NUEVAS MOLÉCULAS ANTIMICROBIANAS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuentra en el campo de la bioquímica, específicamente en diseño, síntesis y caracterización de nuevos Péptidos con Actividad Antimicrobiana (PAMs) y antiparasitaria, y con baja actividad hemolítica.

DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

Durante las últimas décadas, el aumento exponencial de infecciones comunitarias y nosocomiales, así como la reemergencia de este tipo de enfermedades, se debe principalmente a la resistencia que desarrollan muchos microorganismos; entre las causas que han favorecido el vertiginoso aumento de la resistencia se encuentran el uso indiscriminado, incorrecto e irracional, y la automedicación de los antibióticos convencionales. Por lo tanto, surge la necesidad de buscar nuevos compuestos que inhiban de manera efectiva los agentes infecciosos. Entre éstos, los PAMs constituyen una alternativa prometedora como agentes terapéuticos frente a microorganismos patógenos.

Los PAMs están implicados en la inhibición del crecimiento celular y en la muerte de diferentes microorganismos, tales como bacterias, hongos, virus, protozoos y parásitos. En este contexto, los PAMs se han convertido en agentes antimicrobianos muy prometedores, mostrando un amplio espectro de actividad antibacteriana. Esta clase de moléculas presentan un mecanismo de acción que incluye el ataque a diferentes dianas del microorganismo. Por lo tanto, se dificulta el desarrollo de resistencia microbiana. Además, exhiben alta eficacia en concentraciones muy bajas, alta especificidad y acción sinérgica con antibióticos clásicos. Los PAMs se han convertido en la base para la producción de análogos químicos, que han sido diseñados, sintetizados químicamente y evaluados *in vitro* para determinar su actividad antimicrobiana.

El documento US6337317B1 proporciona una clase de péptidos catiónicos similares a la polifemusina que tienen actividad antimicrobiana. Ejemplos de tales péptidos incluyen las secuencias FRWCFRVCYKGRCRYKCR (SEQ ID NO: 3), RRWCFRVCYKGFCRYKCR (SEQ ID NO: 4), y RRWCFRVCYRGRFCYRKCR (SEQ ID NO: 11). Estos péptidos se obtienen a partir de polifemusinas, que son péptidos aislados a partir del cangrejo herradura del atlántico *Limulus polyphemus*, y taquiplexinas, aisladas de *Tachypleus tridentatus*, *Tachypleus gigas* y *Carcinoscorpius rotundicauda*, caracterizados por contener 18 y 17 residuos de aminoácidos de longitud, respectivamente. También se proporcionan métodos para inhibir el crecimiento de microorganismos tales como bacterias, levaduras y virus que han sido expuestos a los PAMs de la invención. Los PAMs descritos en el documento son particularmente útiles para inhibir el crecimiento de los microorganismos y tienen una acción citotóxica sobre bacterias, hongos, algunos parásitos y virus.

El documento US7846895B2 divulga la composición de un Péptido Antimicrobiano Selectivamente Dirigido (STAMP, por sus siglas en inglés) conformado por un péptido dirigido y un péptido antimicrobiano, que se encuentran unidos covalentemente mediante un enlazador peptídico. El Péptido Antimicrobiano Selectivamente Dirigido que se une a *Streptococcus mutans*, presenta la secuencia de aminoácidos TFFRLFNRSFTQALGK (SEQ ID NO: 2) y está unida a un PAM caracterizado por la secuencia KNLRIIRKGIHIIKKY (SEQ ID NO: 3). Estos dos se encuentran unidos por otro péptido enlazador caracterizado por la secuencia GGG (SEQ ID NO: 17). En una realización, el péptido antimicrobiano de acuerdo con la presente invención comprende entre 2 a 100 aminoácidos, entre 5 a 50, o entre 7 a 20.

