 unidades. Las suspensiones bacterianas con los péptidos se incubaron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos. El volumen medio total en cada pocillo fue de 200 µl. Se usaron concentraciones de 25, 50 y 100 µM para cada uno de los siete péptidos y ampicilina. Los controles que se usaron fueron (i) medio solamente, (ii) medio con bacterias solamente y (iii) bacterias con medio que contiene péptidos a una concentración particular. Estos se corrieron junto con el péptido + bacterias y las suspensiones mixtas de tensioactivos seleccionados. Las mediciones se tomaron en el tiempo t = 0, t = 20 y t = 72 horas mediante el uso de un lector de placa celular de densidad óptica. Se añadieron tensioactivos de manera que la concentración final fue del 1 % dentro de los pocillos.



(continuación)

|         | AMPCIL |       | GO    |        | GKI   |        |           |
|---------|--------|-------|-------|--------|-------|--------|-----------|
|         | 25 µM  | 50 µM | 25 µM | 50 µM  | 25 µM | 50 µM  |           |
|         | 0,20   | 0,20  | 0,13  | 0,13   | 0,14  | 0,14   | 100 µM    |
|         | 0,27   | 0,26  | 0,20  | 0,20   | 0,20  | 0,24   | 0,19      |
|         |        |       |       |        |       |        | 0,23      |
| Control |        |       |       |        |       |        |           |
|         | 0,20   | 0,16  | 0,54  | 0,43   | 0,11  | 0,14   | 0,15      |
|         | 0,32   | 0,28  | 0,14  | 0,15   | 0,12  | 0,18   | 0,15      |
|         | 0,09   | 0,07  | 0,06  | 0,06   | 0,06  | 0,07   | 0,09      |
|         | 0,08   | 0,08  | 0,06  | 0,06   | 0,05  | 0,06   | 0,06      |
|         | 0,15   | 0,13  | 0,66  | 0,59   | 0,47  | 0,32   | 0,14      |
|         | 0,27   | 0,26  | 0,20  | 0,20   | 0,20  | 0,21   | 0,16      |
|         |        |       | GIK   |        |       |        |           |
|         |        |       | 50 µM | 100 µM | 25 µM | 100 µM |           |
| Control |        |       |       |        |       |        | T=0 HORAS |
|         | 0,20   |       | 0,14  | 0,15   | 0,19  | 0,24   | NO SURF   |
|         |        |       | 0,15  | 0,16   | 0,18  | 0,24   | Mx        |
|         |        |       | 0,11  | 0,10   | 0,13  | 0,09   | Tt        |
|         |        |       | 0,07  | 0,07   | 0,10  | 0,08   | SLES      |
|         |        |       | 0,12  | 0,13   | 0,19  | 0,22   | F127      |
|         |        |       | 0,21  | 0,20   | 0,21  | 0,15   | C12TAB    |
|         |        |       |       |        |       |        |           |
| Control |        |       |       |        |       |        |           |
|         | 0,95   |       | 0,35  | 0,14   | 0,55  | 0,46   | NO SURF   |
|         |        |       | 0,37  | 0,15   | 0,40  | 0,25   | Mx        |
|         |        |       | 0,08  | 0,08   | 0,06  | 0,05   | Tt        |

(continuación)

|  |       | GIK   |        | GL    |       |        |        |
|--|-------|-------|--------|-------|-------|--------|--------|
|  | 25 µM | 50 µM | 100 µM | 25 µM | 50 µM | 100 µM |        |
|  | 0,42  | 0,21  | 0,06   | 0,30  | 0,07  | 0,27   | SLES   |
|  | 0,62  | 0,45  | 0,37   | 0,54  | 0,60  | 0,55   | F127   |
|  | 0,18  | 0,18  | 0,12   | 0,17  | 0,16  | 0,10   | C12TAB |

El resultado principal de los resultados indica que no se produce ningún efecto adverso al añadir los tensioactivos a los péptidos con respecto a la actividad antibacteriana. De hecho, todos los tensioactivos y polímeros seleccionados mejoran la actividad antibacteriana de los péptidos en comparación con los péptidos solos, excepto el F127 plurónico. Este polímero de superficie activa pareció reducir el efecto antibacteriano o en otros casos no produjo mejoría en comparación con los péptidos solos. Por el contrario, es interesante observar que el polipéptido de huevo de peso molecular mixto Mx parecía mejorar la actividad antibacteriana de los péptidos, en particular cuando se mezclaba con GO y G3. Obsérvese que se demostró que Mx no tiene actividad antibacteriana significativa por sí solo. Sin embargo, la mejora antibacteriana mediante la adición de Mx no fue evidente para la ampicilina, lo que sugiere que para este antibiótico el mecanismo de actividad antibacteriana puede que no sea el mismo que para los péptidos. Se observaron resultados similares con la bacteria Gram-positiva *S. aureus*, (SA).

#### Ejemplo 13 - Cocultivo de células con bacterias y tensioactivos/polímeros

Las células fibroblastos, Neonatales (HDFn) y Adultos (HDFa), se cultivaron en medio sin antibióticos hasta una confluencia superior al 80 %. Las bacterias *E. coli*, (EC) y *S. aureus* (SA) se cultivaron en medio LB a 37 °C con agitación continua durante 24 horas. La concentración bacteriana se ajustó de tal manera que la absorbancia a 600 (A600) se ajustó a aproximadamente 0,2 unidades. Se seleccionaron cuatro péptidos (G4, GO, GIK y GKI) a una concentración final de 50 µM. El único tensioactivo/polímero que se usó aquí fue Mx a una concentración final del 1 %.

Después, las células se cultivaron y se sembraron en una microplaca de pocillos a densidades celulares de 5000 células/pocillo en un volumen de 100 µl de medio. Después de 24 horas de incubación, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco que contenía una cantidad apropiada del péptido, las bacterias y también del polipéptido de superficie activa que se seleccionó para la investigación. Los controles se corrieron con (i) células solamente, (ii) células con péptido y (iii) células con péptido y bacterias. Después de 1 hora de incubación, las células se analizaron mediante observación visual a través de un microscopio.

Los resultados mostraron una forma de fibroblastos relativamente similar, pero hubo algún desprendimiento de células en los pocillos con células y péptidos en comparación con los pocillos con células solamente. Los pocillos que contenían células con péptido + bacteria tenían más desprendimiento de células que los pocillos con células y péptido solamente. Por el contrario, para los pocillos con células, péptidos, bacterias y el polipéptido de superficie activa Mx, la forma de los fibroblastos fue similar a la de los pocillos con las células solas. Esto fue evidente en los péptidos GO y GKI, pero en menor medida en GIK y G4, tanto en el Neonatal (HDFn) como en el Adulto (HDFa). Este experimento muestra que la adición del polipéptido de membrana de huevo de superficie activa ayuda a proteger las células de mamíferos contra los efectos combinados del ataque bacteriano y la influencia de los péptidos antibacterianos que se asocia con su selectividad.

Por otro lado, las inhibiciones del crecimiento bacteriano fueron similares o ligeramente mejores que los casos sin los polipéptidos Mx.

#### Ejemplo 14 - Evaluación de las respuestas inmunes no específicas mediante el examen de las transcripciones de genes de las citocinas IL2 e IL8

Los péptidos antibacterianos naturales que se aíslan de organismos vivos tienen un uso clínico muy limitado debido a su alto costo de producción, alta hemólisis y posibles efectos inmunológicos [Papo y Shai]. Además del bajo costo de producción y la baja acción hemolítica a través de la alta selectividad celular, los efectos no inmunológicos de los péptidos helicoidales diseñados también son esenciales para desarrollar sus aplicaciones potenciales. Los niveles transcripcionales de los genes de citocinas que incluyen IL2 e IL8 de linfocitos humanos se usan ampliamente para la evaluación de posibles respuestas inmunes no específicas como resultado de la administración de un ingrediente en productos formulados tales como en el cuidado personal o terapéutico. Los dos genes de citocinas se consideran las principales moléculas de señal del sistema inmunitario que pueden responder a la infección microbiana y discriminar las moléculas extrañas (no propias) y las células y moléculas propias del cuerpo (propias) en el cuerpo humano [De Groote y otros; Feghali y Wright]. Como resultado, la alta expresión de los dos genes induce típicamente inflamación aguda y crónica, lo que provoca posibles complicaciones de salud. En el contexto de esto, se analizaron las respuestas transcripcionales de IL2 e IL8 mediante el uso del ensayo RT-PCR, después de su tratamiento con el péptido G3 (G(IKK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>). Como se muestra en la Figura 17, los niveles transcripcionales relativos de IL2 e IL8 de los linfocitos después de la incubación del péptido fueron inferiores o casi iguales a los de las células controles, lo que indica que la interacción del G(IKK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> con los linfocitos no indujo respuestas inmunogénicas no específicas del organismo.

#### Resumen de los Ejemplos 8 a 14

Los péptidos antibacterianos más efectivos fueron G4, GO, GKI y GIK, con concentraciones antibacterianas activas que varían de 25 a 100 µM. Estos péptidos tienen una toxicidad muy baja contra las células fibroblastos 3T3 y las células fibroblastos derivados de la piel humana a concentraciones inferiores a 50 µM dentro de las condiciones que se investigan. A medida que aumentan las concentraciones de los péptidos, mejora el rendimiento antibacteriano en general pero hay un aumento pequeño pero apreciable de la toxicidad contra estas células de mamíferos, lo que indica el debilitamiento de su selectividad.

Los péptidos antibacterianos no provocan ninguna respuesta inmune no específica según se juzga a partir de la evaluación de los niveles transcripcionales de los genes de citocinas (IL2 e IL8) de los linfocitos humanos. Estos péptidos poseen ventajas sobre los que se derivan directamente de los organismos vivos en costo (frecuentemente en secuencias mucho más largas) y evitan el riesgo de complicaciones inmunes.

