

PÉPTIDOS SINTÉTICOS ANTIMICROBIANOS PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES
CUTÁNEAS Y PROCESO PARA OBTENER LOS MISMOS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención consiste en péptidos que presentan actividad antimicrobiana. Más específicamente péptidos sintéticos que inhiben el crecimiento microbiano, incluyendo bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Además, se proporcionan composiciones antisépticas, farmacéuticas, que comprenden dichos péptidos, que podrían ser utilizadas en la industria agrícola y pecuaria así como también su uso en tratamientos de afecciones cutáneas en humanos y sus genes artificiales para ser utilizados en el desarrollo de organismos transgénicos o en terapia génica.

La presente invención se relaciona con péptidos antimicrobianos (AMP) se consideran fármacos candidatos plausibles a medida que se dirigen específicamente y alteran las membranas celulares microbianas, causando la muerte por lisis celular, ante la rápida aparición de bacterias resistentes a los medicamentos y la falta de nuevos antibióticos en el mercado, la tecnología objetivo de la presente búsqueda puede ser producida industrialmente y con fines comerciales.

DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

El uso de antibióticos ha reducido la incidencia de infecciones y muertes causadas por bacterias en todo el mundo. Sin embargo, el uso permanente de los antibióticos ha resultado en la aparición de microorganismos resistentes, tanto en hospitales como fuera de ellos. En los últimos 30 años solamente 2 clases de antibióticos han entrado al mercado, las oxazolidinones (linezolid) y el lipopéptido cíclico daptomicina, sin embargo se ha reportado de manera casi inmediata la resistencia a los mismos (Walsh CT, Wencewicz TA. 2014. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. The Journal of Antibiotics. 67:7–22). Recientemente la Organización Mundial de la Salud ha reportado el problema mundial de resistencia generado por especies de bacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Shigella* spp. y *Neisseria gonorrhoea*, y todas ellas requieren nuevas moléculas para su control.

Ante la gran demanda de nuevos y más eficientes antimicrobianos, una alternativa de gran interés son los péptidos antimicrobianos derivados del sistema inmune de la mayoría de grupos de organismos en la escala evolutiva. De igual manera, y a partir de aquellos péptidos con actividad antimicrobiana encontrados en diferentes organismos y variedades de plantas, se han construido bases de datos especializadas a partir del año 2002, en las que se encuentran reportados los diferentes péptidos antimicrobianos, entre ellos péptidos derivados de camarones, invertebrados y de diversas plantas.

La mayoría de los péptidos antimicrobianos son policatiónicos y anfipáticos, con tendencia a formar hélices alfa en medios hidrofóbicos, todos ellos derivados del sistema inmune de diversos organismos. Dentro de la categoría de péptidos policatiónicos y anfipáticos también se encuentran péptidos sintéticos como los péptidos BTM-P1 y BTM-P4, de 26 y 33 aminoácidos respectivamente, con propiedades ionofóricas, antimicrobianas antitumorales e insecticidas (Lemeshko V.V. et al. 2006. Synthetic peptide having an ionophoric and antimicrobial activity. U.S. Patent No. 7,041,647; Orduz S, Lemeshko V.V. 2016. Péptido sintético policatiónico como agente ionofórico, antimicrobiano, antitumoral e insecticida), derivados de la toxina microbiana Cry11Bb (Orduz S. et al. 1998. Sequence of the Cry11Bb gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and toxicity analysis of its encoded protein. Biochem. Biophys. Acta. 1388: 267-272).

Aunque la mayoría de los péptidos antimicrobianos reportados provienen del sistema inmune de diversos organismos, las aproximaciones bioinformáticas para el diseño de péptidos antimicrobianos se han empleado recientemente a partir del análisis de genomas (Amaral A. et al. 2012. Predicting antimicrobial peptides from eukaryotic genomes: in silico strategies to develop antibiotics. Peptides. 37: 301–308) o del estudio de proteínas (Torrent M. et al. 2012. AMPA: an automated web server for prediction of protein antimicrobial regions. Bioinformatics. 28: 130–131). Sin embargo, una alternativa adicional es el desarrollo de herramientas bioinformáticas que permitan el estudio de secuencias de proteínas no relacionadas con el sistema inmune para determinar regiones con potencial antimicrobiano (Betancur A. et al., 2013. Protein-Check 1.0. Programa para analizar secuencias de proteínas y seleccionar regiones con propiedades particulares. Dirección Nacional de Derechos de Autor. Ministerio del Interior. Registro 13-39-275 del 2 de Octubre de 2013; Sánchez Y. et al., 2015. Peptide ID 1.0. Un programa para buscar potenciales péptidos bioactivos en secuencias de proteínas. Dirección Nacional de

Derechos de Autor. Ministerio del Interior. Registro 13-50-213 del 12 de Noviembre de 2015).