Por otro lado, el documento US8633164B2 se refiere a un péptido de estructura lineal que comprende entre 17 a 23 aminoácidos en las posiciones 1 a 23, contados a partir del extremo N, sabiendo que el residuo en el amino terminal es en: (1) G, S o está ausente; (2) C o está ausente; (3) K o R; (4) K o R; (5) Y, W o F; (6) K o R; (7) K o R; (8) F, W o L; (9) K o R; (10) K o L está ausente; (11) W, L o F; (12) K o R; (13) F, Y o C; (14) K o R; (15) G o Q; (16) K o R; (17) F, L o W; (18) F o W; (19) F, L o W; (20) W o F; (21) C o está ausente; (22) F o G o está ausente y (23) G está ausente. Adicionalmente, dicho documento describe una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido; un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico, una célula huésped que puede crecer en un cultivo celular que comprende el vector y un método para sintetizar el péptido que cultiva la célula huésped de la invención y recoge el péptido producido.

Aun cuando hay un número relativamente grande de moléculas disponibles en la actualidad que pueden ser usadas como posibles agentes antimicrobianos, todavía existe la necesidad de sintetizar nuevos compuestos con mayor actividad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al diseño, síntesis y caracterización de nuevos Péptidos con Actividad Antimicrobiana (PAMs) y antiparasitaria, y con baja actividad hemolítica. También se incluyen análogos, derivados y variaciones conservativas de los mismos.

En un primer aspecto, la presente invención hace referencia a péptidos que presentan una secuencia de 17 L-aminoácidos con la siguiente estructura:

$$NVAAX_1AX_2X_3X_4LKK\ X_5X_6KKI$$

en donde:

X_1 es Treonina (T) o Triptófano (W);

X_2 es Arginina (R) o Lisina (K)

X_3 es Glicina (G), Fenilalanina (F) o Tirosina (Y)

X_4 es Triptófano (W) o Fenilalanina (F)

X_5 es Isoleucina (I), Lisina (K) o Triptófano (W), y

X_6 es Glicina (G) o Fenilalanina (F).

Los péptidos ejemplares de estas fórmulas generales incluyen SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 9.

En un segundo aspecto, la presente invención hace referencia a un método para inhibir el crecimiento de microorganismos tales como bacterias y levaduras, que consiste en poner en contacto la bacteria o levadura con una concentración efectiva inhibidora de un péptido que tiene una secuencia de 17 L-aminoácidos con la siguiente estructura:

$$NVAAX_1AX_2X_3X_4LKK\ X_5X_6KKI$$

en donde:

X_1 es Treonina (T) o Triptófano (W);

X_2 es Arginina (R) o Lisina (K)

X_3 es Glicina (G), Fenilalanina (F) o Tirosina (Y)

X_4 es Triptófano (W) o Fenilalanina (F)

X_5 es Isoleucina (I), Lisina (K) o Triptófano (W), y

X_6 es Glicina (G) o Fenilalanina (F).

Los péptidos ejemplares empleados en el método de inhibición incluyen las fórmulas generales SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 9.

En un tercer aspecto, la invención también hace referencia a un método para la inhibición del crecimiento de los parásitos, utilizando como método de determinación de la viabilidad celular de parásitos la reducción del MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) y usando concentraciones de PAMs comprendidas entre 0,5 y 100µM, para inhibir los parásitos que se encuentran en fase de crecimiento exponencial tardía (~10^7parásitos/mL). Estas condiciones fueron definidas como estándar, y mantenidas a lo largo del resto de experimentos, con una concentración efectiva inhibitoria de un péptido que tiene una secuencia de 17 L-aminoácidos con la estructura:

$$NVAAX_1AX_2X_3X_4LKK\ X_5X_6KKI$$

en donde:

X_1 es Treonina (T) o Triptófano (W);

X_2 es Arginina (R) o Lisina (K)

X_3 es Glicina (G), Fenilalanina (F).o Tirosina (Y)

X_4 es Triptófano (W) o Fenilalanina (F)

X_5 es Isoleucina (I), Lisina (K) o Triptófano (W), y

X_6 es Glicina (G) o Fenilalanina (F).