5 Los tensioactivos y los polímeros de superficie activa son ingredientes esenciales de las formulaciones para el cuidado de la piel, pero su presencia podría disminuir los efectos antibacterianos de los péptidos. Por lo tanto, es esencial probar la compatibilidad de la formulación cuando se incorporan especies de superficie activa. Por otro lado, el protocolo experimental actual también permite la evaluación vigorosa de la biocompatibilidad de los tensioactivos/polímeros que se usaron. A partir de los estudios experimentales que se realizaron, casi todos los tensioactivos y polímeros de superficie activa que se usan popularmente son tóxicos para las células fibroblastos que se evaluaron. Los tensioactivos aniónicos como SDS, los catiónicos como C12TAB y los no iónicos como C12E6 lisan las células fibroblastos desde la primera hora después de su adición, en dependencia de las concentraciones exactas que se usan. El SLES, que se usa ampliamente en las formulaciones actuales para el cuidado de la piel y se considera ampliamente como biocompatible, también mostró una toxicidad alta. En contraste, el F127 plurónico mostró mucha menos toxicidad que otros polímeros de superficie activa que se evaluaron.

20 Los polipéptidos de seda solubles en agua mostraron poca toxicidad para las células fibroblastos, pero debido a que no son muy activos en la superficie, su idoneidad en las formulaciones de productos debe investigarse más a fondo.

25 Los polipéptidos de membrana de huevo solubles en agua son altamente compatibles con las células fibroblastos. Como polipéptidos de superficie altamente activa, su presencia no socava el rendimiento antibacteriano. En cambio, estos polipéptidos mostraron alguna mejora de la actividad antibacteriana. Como los péptidos son buenos nutrientes, su adición a una concentración de alrededor del 1 % en peso al cultivo celular promovería la viabilidad celular y el crecimiento saludable. Estos polipéptidos son, por lo tanto, ingredientes ideales para proporcionar una buena compatibilidad de formulación y biocompatibilidad en formulaciones para el cuidado de la piel y el cabello y cualquier otro producto formulado donde se busca la combinación de estas propiedades.

#### Referencias

- 30 Tossi, A.; Tarantino, C.; Romeo, D.; Eur J Biochem 1997, 250, 549-558.
- Tossi, A.; Sandri, L.; Giangaspero, A. Biopolymers 2000, 55, 4-30.
- 35 Cruciani, R.A.; Barker, J.L.; Zasloff, M.; Chen, H.C.; Colamonici, O. Proc. Natl. Acad. Sci. 1991, 88, 3792-3796.
- Wieprecht, T.; Dathe, M.; Beyermann, M.; Krause, E.; Maloy, W.L.; MacDonald, D.L.; Bienert, M. Biochemistry 1997, 36, 6124-6132.
- 40 Asthana, N.; Yadav, S.P.; Ghosh, J.K. J Biol Chem 2004, 279, 55042-55050.
- Greenwood, D.; O'Grady, F. J Infect Dis 1970, 122, 465-471.
- 45 Takara, K.; Obata, Y.; Yoshikawa, E.; Kitada, N.; Sakaeda, T.; Ohnishi, N.; Yokoyama, T. Cancer Chemoth Pharm 2006, 58, 785-793.
- Jullian, M.; Hernández, A.; Maurras, A.; Puget, K.; Amblard, M.; Martinez, J.; Subra, G. Tetrahedron Lett 2009, 50, 260-263.
- 50 Dathe, M.; Nikolenko, H.; Meyer, J.; Beyermann, M.; Bienert, M. FEBS Lett 2001, 501, 146-150.
- Papo, N.; Shai, Y. Cell Mol Life Sci. 2005, 62, 784-790.
- De Groote, D.; Zangerle, P.F.; Gevaert, Y.; Fassotte, M.F.; Beguin, Y.; Noizat-Pirenne, F. y otros. Cytokine 1992, 4, 239-248.
- Feghali, C.A.; Wright, T.M. Front Biosci 1997, 2, d12-26.

#### Listado de secuencias

- 60 <110> La Universidad de Manchester
- <120> Péptidos
- 65 <130> P137753WO

ES 2 776 992 T3

<150> GB 1115910.0  
<151> 2011-09-14

<160> 21

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 6  
10 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

15 <400> 1

20 Gly Ile Ile Lys Lys Ile  
1 5

<210> 2  
<211> 10  
<212> PRT  
25 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

30 <400> 2

35 Gly Ile Ile Lys Lys Ile Ile Lys Lys Ile  
1 5 10

<210> 3  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

40 <220>  
<223> Péptido sintético

<400> 3

45 Gly Ile Ile Lys Lys Ile Ile Lys Lys Ile Ile Lys Lys Ile  
1 5 10

<210> 4  
<211> 18  
<212> PRT  
50 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

55 <400> 4

Gly Ile Ile Lys Lys Ile Ile Lys Lys Ile Ile Lys Lys Ile Ile Lys  
1 5 10 15

60 Lys Ile

<210> 5  
<211> 14  
<212> PRT  
65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 776 992 T3

<220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 5

5  
                   Gly Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys Leu  
                   1                                  5                                  10

<210> 6  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 6

20  
                   Gly Val Val Lys Lys Val Val Lys Lys Val Val Lys Lys Val  
                   1                                  5                                  10

<210> 7  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

30  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(5)  
 <223> Orn

35  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(9)  
 <223> Orn

40  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)..(13)  
 <223> Orn

45  
 <400> 7

                  Gly Ile Ile Xaa Xaa Ile Ile Xaa Xaa Ile Ile Xaa Xaa Ile  
                   1                                  5                                  10

50  
 <210> 8  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

55  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 8

60  
                   Gly Lys Ile Lys Lys Ile Ile Lys Lys Ile Ile Lys Ile Ile  
                   1                                  5                                  10

<210> 9  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

65



<220>  
 <223> secuencia del cebador  
  
 <400> 15  
 5 tcacacaatc tacatcttct g 21  
  
 <210> 16  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia del cebador  
  
 <400> 16  
 15 atgcagcagc ccttcaatta c 21  
  
 <210> 17  
 <211> 19  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia del cebador  
 25  
 <400> 17  
 caatcctacc aaggcaacc 19  
  
 <210> 18  
 30 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 35 <223> secuencia del cebador  
  
 <400> 18  
 cacattaacc tcaactcctg ccac 24  
  
 <210> 19  
 40 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 45 <223> secuencia del cebador  
  
 <400> 19  
 50 cgttgatatt gctgattaag tccctg 26  
  
 <210> 20  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> secuencia del cebador  
 <400> 20  
 60 cggaaggaac catctcactg tg 22  
  
 <210> 21  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 65

## ES 2 776 992 T3

<220>

<223> secuencia del cebador

<400> 21

5 agaaatcagg aaggctgccca ag 22

REIVINDICACIONES

1. Un péptido con la fórmula I o II que se muestra a continuación



(I)



(II)

25 en donde:

$A^1_V$  se selecciona de G, GKI o GIK en donde G es glicina, K es lisina e I es isoleucina;

$A^2_W$  es II o VV, en donde I es isoleucina y V es valina;

$A^3_X$  es KK u OO en donde K es lisina y O es ornitina;

y es 2, 3, o 4;

30  $A^4_Z$  está ausente o es un aminoácido que se selecciona de isoleucina (I), leucina (L), valina (V) y lisina (K);

z es 0, 1, 2 o 3;

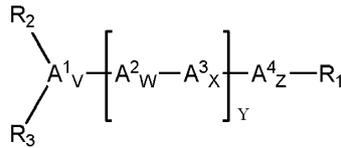
$R_1$  es un sustituyente terminal que se selecciona de OH,  $NH_2$ , (1-18C)alquilo,  $N[(1-18C) \text{alquilo}]_2$  o  $NH(1-18C)alquilo$ ; y

35  $R_2$  y  $R_3$  ambos se seleccionan independientemente de H, (1-18C)alquilo o (2-18C)acilo;

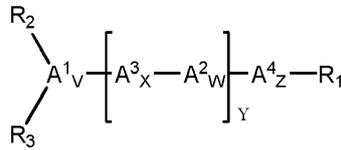
o una sal de este;

en donde el péptido comprende de 12 a 20 aminoácidos.

2. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde  $A^2_W$  es II y/o  $A^3_X$  es KK u OO.
- 40 3. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde  $z = 1$ .
4. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde  $A^1_V$  es glicina (G) y/o  $A^4_Z$  es isoleucina (I).
- 45 5. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde:  $A^4_Z$  se selecciona de I, L, V o KII.
6. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde
- 50 (a)  $R_1$  es  $NH_2$ ; y/o  
(b)  $R_2$  y/o  $R_3$  es H.
7. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se selecciona de:  $G(IKK)_3I-NH_2$ ;  $G(IKK)_4I-NH_2$ ;  $G(VVKK)_3V-NH_2$ ;  $G(IIOO)_3I-NH_2$ ;  $GKI(KKII)_2KII-NH_2$ ; y  $GIK(KKII)_2KII-NH_2$ .
- 55 8. El uso de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7:  
(a) como agente antibacteriano no terapéutico;  
(b) como conservante; o  
(c) como tensioactivo.
- 60 9. Una composición antibacteriana que comprende un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
10. Una composición para el cuidado personal que comprende un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 65 11. Un péptido con la fórmula I o II que se muestra a continuación



(I)



(II)

en donde:

$A^1_V$  se selecciona de G, GKI o GIK en donde G es glicina, K es lisina e I es isoleucina;

$A^2_W$  es II, LL o VV, en donde I es isoleucina, L es leucina y V es valina;

$A^3_X$  es KK u OO en donde K es lisina y O es ornitina;

y es 2, 3, o 4;

$A^4$  está ausente o es un aminoácido que se selecciona de isoleucina (I), leucina (L), valina (V) y lisina (K);

z es 0, 1, 2 o 3;

$R_1$  es un sustituyente terminal que se selecciona de OH,  $NH_2$ , (1-18C)alquilo,  $N[(1-18C) \text{alquilo}]_2$  o  $NH(1-18C)alquilo$ ; y

$R_2$  y  $R_3$  ambos se seleccionan independientemente de H, (1-18C)alquilo o (2-18C)acilo; o una sal de este;

en donde el péptido comprende de 12 a 20 aminoácidos; para su uso en el tratamiento del cáncer.

12. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 u 11, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en el tratamiento de la infección.
13. Una composición farmacéutica que comprende un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 u 11, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en mezcla con uno o más exipientes farmacéuticamente aceptables.

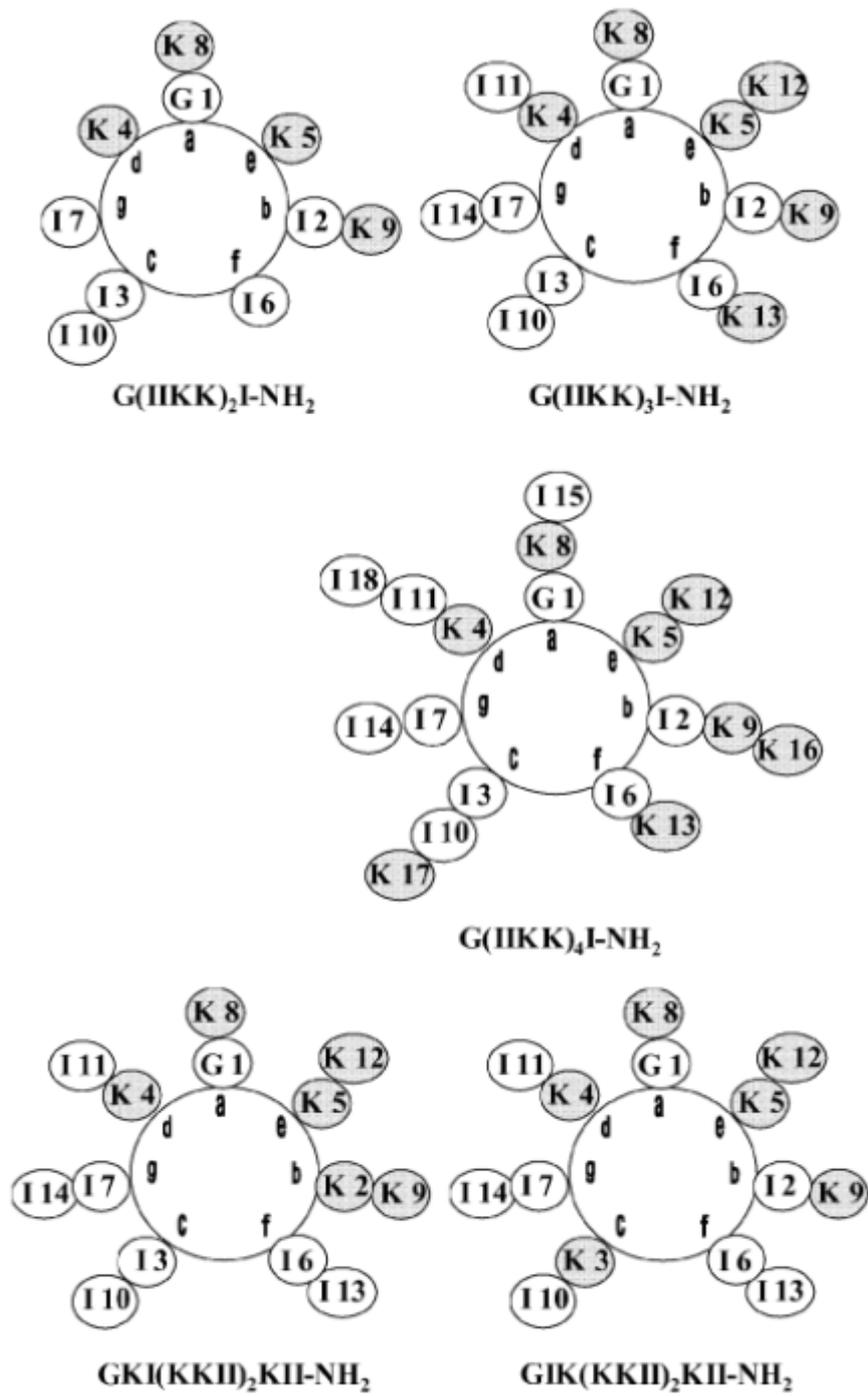


Figura 1

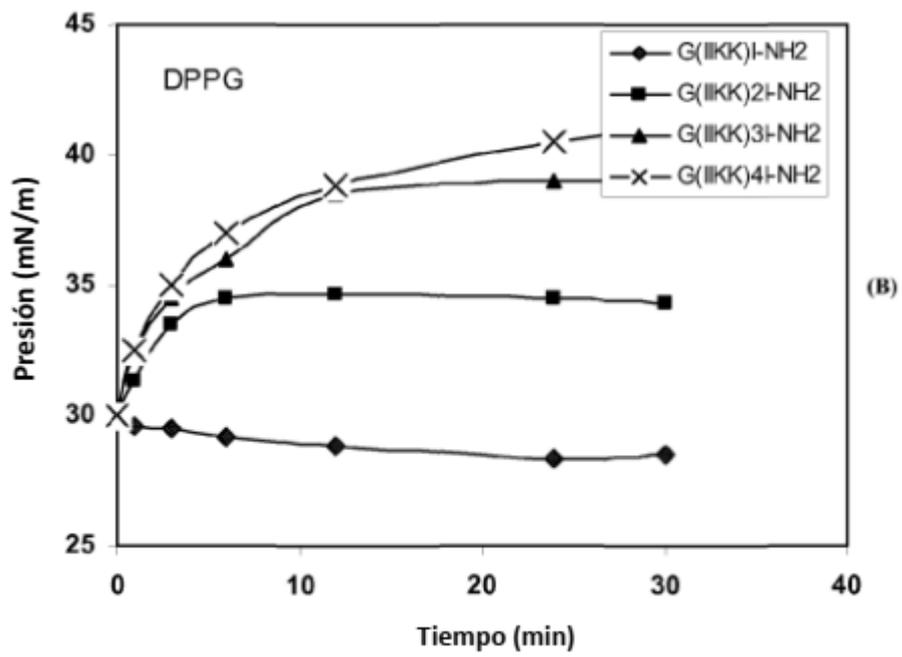
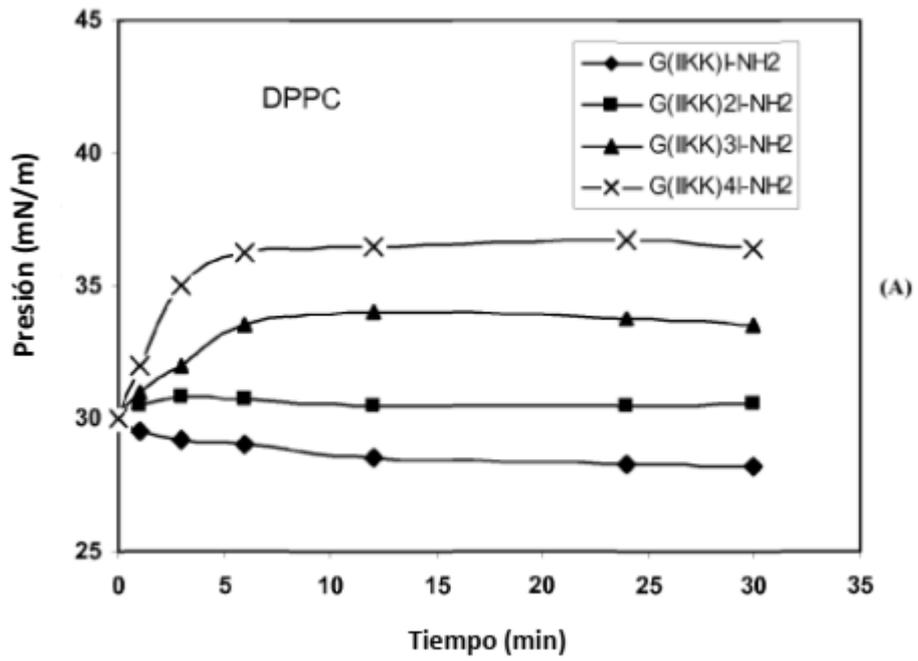


Figura 2

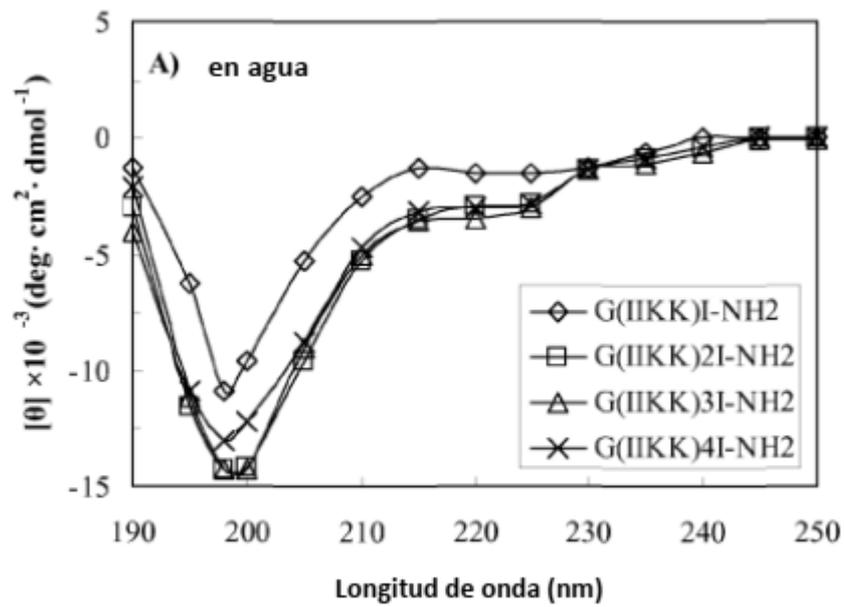


Figura 3(A)