Considerando los efectos que conlleva el diseño de un péptido catiónico, se han divulgado diversos documentos de patentes que exponen las virtudes y ventajas de dichos péptidos en el tratamiento de infecciones bacterianas. Un ejemplo de ello, es el documento de patente US2003171281A que discute composiciones y métodos para elaborar y utilizar formulaciones terapéuticas de péptidos catiónicos antimicrobianos. Este documento divulga formulaciones de péptidos catiónicos antimicrobianos que pueden ser usados, por ejemplo, en el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos, que las infecciones pueden ser sistémicas, tales como una septicemia, o pueden ser localizados, como en el acné o un dispositivo médico implantado o permanente. Sin embargo, dicho documento indica que el péptido catiónico antimicrobiano es una indolicidina o un análogo o derivado del mismo y está referido a una composición que comprende un péptido y no al péptido directamente.

Asimismo, otros documentos académicos han divulgado diversas investigaciones que demuestran que los péptidos antimicrobianos catiónicos tienen una amplia gama de objetivos, entre los que se encuentran virus con revestimientos, bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, hongos, parásitos tales como tripanosomas y plasmodios, e incluso células de cáncer (Hancock RE, Diamond G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. Trends Microbiol. 8(9):402-410). De igual manera indican que el favorecimiento hacia péptidos relativamente no tóxicos parece ser la composición lipídica de la membrana diana (péptidos selectivos tienden a preferir las membranas que tienen una superficie cargada negativamente y están libres de colesterol) y la posesión, por el organismo susceptible al péptido, de un gran potencial eléctrico transmembranal (orientado negativo interno). De esta manera, el diseño y obtención de nuevos péptidos antimicrobianos catiónicos es una rama emergente de biotecnología actual.

De igual manera el artículo científico de Menousek et al. (2012. Database screening and in vivo efficacy of antimicrobial peptides against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300. Int J Antimicrob Agents. 2012. 39(5):402-406, muestra que los péptidos antimicrobianos naturales (AMP) son candidatos prometedores para el desarrollo de una generación de nuevos antimicrobianos para afrontar el reto de los patógenos resistentes a

los antibióticos como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). Las modificaciones de los mismos permite encontrar nuevos péptidos que pueden llegar a tener mayor actividad antimicrobiana. En éste documento se identificaron nuevos péptidos activos contra MRSA mediante el cribado de 30 péptidos seleccionados de la base de datos APD. Seis péptidos, incluyendo ascaphin-8, y el péptido antimicrobiano 1 - seleccionados de base de datos, (DASamP1), DASamP2, lycotoxin I, maculatin 1,3 y piscidin 1, podían ejercer una potente actividad antimicrobiana contra SARM USA300. Cinco de los seis péptidos sintetizados mostraron amplio espectro de actividad antibacteriana frente a un número amplio de bacterias. Además, el péptido sintético que presentó mayor actividad (DASamP1) suprime la formación temprana de biopelículas en un modelo de infección en ratón por SARM asociada a catéter. Sin embargo, este documento no indica específicamente que el péptido se caracteriza por contener segmentos encriptados de proteínas de soya ni la influencia de la longitud del péptido sobre la actividad antimicrobiana.

Mechkarska et al. 2013 divulgan un nuevo péptido análogo del péptido de defensa del huésped Hymenochirin-1B, el cual es un péptido catiónico, anfipático, helicoidal, aislado por primera vez de las secreciones de la piel de la rana de uñas del Congo *Hymenochirus boettgeri* (Pipidae) (An analog of the host-defense peptide hymenochirin-1B with potent broad-spectrum activity against multidrug-resistant bacteria and immunomodulatory properties. Peptides. 50:153-159). En el presente artículo se investigó la relación estructura-actividad para distintos péptidos análogos sintetizados, en donde los aminoácidos Pro5, Glu6 y Asp9 ubicados en la cara hidrófila de la hélice están sustituidos por una o más L-lisinas o residuos de D-lisinas. Aunque el reemplazo con L-lisina genera análogos con una mayor potencia antimicrobiana contra una gama de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (hasta 8 veces), los péptidos son más hemolíticos. El aumento de la cationicidad de hymenochirin-1B, mientras reduce la helicidad por sustituciones con D-lisina, genera análogos que son entre 2 y 8 veces más potentes que el péptido nativo y son igualmente o menos hemolíticos. El péptido sintético hymenochirin-1B representa un candidato para el desarrollo de fármacos, ya que muestra una elevada potencia frente a aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (SARM) y una gama de bacterias Gram-negativas, incluyendo cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia*, entre otras. No obstante, este documento menciona que se parte de un péptido nativo aislado por primera vez de las secreciones de la piel de la rana de uñas del Congo *Hymenochirus boettgeri*.