Los péptidos ejemplares empleados en el método de inhibición incluyen las fórmulas generales SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 9.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Cromatogramas obtenidos del péptido SEQ ID No: 6.

FIG. 2 Espectros de masas obtenidos del péptido SEQ ID No: 6

FIG. 3 Espectro de Dicroísmo circular del péptido SEQ ID No: 6.

FIG. 4 Estructura secundaria de los péptidos. A) SEQ ID No: 1, B) SEQ ID No: 2, C) SEQ ID No: 3, D) SEQ ID No: 4, E) SEQ ID No: 5, F) SEQ ID No: 6, G) SEQ ID No: 7, H) SEQ ID No: 8 y I) SEQ ID No: 9.

FIG. 5 Actividad hemolítica del péptido SEQ ID No: 6.

FIG. 6 Incremento de la fluorescencia de la sonda Sytox Green tras la adición de diluciones del péptido SEQ ID NO: 6 para: A) *E. coli* O157:H7, B) *Ps. aeruginosa* y C) *S. aureus*.

FIG. 7 Estabilidad en suero del péptido SEQ ID No: 6.

FIG. 8 Citotoxicidad del péptido SEQ ID No: 6.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona una serie de nuevos péptidos sintéticos y catiónicos que comprende una secuencia de 17 L-aminoácidos, presentan actividad antimicrobiana y son activos para inhibir el crecimiento de microorganismos comunes o que han desarrollado alguna resistencia a antibióticos. Adicionalmente, estos péptidos presentan actividad antiparasitaria, baja actividad hemolítica y citotoxicidad.

Para efectos de la presente invención, el término *"péptido"* se usan para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos, generalmente cadenas moleculares lineales de aminoácidos que contienen hasta 30 aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. En particular, el péptido de la invención comprende 17 L-aminoácidos.

El término "*aminoácido*" se refiere a aminoácidos naturales o sintéticos. Los aminoácidos de origen natural son codificados por el código genético, así como los que se modifican más tarde. Los aminoácidos naturalmente codificados son los 20 comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina , y valina), así como pirrolisina, pirrolisina, pirrolina-carboxi-lisina, y selenocisteína. Las abreviaturas de código utilizadas para identificar aminoácidos a lo largo de la presente invención corresponden a las comúnmente usadas para aminoácidos.

El término *"variaciones conservativas"* se refiere a la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar que tiene actividad similar al péptido original. Un ejemplo de *"variaciones conservativas"* se basa en el análisis de las frecuencias normalizadas de cambios de aminoácidos entre las proteínas correspondientes de los

organismos homólogos (véase, por ejemplo, Schulz, GE y RH Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). De acuerdo con este tipo de análisis, los grupos de aminoácidos pueden ser definidos donde los aminoácidos dentro de un grupo se intercambian preferentemente entre sí y, por lo tanto, se asemejan entre sí en mayor parte en su impacto en la estructura de proteínas en general (véase, por ejemplo, Schulz, GE y RH Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). Por ejemplo un conjunto de grupos de aminoácidos definidos por sus propiedades físicas incluyen: grupos :1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T), y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)). El término *"sustituido"* significa que un aminoácido es reemplazado por otro aminoácido en la misma posición de la secuencia. Un ejemplo de sustitución es T5W que significa que el aminoácido Treonina (T) ha sido sustituido por Triptófano (W) en la posición número 5 en SEQ ID NO: 1.

Los términos *"idéntico"* o *"porcentaje de identidad"*, se refiere a dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, identidad de 90%, opcionalmente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% con preferencia 98%, con más preferencia 99% o con máxima preferencia 100% de identidad o de identidad sobre una región especificada, o, cuando no se especifica, sobre toda la secuencia), cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima en una ventana de comparación. Opcionalmente, para la secuencia de ácidos nucleicos, la identidad existe sobre una región con entre 5 a 10 nucleótidos de longitud, o más preferiblemente sobre una región que tiene de 5 a 8 nucleótidos de longitud, o de toda la longitud de la secuencia de referencia.