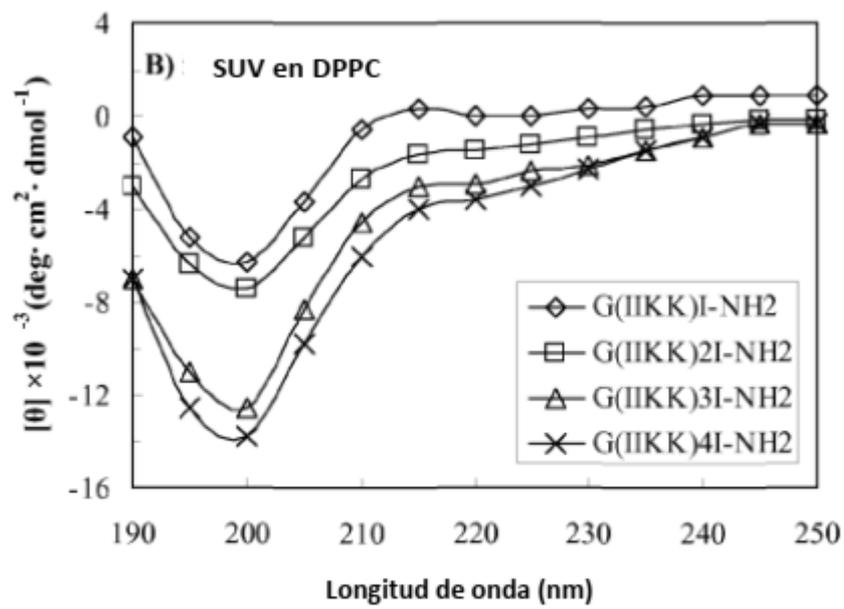


Figura 3(B)

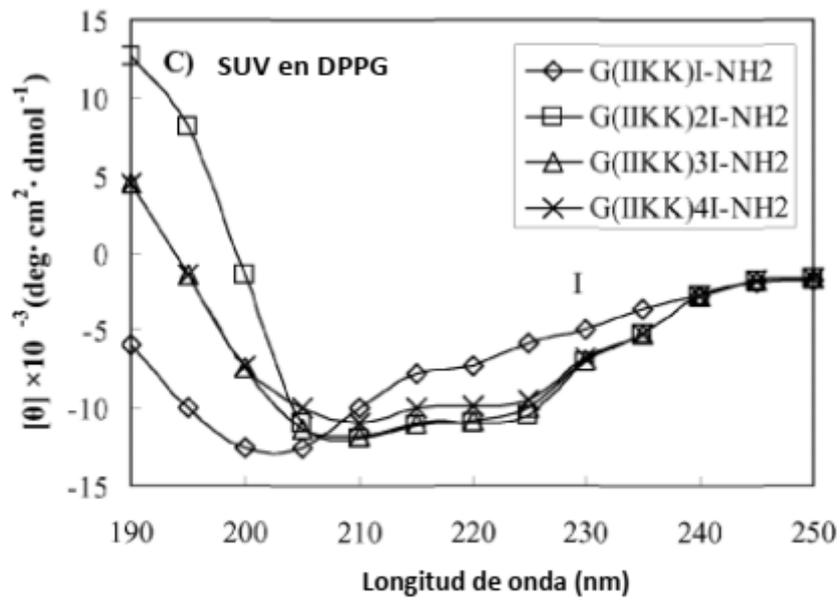


Figura 3(C)

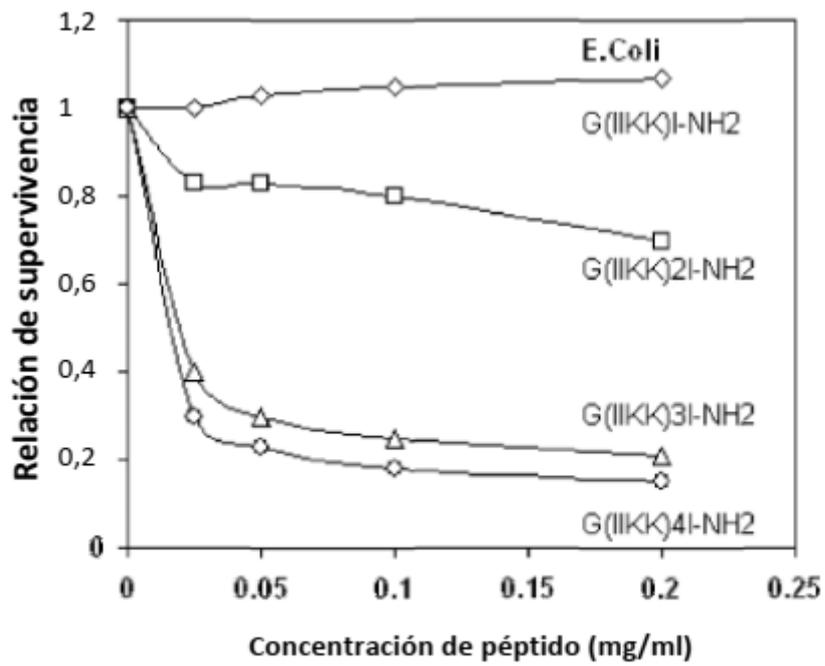


Figura 4(A)

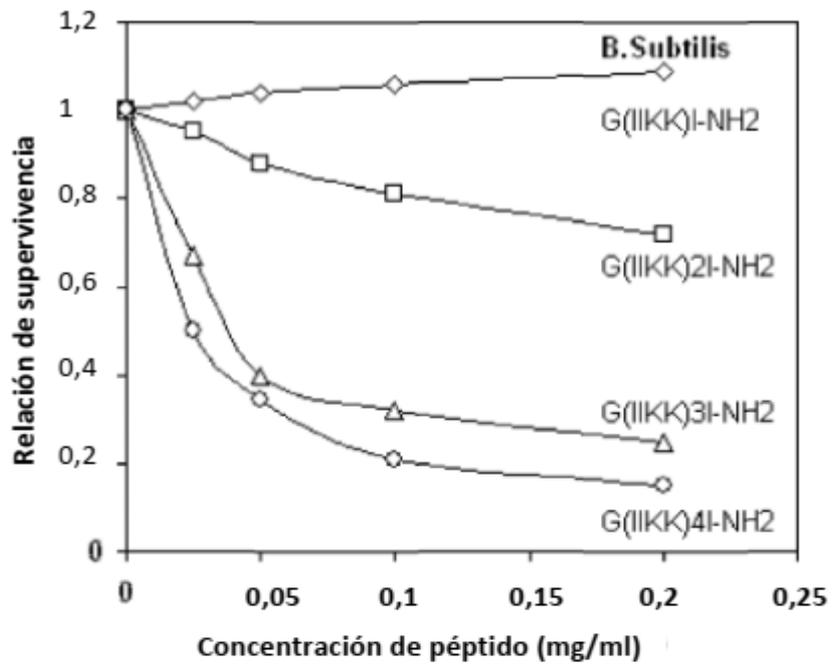


Figura 4(B)

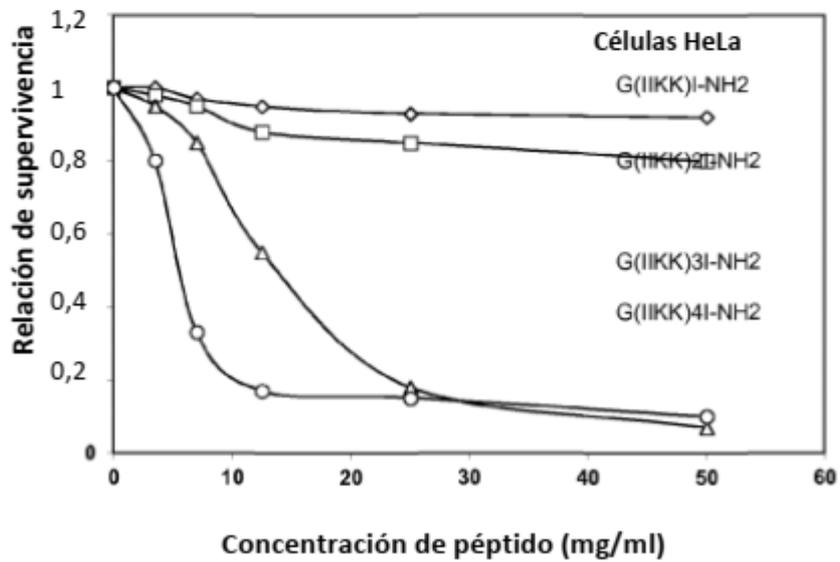


Figura 5(A)

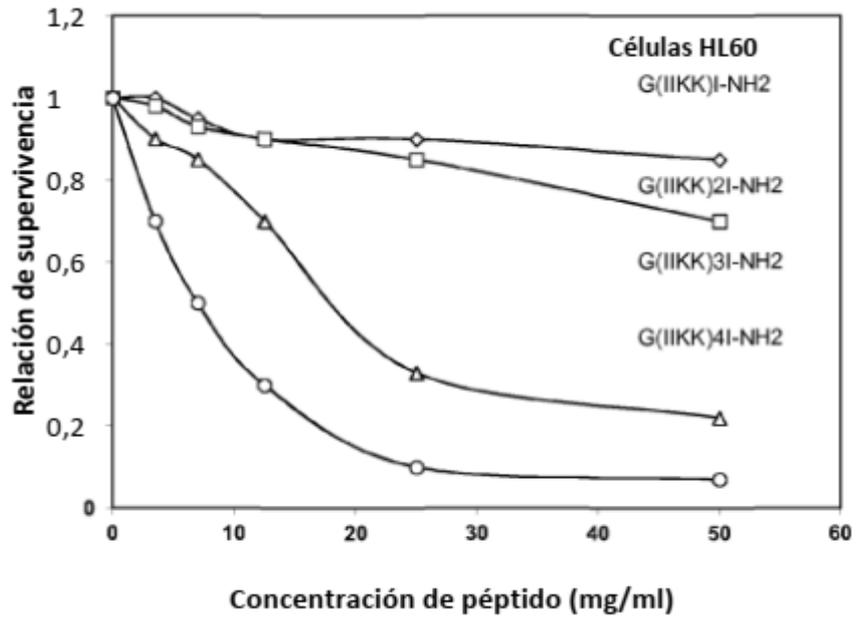


Figura 5(B)