Otro documento frecuentemente referenciado es el publicado por Ying et al., 2015 (A head-to-head comparison of the antimicrobial activities of 30 ultra-short antimicrobial peptides against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. Int J Pept Res Ther. 21:21-28), donde se discute que para superar la inestabilidad de los péptidos frente a las proteasas plasmáticas que pueden limitar su potencial para un mayor desarrollo de fármacos es posible identificar y desarrollar péptidos lineales muy cortos como agentes tópicos para el tratamiento de infecciones de piel y tejidos blandos. El estudio de la literatura publicada produjo 30 AMPs ultracortos hasta de 9 residuos de longitud con actividad antimicrobiana. Ellos fueron sintetizados comercialmente y una comparación de actividad antimicrobiana de cabeza a cabeza se llevó a cabo sobre los patógenos más comunes de la piel, incluyendo *Staphylococcus aureus* metilicina-resistente, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. El antibiótico de amplio espectro gentamicina y el antifúngico nistatina se incluyeron como controles. Los resultados experimentales mostraron sólo 2 péptidos con actividades de amplio espectro potentes: el octapéptido IRIRIRIR-NH₂ y el nona-péptido Ac-KWRRWVRWI-NH₂ exhibieron CIM de 6,25 µM contra todos los microorganismos estudiados. Sin embargo, estos péptidos ya se encontraban divulgados en documentos anteriores y no se establece la incidencia de la longitud de los mismos sobre su actividad antimicrobiana y las posibles desventajas asociadas por ser péptidos lineales muy cortos.

En vista de lo anterior, varios autores han reportado en el estado de la técnica que los péptidos catiónicos antimicrobianos son un componente importante de la defensa innatas de todas las especies de vida. Diferentes péptidos pueden tener propiedades antibacterianas, antibiótico potenciadora o propiedades antifúngicas, por lo que se están desarrollando para su uso como una nueva clase de agentes antimicrobianos y como la base para la fabricación de plantas y animales transgénicos resistentes a las enfermedades. De manera que la mayoría de los péptidos antimicrobianos reportados provienen del sistema inmune de organismos de toda la escala evolutiva. Sin embargo, el costo de búsqueda de este tipo de moléculas por medio de la bioprospección tradicional es muy elevado y altamente demandante en tiempo y puede tomar de 3 a 4 años para obtener candidatos líderes para entrar en la fase preclínica.

Considerando las desventajas de la bioprospección tradicional y la ausencia de nuevos antibióticos que reduzcan la incidencia de infecciones microbianas, surge la necesidad de nuevos péptidos antimicrobianos catiónicos que además puedan ser empleados en composiciones farmacéuticas en el tratamiento de enfermedades infecciosas, en composiciones antisépticas para ser usadas en humanos, en la industria alimentaria, agrícola y pecuaria, y principalmente que no provengan del sistema inmune de organismos.

Considerando el problema técnico anteriormente descrito, la presente invención ofrece nuevos péptidos sintéticos antimicrobianos catiónicos de no más de 15 aminoácidos con prominente actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Los péptidos de la presente invención mostraron actividad frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *P. aeruginosa* (ATCC 9027). Adicionalmente, los péptidos de la presente invención tienen una porción sustancialmente hidrofílica con una cara positiva y otra sustancialmente hidrofóbica. Los péptidos de la presente invención pueden adoptar una conformación de alfa-hélice en un medio de hidrofobicidad creciente y en el medio hidrofóbico de una membrana celular. La conformación puede tener una cara predominantemente hidrofóbica a lo largo de la estructura helicoidal e hidrofílica en la opuesta. De igual manera, los péptidos de la presente invención también presentan actividad biológica contra hongos, parásitos y células tumorales.

DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA INVENCION

Los péptidos sintéticos de la presente invención, P3-B y P3-C están compuestos de 15 aminoácidos, con la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 1: P3-B y SEQ ID No. 2: P3-C, nótese que los péptidos están amidados en la región carboxi-terminal. Los aminoácidos que conforman los péptidos P3-B y P3-C pueden estar completa o parcialmente en configuración D o L, o cualquier combinación de éstos, donde al menos una porción podría adquirir una conformación de alfa hélice. La existencia natural de estos péptidos en microorganismos, plantas o animales no ha sido reportada en la literatura científica o en patentes de invención. Los datos que se suministran indican que los péptidos P3-B y P3-C son un nuevo factor bactericida. Por su probada actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, los péptidos P3-B y P3-C se constituyen como péptidos antimicrobianos. Los péptidos tienen una porción sustancialmente hidrofílica con una cara positiva y otra sustancialmente hidrofóbica. Los péptidos pueden adoptar una

conformación de alfa-hélice en un medio de hidrofobicidad creciente y en el medio hidrofóbico de una membrana celular. La conformación puede tener una cara predominantemente hidrofóbica a lo largo de la estructura helicoidal e hidrofílica en la opuesta. De igual manera, los péptidos de la presente invención también presentan actividad biológica contra hongos, parásitos y células tumorales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1 A. Actividad antimicrobiana de los péptidos. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de *S. aureus* después de 4 h de incubación. Control de crecimiento de *S. aureus*.

Figura 1 B. Actividad antimicrobiana de los péptidos. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de *S. aureus* después de 4 h de incubación con el péptido P3-C a 12 μ M. Nótese los daños en las membranas indicados por las flechas y los restos de células muertas, arriba y abajo a la izquierda.

Figura 2 A. Actividad antimicrobiana de los péptidos. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de *P. aeruginosa* después de 4 h de incubación. Control de crecimiento de *P. aeruginosa*.

Figura 2 B. Actividad antimicrobiana de los péptidos. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de *P. aeruginosa* después de 4 h de incubación con el péptido P3-B a 20 μ M. Nótese los daños en las membranas indicados por las flechas y los restos de células muertas diseminados por toda la figura.

Figura 2 C. Actividad antimicrobiana de los péptidos. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de *P. aeruginosa* después de 4 h de incubación con el péptido P3-C a 3 μ M. Nótese los daños en las membranas indicados por las flechas y los restos de células muertas diseminados por toda la figura.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Considerando el problema técnico anteriormente planteado, en la presenta invención se han empleado herramientas bioinformáticas que permiten la búsqueda de péptidos policatiónicos con propiedades fisicoquímicas similares a los péptidos antimicrobianos a partir del análisis de secuencias de cualquier proteína, no relacionadas con el sistema inmune de los organismos. Uno de ellos es Pepdide ID 1.0 (Sánchez Y. et al., 2015. Peptide ID 1.0. Un programa para buscar potenciales péptidos bioactivos en secuencias de proteínas. Dirección Nacional de Derechos de Autor. Ministerio del Interior. Registro 13-50-213 del 12 de Noviembre de 2015). Después del análisis de 100 proteínas escogidas al azar provenientes del proteoma de organismos representativos de la escala evolutiva con el software Peptide ID 1.0, se encontraron 640 secuencias de péptidos con potencial actividad antimicrobiana. Aplicando filtros adicionales como hidrofobicidad media, momento hidrofóbico relativo, carga y ángulo polar, se seleccionaron 5 secuencias. Tres de ellas fueron modificadas manualmente con cambios conservativos y semiconservativos que incluyeron sustituciones, eliminaciones, adiciones e intercambios para mejorar la distribución catiónica, el ángulo polar, la hidrofobicidad y otros parámetros determinantes.

Finalmente se obtuvieron las secuencias de aminoácidos P3-B (SEQ ID No. 1) y P3-C (SEQ ID No. 2: P3-C), que fueron amidados en la región carboxi terminal. Éste proceso de selección demoró solamente 4 meses. Se determinó, mediante ensayos in vitro su potencial antimicrobiano. La actividad antimicrobiana medida en términos de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de éstos dos péptidos estuvo entre 3 y 23 μ M, lo cual es altamente competitivo comparado con otros péptidos reportados.

El término “antimicrobiano”, se refieren a que el péptido puede inhibir, prevenir o destruir el crecimiento o proliferación de los microorganismos aquí presentados, entre otros.

Los péptidos P3-B y P3-C tienen carácter anfipático lo cual les permite formar una estructura helicoidal cuando se une al ambiente hidrofóbico de las membranas biológicas. La carga catiónica (positiva) del péptido P3-B está determinada por los aminoácidos localizados en las posiciones 4, 5, 8, 9 y 12 y el aminoácido 15 está amidado, por lo tanto,

el total de carga positiva es de “más seis” (+6). En este péptido (P3-B), el residuo de aminoácido 7 es hidrofílico, mientras que los residuos de aminoácidos 1, 2, 3, 6, 10, 11, 13, 14 y 15 son hidrofóbicos, siendo el porcentaje de hidrofobicidad de 60%. El peso molecular del péptido P3-B es 1750.248 Daltons; el momento hidrofóbico relativo es de 0,54; el ángulo polar es de 160; el índice de Boman es de 1.47 kcal/mol y contiene 7 aminoácidos hidrofóbicos en la misma superficie.