El término *"catiónico"* se refiere a una molécula que tiene una carga neta positiva dentro del intervalo de pH entre 2 a 12, tal como dentro del intervalo de 4 a 6. El término *"molécula"* pretende significar un péptido, de secuencia conocida, que previene, inhibe o destruye un microorganismo. El término *"microorganismo"* pretende significar cualquier microorganismo vivo. Ejemplos de microorganismos son bacterias, hongos, virus, parásitos y levaduras.

El término *"antimicrobiano"* hace referencia a la propiedad de los péptidos de prevenir el crecimiento o proliferación, o provocan la muerte de microorganismos tales como bacterias, virus, parásitos o similares. El término *"antiparasitario",* como se usa en este documento, significa que los péptidos de la presente invención inhiben, o impiden el crecimiento o la proliferación, o provocan la muerte de los parásitos asociados a enfermedades como la leishmaniasis. El término *"actividad hemolítica"* tal como se utiliza en el presente documento significa la propiedad de los péptidos de lisar células de eritrocitos de mamíferos. El término *"citotoxicidad"* tal como se usa en la presente

memoria significa el efecto de daño o muerte celular en tiempos cortos o prolongados en presencia de los péptidos.

El término *"composición antimicrobiana"* significa cualquier composición que contenga las moléculas descritas de acuerdo con la invención, tales como composiciones farmacéuticas útiles para combatir microorganismos, así como composiciones que comprenden uno o más agentes antimicrobianos adicionales tales como antibióticos y otros posibles agentes.

Los péptidos sintéticos y catiónicos de la invención comprenden una secuencia de 17 L-aminoácidos: NVAAX_1A$X_2X_3X_4$LKKX_5X_6KKI en donde: X_1 es Treonina (T) o Triptófano (W); X_2 es Arginina (R) o Lisina (K); X_3 es Glicina (G), Fenilalanina (F) o Tirosina (Y); X_4 es Triptófano (W) o Fenilalanina (F); X_5 es Isoleucina (I), Lisina (K) o Triptófano (W), y X_6 es Glicina (G) o Fenilalanina (F). Adicionalmente, la invención se refiere a un método para reducir y/o eliminar microorganismos para tratar y/o prevenir una enfermedad que comprende una infección microbiana o parasitaria mediante el uso de una molécula o moléculas tal como se ha definido anteriormente o una composición o un producto como se define anteriormente, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende la molécula o moléculas de la invención.

Ejemplos de péptidos de la invención incluyen pero no se limitan a: NVAATARGWLKKKGKKI (SEQ ID No: 1), NVAAWARGWLKKIGKKI (SEQ ID No: 2), NVAATARGWLKKWGKKI (SEQ ID No: 3), NVAATAKGWLKKIGKKI (SEQ ID No: 4), NVAATARGFLKKIGKKI (SEQ ID No: 5), NVAATARGWLKKIGKKI (SEQ ID No: 6), NVAATARFWLKKIGKKI (SEQ ID No: 7), NVAATARGWLKKIFKKI (SEQ ID No: 8) y NVAATARYWLKKIGKKI (SEQ ID No: 9) derivados y variaciones conservativas de los mismos, en donde los péptidos presentan actividad antimicrobiana y antiparasitaria.

Los péptidos de la invención incluyen SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 9, así como los grupos más amplios de péptidos que tienen sustituciones hidrofílicas e hidrófobicas y sus variaciones conservativas. Los péptidos de la invención incluyen cualquier análogo, homólogo, mutante, isómero o derivado de los péptidos descritos en la presente invención, siempre y cuando permanezca la bioactividad como la descrita aquí.