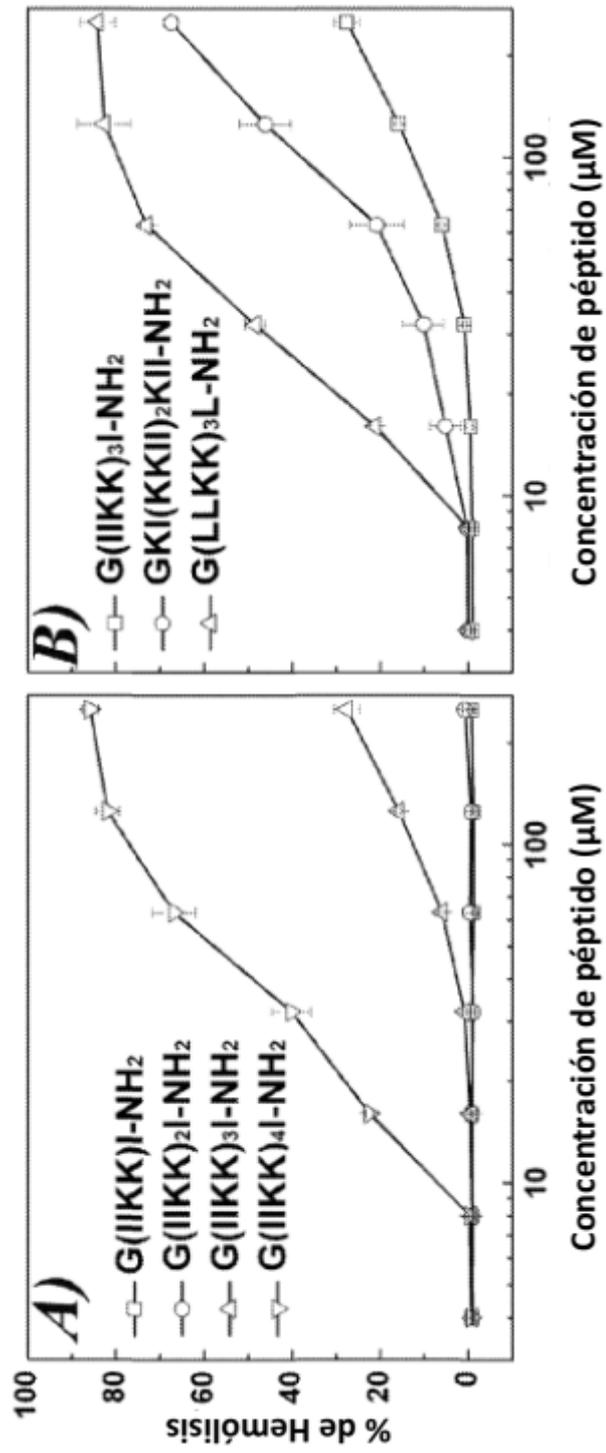


Figura 6

| Péptidos                   | MIC ( $\mu\text{M}$ ) |     | IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) |        | EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) |
|----------------------------|-----------------------|-----|------------------------------------|--------|------------------------------------|
|                            | E.coli                |     | HeLa                               |        |                                    |
|                            | B.Subtilis            |     | HL60                               |        |                                    |
| G(IKK) <sub>1</sub>        | -                     | -   | -                                  | -      | -                                  |
| G(IKK) <sub>2</sub> I      | 130±5                 | -   | 160±7                              | -      | -                                  |
|                            | 28±3                  | -   | >500                               | -      | -                                  |
| G(IKK) <sub>3</sub> I      | 9±1                   | -   | 15±5,0                             | -      | >250                               |
|                            | 2±1                   | -   | 25±5,0                             | -      | -                                  |
| G(IKK) <sub>4</sub> I      | 2±0,5                 | -   | 4±2,5                              | 10±2,5 | 36±2                               |
|                            | 0,5±0,2               | -   | -                                  | -      | -                                  |
| G(LLKK) <sub>3</sub> L     | 7±0,5                 | -   | 10±2,5                             | -      | 28±3                               |
|                            | 2±0,5                 | -   | 8±2,5                              | -      | -                                  |
| G(VVKK) <sub>3</sub> V     | 125±10                | -   | 70±10                              | -      | >600                               |
|                            | 65±5                  | -   | >100                               | -      | -                                  |
| G(IIOO) <sub>3</sub> I     | 3±0,5                 | -   | 3±1,0                              | -      | >250                               |
|                            | 1,5±0,5               | -   | 5±2,0                              | -      | -                                  |
| GKI(KKII) <sub>2</sub> KII | 2±0,5                 | -   | 16±3                               | -      | 150                                |
|                            | 1±0,5                 | -   | 10±2                               | -      | -                                  |
| GIK(KKII) <sub>2</sub> KII | 3±0,5                 | -   | 50±10                              | -      | >250                               |
|                            | 1±0,5                 | -   | 10±2,5                             | -      | -                                  |
| Magainina-2 <sup>a</sup>   | 38                    | >80 | >60                                | -      | 430                                |
| Melitina <sup>b</sup>      | 3,9±0,6               | -   | -                                  | -      | 3                                  |
|                            | 2,0±0,2               | -   | -                                  | -      | -                                  |
| Ampicilina <sup>c</sup>    | ~11                   | 5,5 | -                                  | -      | -                                  |
| Cisplatino <sup>d</sup>    | -                     | -   | 1,34±0,32                          | -      | -                                  |

Figura 7 (Tabla 3)