La carga catiónica (positiva) del péptido P3-C está determinada por los aminoácidos localizados en las posiciones 4, 5, 8, 9 y 12 y el aminoácido 15 está amidado, por lo tanto, el total de carga positiva es de “más seis” (+6). En el péptido (P3-C), el residuo de aminoácido 7 es hidrofílico, mientras que los residuos de aminoácidos 1, 2, 3, 6, 10, 11, 13, 14 y 15 son hidrofóbicos, siendo el porcentaje de hidrofobicidad de 60%. El peso molecular del péptido P3-C es 1823.301 Daltons; el momento hidrofóbico relativo es de 0,56; el ángulo polar es de 160; el índice de Boman es de 1.64 kcal/mol y contiene 7 aminoácidos hidrofóbicos en la misma superficie.

El término "contacto" mencionado en la sección de ensayos antimicrobianos, hace referencia a la exposición de los organismos a los péptidos, de manera que éste efectivamente permeabilice la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, Gram-positivas matándolas. El contacto puede ser in vitro, por ejemplo por la adición del péptido a cultivos celulares para probar la susceptibilidad de las células al péptido.

Ejemplos de bacterias que pueden morir o inhibir su crecimiento mediante los péptidos P3-B y P3-C incluyen, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros.

De acuerdo con los datos presentados más adelante, los péptidos designados como P3-B y P3-C pueden contactar células bacterianas y matarlas debido a una alta actividad a nivel de la membrana celular. Las células incluyen tanto microorganismos Gram-positivos como Gram-negativos.

Los péptidos P3-B y P3-C tienen 15 aminoácidos, con la secuencia de aminoácidos P3-B (SEQ ID No. 1) y P3-C (SEQ ID No. 2), nótese que los péptidos están amidados en la región carboxi terminal, los aminoácidos pueden estar completa o parcialmente en configuración D o L, o cualquier combinación de éstos, donde al menos una porción podría alinearse en una conformación de alfa hélice. Los péptidos tienen una porción sustancialmente hidrofílica con una carga positiva y otra sustancialmente hidrofóbica. Los péptidos pueden adoptar una conformación de alfa-hélice en un medio de hidrofobicidad creciente y en el medio hidrofóbico de una membrana celular. La conformación puede tener una cara predominantemente hidrofóbica a lo largo de la estructura helicoidal e hidrofílica en la opuesta.

La expresión “derivados de los mismos” hace referencia, como es bien sabido en el área técnica a la cual pertenece la presente invención, al hecho que pueden llevarse a cabo sustituciones menores de aminoácidos de los péptidos que no afectan o no afectan sustancialmente la función de los péptidos aquí mencionados. Tales sustituciones pueden ser llevadas a cabo mediante procedimientos bien conocidos por la persona versada en la materia. Así, todos los péptidos que tengan sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos con una homología de al menos 80% y sustancialmente la misma actividad antimicrobiana, están dentro del alcance de esta invención. Igualmente, todos los genes que tengan secuencias de nucleótidos y que sustancialmente codifiquen para la misma secuencia de los péptidos P3-B y P3-C, SEQ ID: 1, y SEQ ID: 2, respectivamente, y que tengan sustancialmente la misma actividad antimicrobiana, están dentro del alcance de esta invención.

Dentro del alcance de la presente invención también están las sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos de esta invención. Estas sales son formadas por métodos bien conocidos por la persona versada en la materia. Así, cuando en la presente solicitud se emplee el término péptido, se pretende indicar que el mismo también incluye tanto los derivados como las sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos, en su configuración completa o parcialmente D o L o cualquier combinación de las mismas.

De igual manera, los péptidos de la presente invención pueden ser formulados para su uso en medicina humana, veterinaria o en agricultura, para uso profiláctico o terapéutico. Las

composiciones farmacéuticas que incluyen los péptidos de la presente invención pueden ser administradas de manera tópica, por vía oral, rectal y parenteral, eligiendo en cada caso los vehículos o transportadores farmacéuticamente aceptables más adecuados dependiendo de la forma de dosificación elegida. Ejemplos de formulaciones del péptido pueden ser tabletas, grageas, suspensiones orales, suspensiones inyectables, soluciones inyectables, formulaciones para aplicación tópica, entre otros.