Además, pueden producirse derivados carboxi-terminales, tales como ésteres metílicos carboxi-terminales, amidas carboxi-terminales, y similares, con el fin de aumentar la actividad antimicrobiana de los péptidos de la invención. Un experto en la técnica podría realizar un ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), por ejemplo, para identificar otros péptidos, análogos o derivados relacionados de péptidos de la invención, como se describe en la presente memoria. Los péptidos de la invención pueden modificarse fácilmente en el terminal carboxi por métodos conocidos por los expertos en la técnica, las modificaciones del extremo carboxilo incluyen amidación, y similares.

Los péptidos de la presente invención se diseñaron mediante la estrategia de optimización de algoritmos genéticos, que proporciona candidatos para péptidos con actividad biológica en un tiempo computacional corto. La búsqueda de péptidos se realizó para el descriptor físico-químico seleccionado estableciendo: rangos de carga, hidrofobicidad, punto isoeléctrico, y el índice de inestabilidad. La optimización se realizó utilizando la Ecuación 1, donde x1, x2, x3 y x4 son la carga, el punto isoeléctrico, la hidrofobicidad y el índice de inestabilidad, respectivamente.

$$min \;\; f(x_{1,}x_{2,}x_{3,}x_4) = (x_1 - 4)^2 + (x_2 - 9.5)^2 + x_3^2 + x_4$$

$$s.t. \;\; 0 < x_1 < 8; \;\; 7 < x_2 < 12; \;\; -1.5 < x_3 < 1.5; \;\; x4 < 40 \quad (1)$$

Los péptidos de la presente invención se producen de forma sintética. La técnica de síntesis química de péptidos es bien conocida. Por ejemplo, la síntesis de péptidos puede llevarse a cabo mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) usando el procedimiento de bolsa de té publicado por [Houghten, R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985; 82, 5131-5135] para síntesis de múltiples péptidos, de acuerdo con la química estándar de Cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) y usando una resina Rink amida 4MBHA (100-200 mallas; 0,63mmol/gt) como un soporte sólido y Fmoc aminoácidos. Las reacciones de acoplamiento se realizaron activando el grupo carboxílico de cada aminoácido con cantidades equivalentes de hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) en N,N-dimetilformamida (DMF) usando N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) como un neutralizador. La eficacia de acoplamiento de los aminoácidos protegidos se verificó con la ayuda del ensayo de azul de bromofenol. La eliminación de la protección temporal (Fmoc), incluyendo la de NH_2-terminal, se realizó con un tratamiento con Piperidina al 20%(v/v). Adicionalmente, se empleó una porción de péptido-resina para el acoplamiento de Rodamina B.

Los péptidos obtenidos que incluyen SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 9 se clivaron por tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA)/triisopropilsilano (TIS)/etanoditiol/H_2O (92,5/2,5/2,5:2,5) durante 2 horas y después se precipitaron con éter etílico frío. Los péptidos se desalinizaron mediante cromatografía de exclusión en gel utilizando columnas Sephadex G-10 (Amersham, EE.UU). Finalmente, los péptidos se purificaron mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés) en una columna preparativa Vydac C-18 usando un gradiente de fase móvil de 30 minutos, la fase móvil se compone de: (A) H_2O con TFA 0,1% (v/v) y (B) acetonitrilo (ACN) que contiene TFA 0,1% (v/v) entre 5 y 70% de B a 1ml/min y detección a 220nm. El cromatograma obtenido de la fase de purificación del péptido sintetizado SEQ ID NO: 6 se muestra en la FIG. 1. La masa molar del péptido purificado se determinó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y el espectro obtenido se muestra en la FIG. 2.