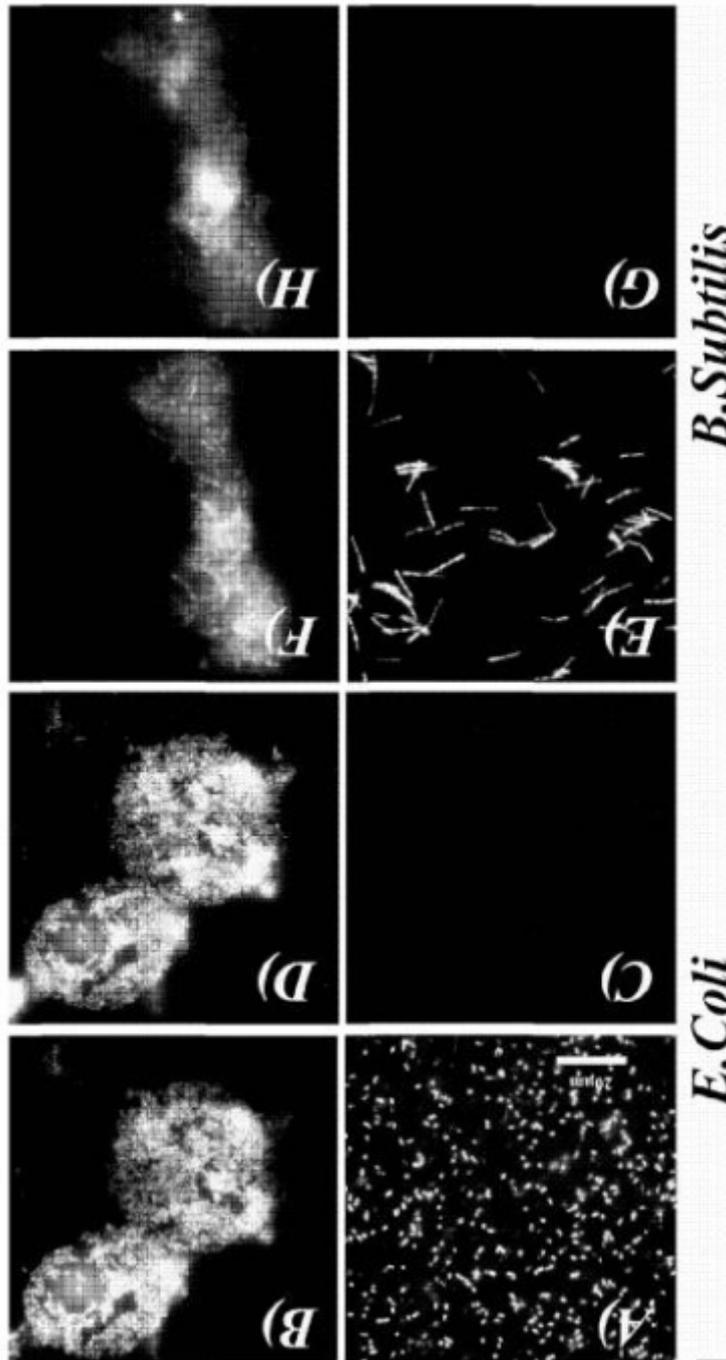


Figura 8

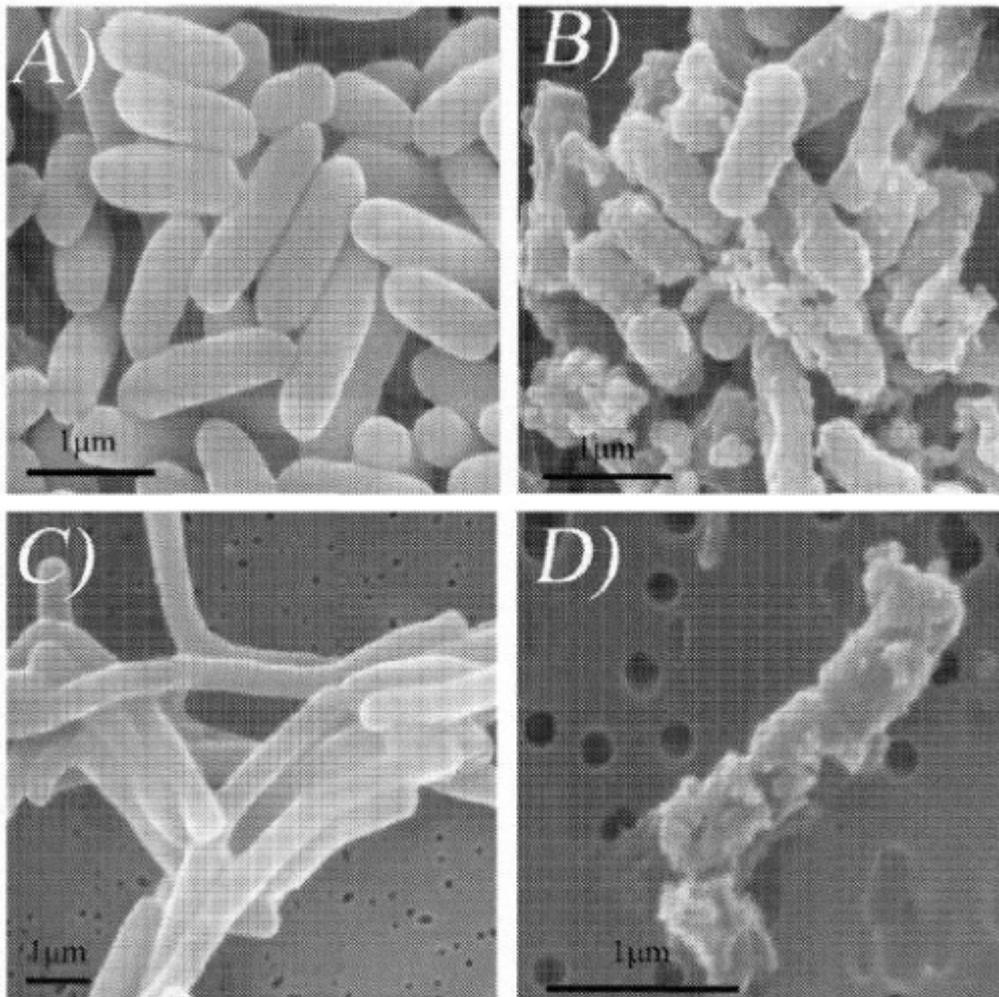


Figura 9

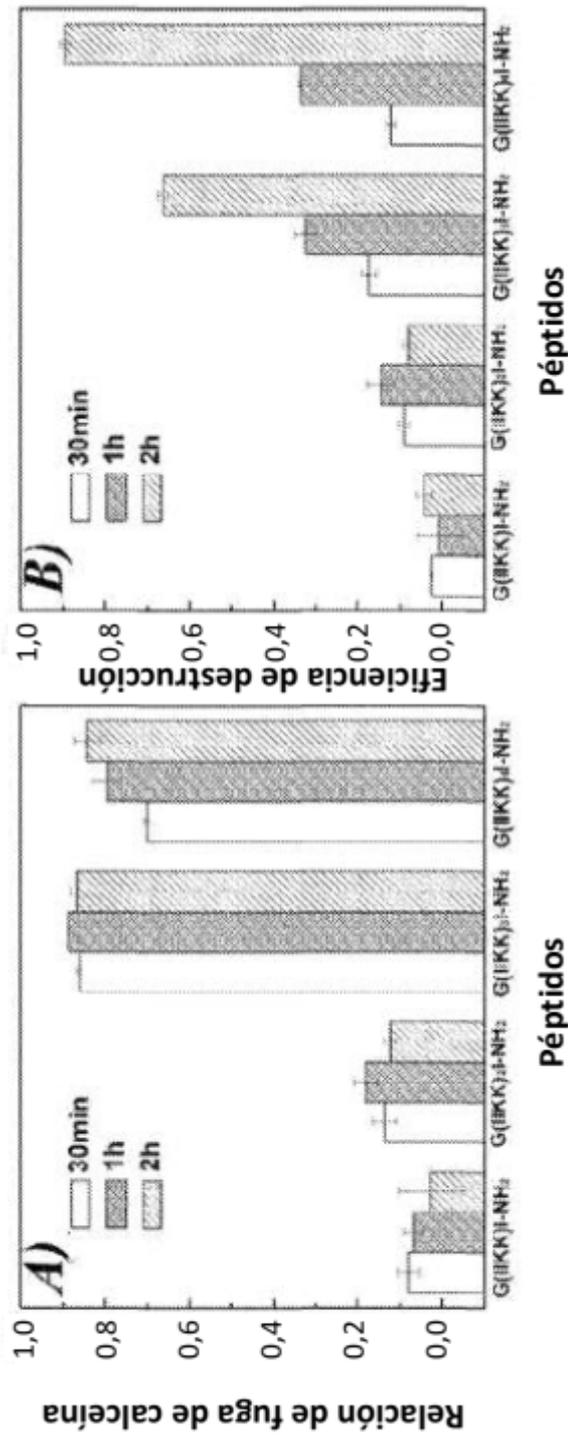


Figura 10

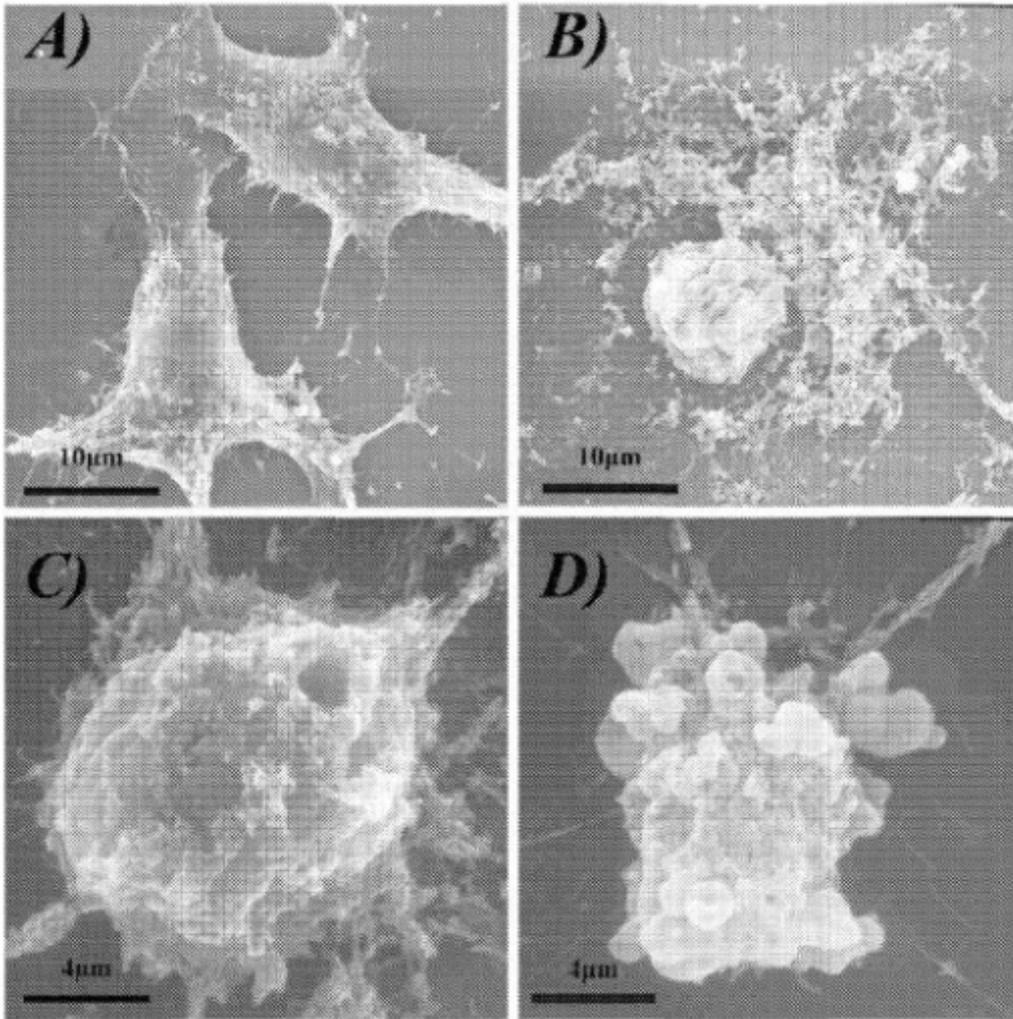


Figura 11

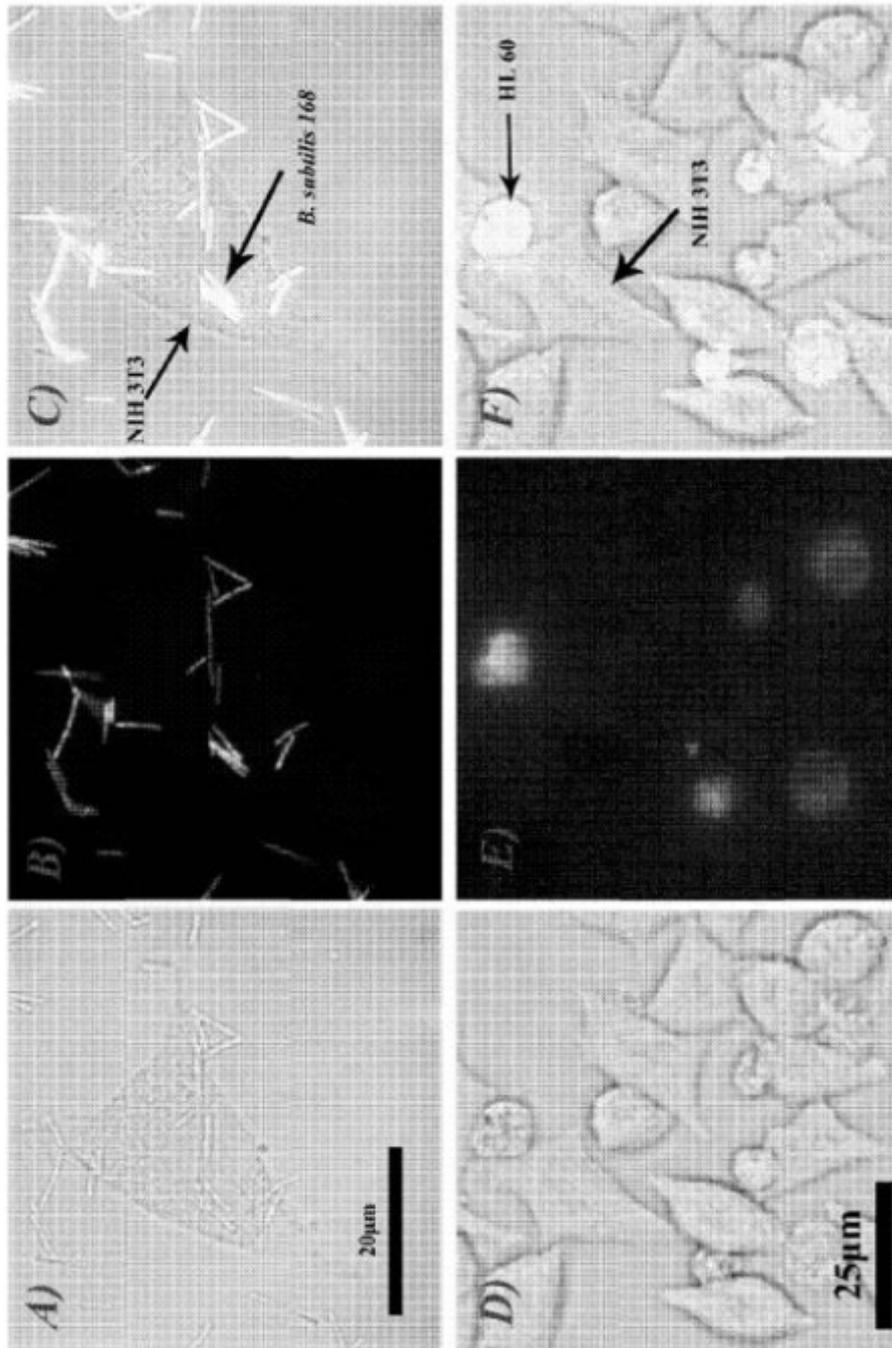