Considerando que los péptidos de la presente invención también presentan actividad biológica contra hongos, parásitos y células tumorales, dentro del alcance de la presente invención también se incluyen formulaciones que comprendan los péptidos divulgados en conjunto con excipientes farmacéuticamente aceptables dependiendo del tipo de tratamiento y la diana específica que se desee atacar.

Así mismo, los péptidos de la presente invención pueden ser incluidos en la preparación de un hidrogel, empleando como polímero base un derivado de celulosa, que presenta entre otras ventajas que muestran un alto contenido de agua y una buena absorción de líquidos, no son alergénicos y pueden esterilizarse con seguridad. Este hidrogel puede contener adicionalmente bloques hidrofílicos poliméricos formados por ejemplo, de polietilenglicol (PEG) en presencia de una cantidad aceptable de una sal como cloruro de sodio, empleando un solvente acuoso. En una realización preferida, dicho hidrogel puede contener entre 0.00045 y 0.0054% p/p de uno de los péptidos de la presente invención, entre 1 y 3.25% p/p del derivado de celulosa, entre 5 y 10% p/p de un bloque hidrofílico polimérico y 0.9% p/p de una sal en presencia de un solvente acuoso.

Igualmente, los péptidos de la presente invención pueden ser empleados mediante la síntesis de genes artificiales que codifiquen para los péptidos de esta invención y que sean expresados por medios ampliamente conocidos. Con respecto al término “expresión de genes por medios ampliamente conocidos”, es bien sabido en el área técnica a la cual pertenece la presente invención, que pueden llevarse a cabo sustituciones de nucleótidos de los genes artificiales que no afectan o no afectan sustancialmente la expresión de los péptidos aquí mencionados. Tales sustituciones pueden ser llevadas a cabo mediante procedimientos bien conocidos por personas versadas en la materia. Así, todos los genes que tengan sustancialmente la misma secuencia de nucleótidos y su expresión demuestre

sustancialmente la misma actividad antimicrobiana están dentro del alcance de esta invención, por ejemplo, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9 y SEQ ID No. 10.

Para que la invención aquí descrita se pueda entender completamente, se ilustran los siguientes métodos y ejemplos. Debe entenderse que estos métodos y ejemplos tienen el único propósito de ser ilustrativos y no para ser interpretados de ninguna manera como limitantes de esta invención.

Método 1. Síntesis química de los péptidos.

Los péptidos se sintetizaron en fase sólida (Merrifield B. 1963. Solid phase peptide synthesis, Journal of the American Chemical Society. 85:2149-2154; Houghten R.A. 1985. General methods for the rapid solid phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen antibody interaction at the level of individual amino acids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:5131-5135), con buenas prácticas de manufactura (GMP). Se utilizó una resina p-metil-benzhidrilamina (MBHA) (0,7 meq/g) y aminoácidos t-boc (Bachem, EE.UU.) en el proceso descrito en Andreu D. et al. 1983. Solid-phase synthesis of Cecropin A and related peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:6475-6479. Una vez sintetizado, el péptido se extrajo con 10% de ácido acético y agua. El péptido fue purificado por HPLC en fase reversa y se analizó por MALDI-TOF. El péptido se disolvió en agua bidestilada a 1 mg/ml y se liofilizó.

Método 2. Síntesis del péptido por biotecnología.

Una vez determinada la secuencia genética que codifica para los péptidos de la invención, las secuencias completas de nucleótidos se sintetizan e integran a un vector de expresión, el cual se usa para transformar la bacteria *Escherichia coli*. Para la selección de las bacterias transformadas se realiza un cultivo en agar LB suplementado con antibióticos. La transformación de las colonias sobrevivientes se confirma mediante la técnica de PCR. La expresión del gen se induce con isopropil-b-d-thio-galactopyranoside (IPTG). Los péptidos se purifican del sobrenadante mediante columnas cargadas con Ni^{2+} . La secuencia de aminoácidos se confirma con análisis de espectrometría de masas. El protocolo es similar al realizado por Tapia E, et al. 2011. Expression of an optimized *Argopecten purpuratus* antimicrobial peptide in *E. coli* and evaluation of the purified recombinant protein by in vitro challenges against important plant fungi. Peptides. 32(9):1909–16.

Método 3. Determinación de secuencias genéticas que codifican los péptidos de la presente invención.