Por otra parte, se determinó la estructura secundaria del péptido mediante Dicroísmo Circular (DC). Los espectros de DC del péptido se midieron a 25ºC en una cubeta de 1 mm

de longitud de trayectoria sobre 190 a 260nm en un espectrómetro DC (J-815 Jasco Corporation, Japón), adicionando 0,2mM del péptido disuelto en tampón de fosfato sódico 50mM, pH 7,4, y solución de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) al 30% (v/v). El espectro se registró como un promedio de cuatro repeticiones de exploración en modo de exploración continua con una velocidad de exploración de 50 nm/min y un tiempo de respuesta de 1s. El blanco de la contribución del disolvente se restó de cada espectro de la muestra y se calculó la elipticidad molar para cada péptido. El espectro del DC obtenido para el péptido sintetizado SEQ ID NO: 6 se muestran en la FIG. 3.

Con los resultados obtenidos de la caracterización instrumental realizada (RP-HPLC, MALDI-TOF y DC) se determinó que los péptidos descritos que incluyen las fórmulas generales SEQ ID No: 1 a SEQ ID No: 9 se caracterizan por una estructura secundaria alfa hélice (como se muestra en la FIG. 4), un peso molecular entre 1815 a 1960 Da, carga neta entre +4 a +6, punto isoeléctrico entre 10 a 12; índice de inestabilidad de -16 a 0, índice de hidropatía entre -1 a 1 y porcentaje de estructura secundaria alfa hélice entre 90 y 99%.

La actividad biológica de los PAMs se evaluó mediante ensayos de actividad antimicrobiana, hemolítica y citotóxica. La actividad antimicrobiana de los péptidos se determinó utilizando el ensayo de microdilución en placa, descrito por Wu y Hancock (1999) J.BiolChem. 274: 29-35, el cual permite determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). La CMI es importante en el diagnóstico de laboratorio para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente antimicrobiano y evaluar la actividad de los nuevos compuestos antimicrobianos. La CMI se refiere a la concentración más baja de péptido que inhibe la multiplicación o crecimiento de los microorganismos.

Para determinar la CMI se utilizó una suspensión de microorganismos con una concentración inicial de una equivalente a $1x10^8$ Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por ml en la escala de Mac Farland. Se probaron bacterias Gram positivas o Gram negativas seleccionadas de: *Staphylococcus aureus Resistente a Meticilina* (SARM), *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis, Escherichia coli* (*E. coli*) O157: H7, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa), Pseudomonas fluorescens, Salmonella typhimurium, Burkholderia cenocepacia, Listeria monocytogenes, Streptococcus mutans y Enterobacter cloacae*. La suspensión microbiana fue distribuida en microplacas de Elisa de 96 pocillos (Corning) que contenían los medios de cultivo líquidos Luria Bertani (LB) para bacterias Gram-negativas y Mueller-Hinton (MH) para bacterias Gram-positivas. Posteriormente, se agregaron diferentes concentraciones del PAM en rangos comprendidos entre 0,5 a 100µM y se evaluaron controles positivos y negativos. La ofloxacina se usó como control de la inhibición del crecimiento celular. Estos cultivos se incubaron a 37 °C con agitación constante. La cinética de crecimiento se monitorizó cada hora durante 8 horas mediante turbidimetría cuantificando la densidad óptica a λ = 595 nm en un lector de microplacas.

Para evaluar el efecto bactericida de los péptidos sobre los microorganismos, al final de las 8 horas de la cinética de crecimiento, se inoculó en medio sólido enriquecido denominado Infusión de Cerebro y Corazón (conocido como BHI por sus siglas en inglés) una alícuota de 100µl de los pocillos que mostraban la inhibición en presencia del péptido, junto con medio de cultivo en tubos Eppendorf a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, se sembraron 10 µL de cultivo en placas de Petri de agar BHI; luego, se determinó la Concentración Mínima Bactericida (CBM), definida como la concentración del péptido que inhibe el 100% del crecimiento bacteriano. Adicionalmente, se realizaron experimentos de control en ausencia de péptidos.