Figura 12

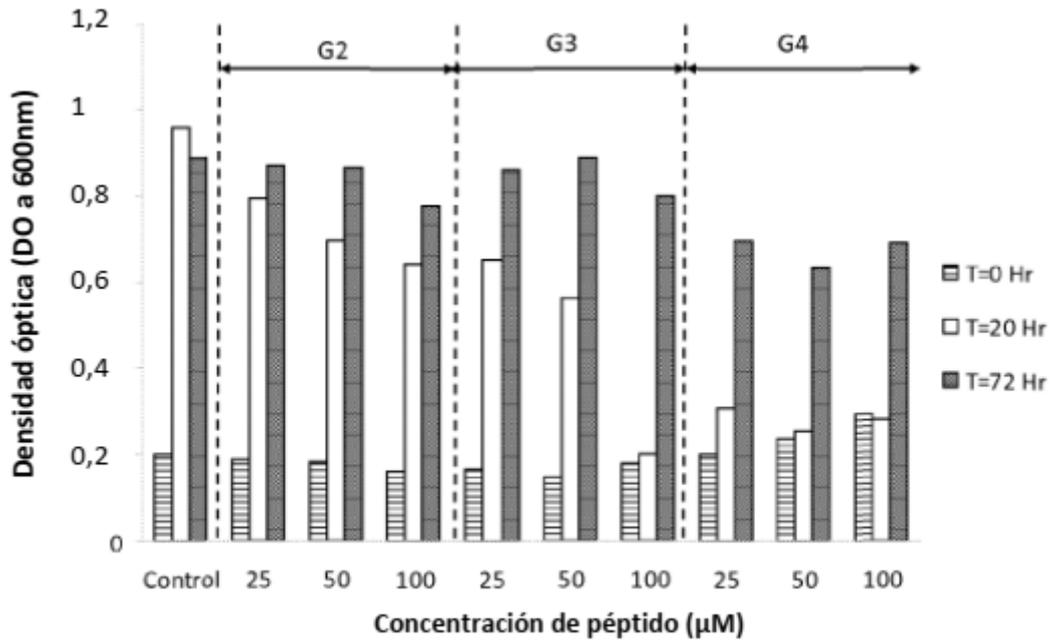


Figura 13a

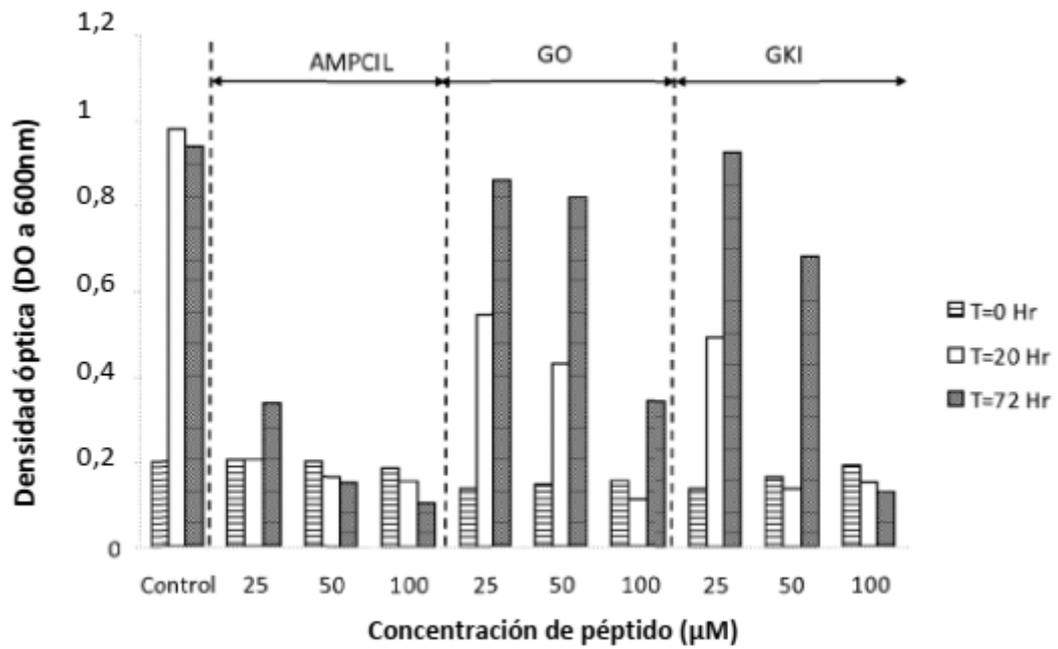


Figura 13b

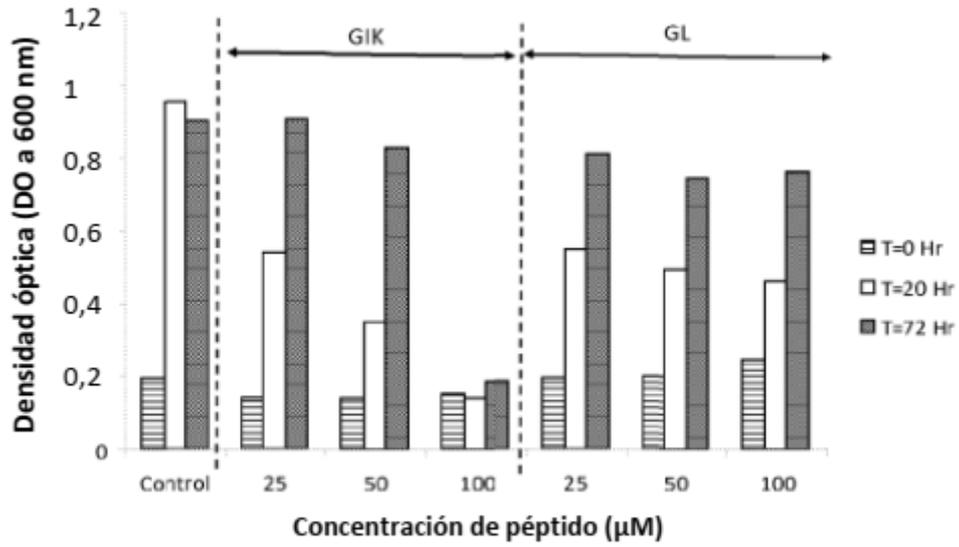


Figura 13c

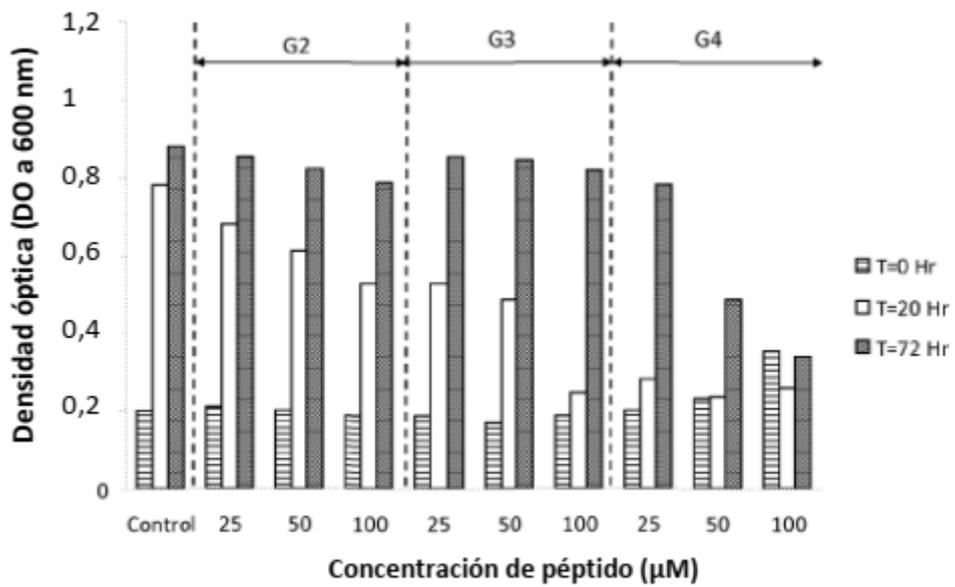


Figura 14a