Para el diseño de los genes artificiales se realizó una búsqueda bajo el criterio de similitud de la secuencia de los péptidos P3-B y P3-C con otros péptidos reportados en la base de datos del NCBI (Genbank), mediante la aplicación BLASTp. De los resultados obtenidos, se seleccionaron 30 secuencias de péptidos con valor $e < 0.7$, los cuales fueron agrupados según su grupo taxonómico (bacterias, hongos, plantas y animales), con el fin de determinar los patrones de uso de codones entre ellos, para lo cual se utilizó el software Mega 5.0 (Tamura K. et al. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599). Para la construcción de la secuencia genética se eligieron los codones de mayor frecuencia por aminoácido entre cada grupo taxonómico.

Método 4. Ensayos de actividad antimicrobiana

Para evaluar la actividad antibacteriana de los dos péptidos de esta invención, se escogieron cepas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), las bacterias se cultivaron en caldo Luria Bertani (LB) durante la noche, con agitación, a 37°C. Al día siguiente se ajustó la densidad óptica (DO) a 600 nm entre 0,75 y 0,8 para cada cultivo, correspondientes a aproximadamente 1×10^8 UFC/ml. A continuación, cada cultivo se diluyó a 1×10^3 o 1×10^5 . Se dispensaron 125 µl de cada cultivo en placas estériles de 96 pozos, se añadieron 50 µl del péptido a una concentración final de 5 µM. Las placas se incubaron a la temperatura adecuada (37°C) durante tres horas. Después de este tiempo se añadieron 120 µl de LB 3% a cada pozo y se incubaron de nuevo bajo las mismas condiciones durante 12 horas (Rathinakumar R. et al. 2009. Broad-spectrum antimicrobial peptides by rational combinatorial design and high-throughput screening: the importance of interfacial activity. J. Am. Chem. Soc. 131:7609-7617). Se hicieron tres repeticiones de cada tratamiento de los péptidos y además se incluyeron controles del ensayo. Las lecturas se realizaron en un lector de placas de ELISA a 600 nm. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de acuerdo con la metodología indicada, mediante el uso de diluciones seriadas de cada péptido en cada microorganismo. La CIM es la concentración más baja de los péptidos que causan un 100% de mortalidad de los microorganismos. Se realizaron tres repeticiones en tres ensayos independientes.

Método 5. Morfología de las células bacterianas

El efecto de los péptidos sobre la morfología bacteriana se evaluó de acuerdo con la metodología utilizada por O'Driscoll NH et al. 2013. Production and evaluation of an antimicrobial peptide-containing wafer formulation for topical application. Curr Microbiol. 2013; 66: 271–278, por microscopía electrónica de barrido (SEM). Los tratamientos con péptidos se realizaron usando cultivos bacterianos ajustados a 10^5 CFU/ml en placas de 96 pozos en dos experimentos. En el primer experimento, cada cultivo bacteriano se incubó con los péptidos en su CIM durante 24 horas a 37°C con agitación de 1 minuto a 90 rpm cada hora. En el segundo experimento, las bacterias se cultivaron sin el péptido y después de 7 horas de incubación a 37°C con agitación a 90 rpm, los cultivos se trataron con los péptidos en sus respectivas CIMs y se incubaron durante 4 h adicionales en las mismas condiciones. Como control de crecimiento, cada especie bacteriana se cultivó independientemente en caldo LB bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Después de la incubación, se filtraron 200 µl de cada suspensión de células bacterianas a través de membranas de celulosa estériles de 0,2 µm (Sartorius AG, Alemania) y se sumergieron en glutaraldehído 2,5% (v/v) en tampón de fosfato 0,2 M (pH 7,4). Posteriormente, las membranas se lavaron con tampón de fosfato y se deshidrataron secuencialmente durante 15 minutos en etanol a concentraciones de 30, 45, 60, 75, 96% y etanol absoluto. Los filtros se secaron críticamente en un secador SAMDRI-795 (Tousims Research Corp. Rockville, EE.UU.) a 31°C y 1072 PSI. Las muestras se cubrieron con una fina capa de oro en un equipo Denton Vacuum Desk IV (Denton Vacuum, LLC - USA) y se observaron en el microscopio electrónico de barrido JSM 6490 LV (JEOL, EE.UU.) en alto vacío. Se empleó un detector de electrones secundario para evaluar la morfología y la topografía de las muestras.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Actividad antimicrobiana de los péptidos sintetizados

La actividad antimicrobiana se evaluó por medio de ensayos en placas de 96 pozos con bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. El péptido P3-B mostró actividad contra *P. aeruginosa* y *E. coli* con valores de CIM de 20 y 23 µM, respectivamente; mientras que el péptido P3-C mostró actividad contra *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* a concentraciones

de 3, 12,5 y 12 μM , respectivamente. Otros péptidos no fueron activos a concentraciones menores o iguales a 25 μM (ver Tabla 1).