Para determinar la actividad hemolítica de los PAM, se hizo una evaluación del efecto de los péptidos sobre células de mamífero de eritrocitos de carnero. Para esto se centrifugó 1ml de sangre de oveja desfibrinada a 1000xg durante 10 min y a 4ºC; el plasma y la capa leucocitaria se descartaron y los eritrocitos se lavaron posteriormente cuatro veces con solución salina balanceada de Hanks + glucosa. Posteriormente, se transfirieron alícuotas de 100µl de $2x10^7$ eritrocitos/ml en solución de sal balanceada de Hanks + glucosa a tubos Eppendorf y se incubaron a 37°C durante 4h con péptidos a diferentes concentraciones. Al final del tiempo de incubación, la suspensión de eritrocitos se centrifugó a 13.000xg durante 5 min y se transfirió una alícuota de 80µl del sobrenadante a una placa de 96 pocillos para medir la hemoglobina liberada a 550nm en un lector de microplacas. El porcentaje de hemólisis se calculó usando la siguiente ecuación: porcentaje de hemolisis (%) = (As-Ao) / (A_{100}-A_0) x100, donde As es la absorbancia de la muestra, A_{100} es la absorbancia de los eritrocitos completamente lisados en 0,1% (v/v) Tritón X-100 y A_0 es la absorbancia en ausencia completa de hemólisis. Los péptidos evaluados se caracterizaron por una actividad hemolítica entre 10 y 40% en un rango de concentraciones entre 0.5 y 50 µM.

Para determinar la permeabilización de la membrana bacteriana en presencia de los péptidos, se utilizó la sonda fluorescente vital SYTOX. Para esto se transfirieron alícuotas de 100µl del cultivo junto con 1µM de SYTOX flurescente en medio Hanks y glucosa a una microplaca negra de 96 pocillos e incubó a 37°C; posteriormente, se midió la fluorescencia en un espectrofluorímetro Polarstar Galaxy (λ_{exc}=504nm, λ_{emi}=523nm). Una vez que la fluorescencia basal (en ausencia de péptido) se estabilizó, se añadieron los péptidos a diferentes concentraciones 0,5 a25µM a los pocillos y se registró la fluorescencia hasta que fuera constante o durante un máximo de 40 minutos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Por otra parte, se determinó la estabilidad del péptido en suero humano de acuerdo con la metodología descrita en Li, L.; Vorobyov, I.; Allen, T. W., *J. Phys. Chem. B.* 2013; 117, 11906-11920, centrifugando suero humano a 13.000 rpm durante 10 minutos para eliminar la fracción lipídica. Posteriormente, se preparó una suspensión que contenía el PAM en una concentración final de 100µM y suero humano deslipidado al 10%, y se incubó a 37ºC durante 360 min. A continuación, se tomaron alícuotas de 500µl de estas soluciones en

diferentes momentos y se centrifugaron en ultrafiltros Amicon de 3kDa para separar el suero y el péptido. Los péptidos se cuantificaron usando análisis de cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RPHPLC). Esto se realizó usando una columna Agilent C-18 usando una fase móvil que contenía: (A) H_2O con TFA 0,1% (v/v) y (B) acetonitrilo (ACN) que contenía TFA al 0,1% (v/v). Para la elución de los péptidos, se utilizó el siguiente programa de gradiente: 30 minutos con 5 a 70% de B, utilizando un flujo de 1 mL/min y detección a 220nm. Todos los ensayos se realizaron independientemente por triplicado.