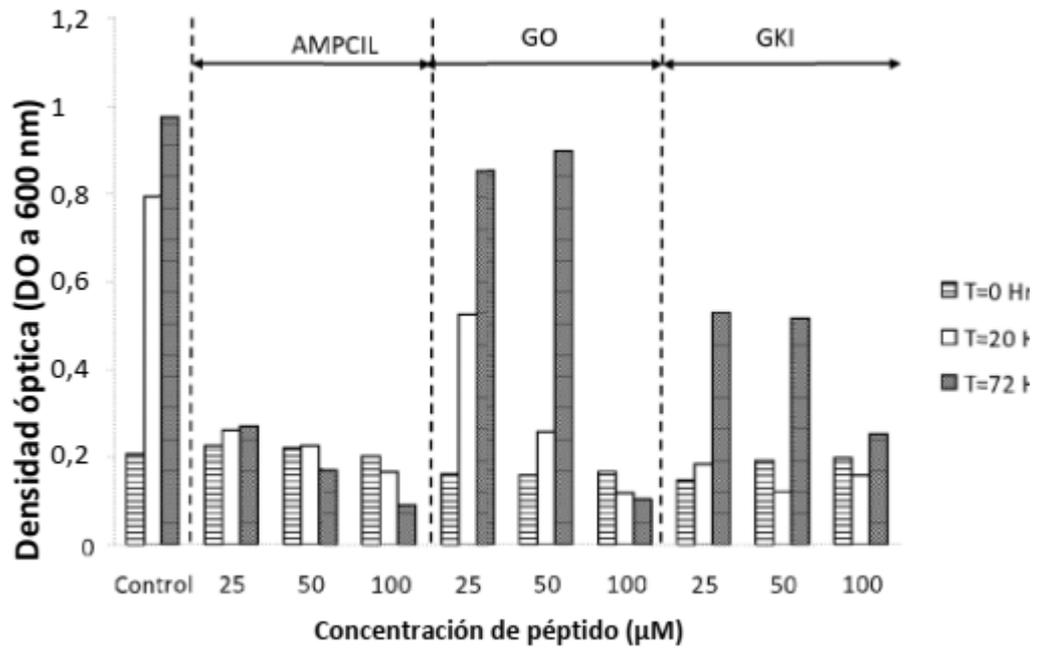


Figura 14b

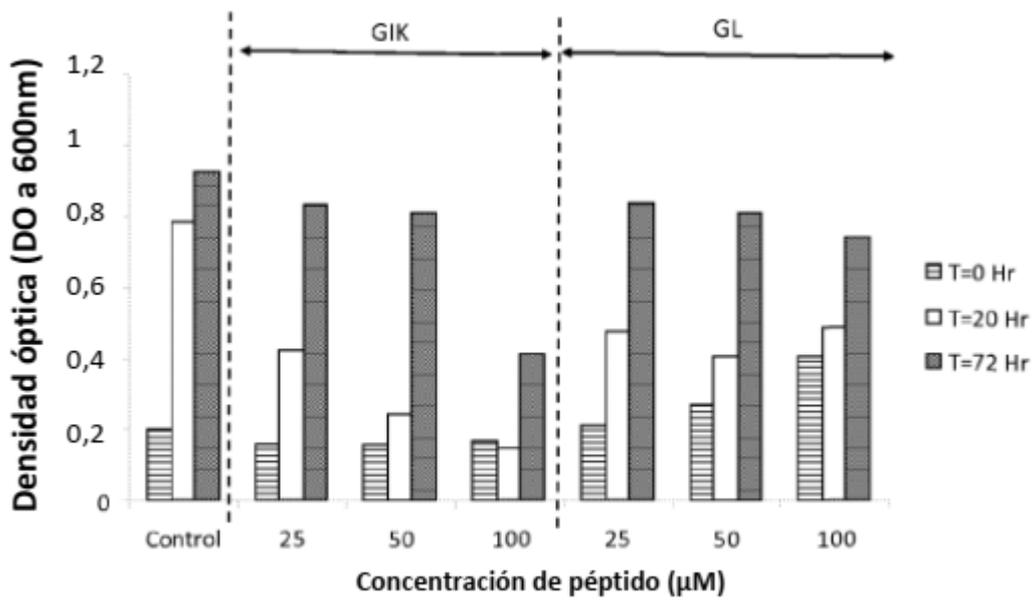


Figura 14c

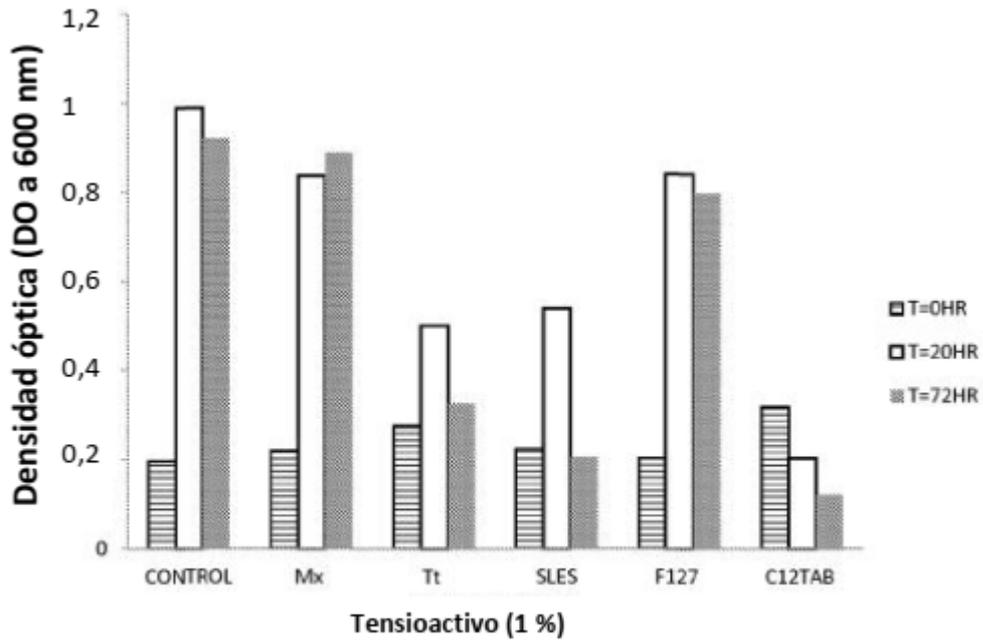


Figura 15

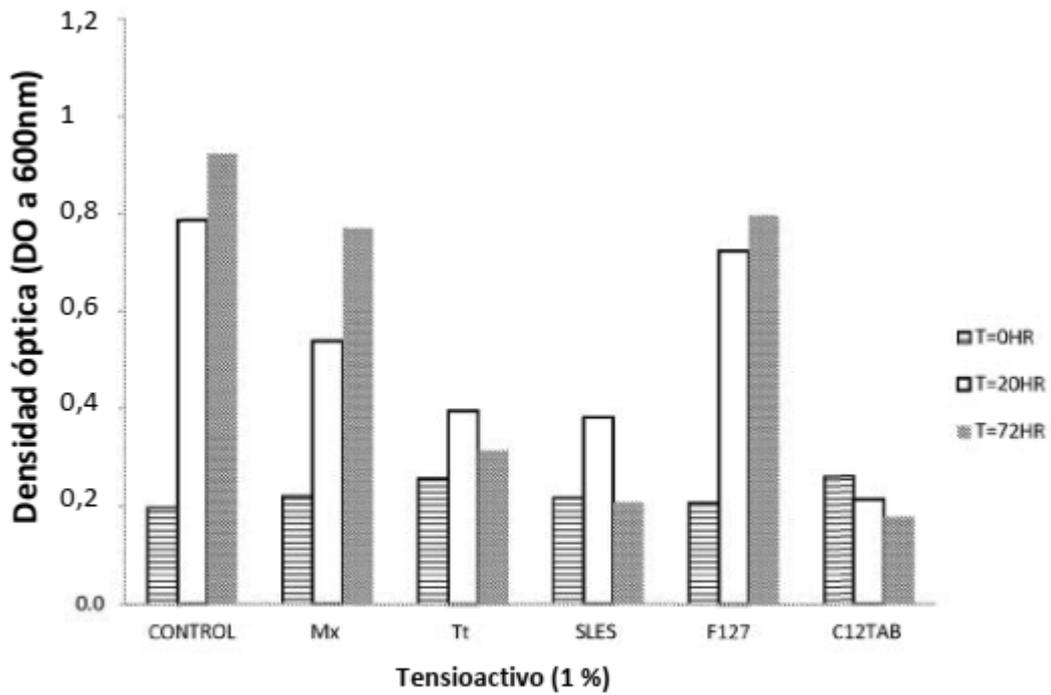


Figura 16

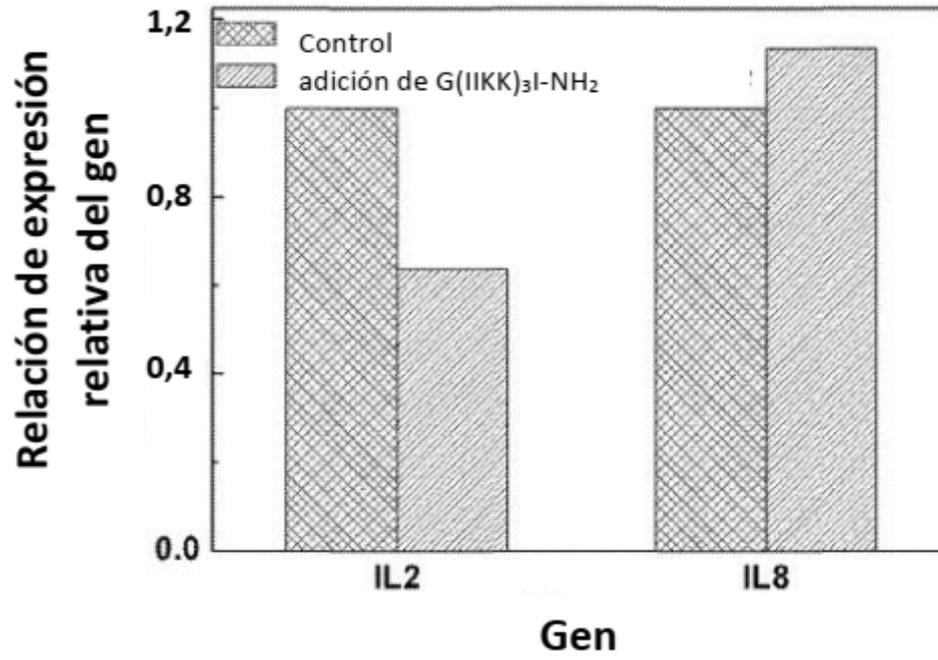


Figura 17