Tabla 1. Péptidos obtenidos en el análisis in silico y sus derivados con sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Se realizaron sustituciones, intercambios, eliminaciones y adiciones, de aminoácidos en los péptidos P1, P2 y P3. Se observa la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los péptidos antimicrobianos diseñados, P3-B y P3-C.

Nombre del péptido	Secuencia	Carga	<i>H</i> (%)	<i>Hm</i>	μHr	CIM (μM) <i>P. aeruginosa</i>	CIM (μM) <i>S. aureus</i>	CIM (μM) <i>E. coli</i>
P1	GKLLVKKIVSL VRSA-NH ₂	+ 5	53, 33	0.4 54	0,459	> 25	> 25	
P1-A	GKSLVKWIVK SVRKA	+ 5	53, 33	0,3 11	0,535	> 25	> 25	
P1-B	GKSLVKWIVK SVRKA-NH ₂	+ 6	46, 67	0,3 11	0,535	> 25	> 25	
P2	KVFTLFQARA QGKLMRI	+ 4	52, 94	0,4 51	0,301	> 25	> 25	
P2-A	KVWTLFRAA GKLMAK	+ 4	40, 00	0,4 73	0,472	> 25	> 25	
P2-B	KVWTLFRAA GKLMAK-NH ₂	+ 5	40, 00	0,4 73	0,472	> 25	> 25	
P3	AILRKATRRLV QLIVSG	+ 4	52, 94	0,4 6	0,42	> 25	> 25	
P3-A	RILAKATRRLV KLIVSG	+ 5	52, 94	0,4 1	0,46	> 25	> 25	
P3-B	AILRKATRRLV KLIV-NH ₂	+ 6	60, 00	0,4 7	0,54	20	> 25	23

P3-C	AIWRKATRRL VKLIV-NH ₂	+ 6	60, 00	0,5 0	0,56	3.0	12	12,5
P4	LRKATRRLVQ LIVSG	+ 4	46, 67	0,3 8	0,50	> 25	> 25	
P5	ATAILRKATRR LVQLI	+ 4	58, 82	0,4 9	0,44	> 25	> 25	

H, porcentaje de hidrofobicidad; *Hm*, hidrophobicidad media; μHr , relative hydrophobic momento hidrofóbico relativo; CIM, concentración inhibitoria minima.

Los resultados permiten concluir que los dos péptidos tiene gran afinidad para permeabilizar las membranas de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los dos péptidos se pueden usar dependiendo de un objetivo específico, a un tiempo largo o corto, para obtener un efecto relativamente permanente o temporal, como espermicida, antimicrobiano, antiparasitario, o antitumoral, por ejemplo. De igual manera los productos obtenidos por la expresión de los genes que codifican para los péptidos P3-B y P3-C.

Ejemplo 2. Preparación de un gel antimicrobiano para uso tópico.

Se empleó una formulación estándar de gel acuoso para aplicación tópica, basada en la que reporta Ballweber LM et al., 2002. In vitro microbicidal activities of Cecropin peptides D2A21 and D4E1 and gel formulations containing 0.1 to 2% D2A21 against *Chlamydia trachomatis*. Antimicrob. Agents Chemother. 46(1):34–41, para evaluar péptidos con la siguiente composición, hidroxietilcelulosa 1%, NaCl 0.9%, propilenglicol 5%, empleando agua estéril como solvente. Una vez preparado el gel, se envasó, se esterilizó en autoclave y se mantuvo refrigerado hasta el momento de los ensayos. Se determinó la CMI para cada uno de los péptidos de acuerdo a la metodología expuesta en la sección método 1.

Ejemplo 3. Actividad antimicrobiana del hidrogel

El gel que se formuló como base matriz para la determinación de la CMI de los péptidos P3-B y P3-C tuvo un pH entre 6 y 7 y una densidad de 0,9 g/ml. En términos organoléptico,

su aspecto fue de un gel semiviscoso, traslúcido y homogéneo con buena extensibilidad y evanescencia al tacto.

La CIM de cada hidrogel conteniendo los péptidos P3-B y P3-C como ingrediente activo no varió de manera sustancial con respecto a las realizadas en los ensayos sin la formulación (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración inhibitoria mínima (CIM) de los péptidos P3-B y P3-C incorporados en los hidrogeles sobre los microorganismos *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Microorganismo	Péptido	CMI en hidrogel (μM)
<i>P. aeruginosa</i>	P3-B	22,5
<i>P. aeruginosa</i>	P3-C	3,0
<i>S. aureus</i>	P3-C	15