La citotoxicidad de los péptidos descritos en el desarrollo se determinó *In vitro,* de acuerdo con el método publicado por Nguyen, L.T.; Chau, J. K.; Perry, N. A.; de Boer, L.; Zaat, S. A. J.; Vogel, H. J., *PLoS One*. 2010, 5, 11-18, cultivando una línea celular de carcinoma de pulmón humano A549 en medio Eagle Modificado (EMEM) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%. Se colocaron 7500 células/pocillo en microplacas de 96 pocillos en un volumen final de 0,2 mL en medio; después se incubaron en una atmósfera humidificada de CO_2 al 5% a 37ºC, durante 24 h. Posteriormente, las células se incubaron durante 48 h con los PAMs en concentraciones finales comprendidas entre 5,0 a 100 µM. A continuación, se añadieron 200 µl de MTT (0,5 mg / ml) y después de tres horas de incubación se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se añadieron 200µl de Dimetil Sulfóxido (DMSO) a la suspensión celular para disolver los cristales de formazano formados. Finalmente, se determinó la viabilidad celular midiendo absorbancia a 550nm en un lector de microplacas (Thermo). El control positivo de lisis celular se realizó con Triton X-100 al 0,1%, el cual ocasionó una lisis del 100%. De acuerdo con el ensayo de citotoxicidad, se obtuvo porcentajes de viabiliad en células A549 comprendidas entre el 38 a 99% en presencia del PAM en concentraciones de 0.5 y 50 µM, respectivamente.

Adicionalmente, la invención se refiere a un método para reducir y/o eliminar microorganismos, para tratar y/o prevenir una enfermedad que comprende una infección microbiana o parasitaria mediante el uso de una molécula, moléculas, composición o producto como se define anteriormente, mediante la adición de los péptidos evaluados en concentraciones entre 0.5 y 50 µM a cultivos bacterianos cuya concentración se encuentra en un rango de $1x10^6$ a $1x10^8$ CFU/mL.

La presente invención será presentada en detalle a través de los siguientes ejemplos, los cuales son suministrados solamente con propósitos ilustrativos y no con el objetivo de limitar su alcance.

EJEMPLOS

<u>Ejemplo 1: Determinación de las propiedades físico-químicas de los péptidos</u>

Las propiedades físico-químicas de los péptidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 9 se listan en la Tabla 1. La carga neta, *m*/z, punto isoeléctrico, índice de inestabilidad y GRAVY

fueron determinadas mediante la herramienta computacional de *ProtParam* (http://web.expasy.org/protparam/) del portal Bioinformático *Expasy*.

Ejemplo 2: Actividad *antimicrobiana* frente a *P. aeruginosa, S. aureus y E. coli* O157:H7

- *Cultivo bacteriano:*

El patógeno bacteriano Gram positivo SARM fue cultivado en una caja de Petri conteniendo agar Müller Hilton (MH); por su parte los patógenos Gram negativos *E. coli* O157:H7 y *P. aeruginosa* fueron cultivados en el medio Luria Bertani (LB). Por su parte, las diluciones de los péptidos se realizaron en buffer fosfato de potasio 1 mM a pH=7.0.

- *Concentración mínima inhibitoria (CMI)*

Se empleó el método de microdilución en placa para la estimación de la CMI, utilizando microplacas multipocillo de tipo ELISA. Inicialmente, se prepararon preinóculos de SARM en caldo MH; y *E. coli* O157:H7 y *P. aeruginosa* en caldo LB. Se mantuvieron en agitación orbital constante de 200rpm a 37°C durante 8h. Posteriormente, el preinóculo se resuspendió en el medio de cultivo estéril respectivo en una relaicón1:10 y se dejó crecer hasta obtener una absorbancia a longitud de onda de 595 nm, comprendida entre de 0.08 y 0.1, que corresponde a una concentración de 1x 10^8 UFC/mL, según la escala McFarland. Posteriormente, se añadieron 100 µM del preinóculo a 100 µM del PAM que se encontraba en concentraciones de 0.5 y 100 µM en los pocillos de las microplacas de ELISA. Posteriormente, se incubaron las microplacas en agitación constante de 200 rpm durante 8h, para determinar la cinética de crecimiento microbiano. Las concentraciones de biomasa se relacionaron con el cambio de absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro lector de microplacas ELISA (Biorad, imarck). La CMI se definió como la menor concentración de péptido SEQ ID No 6 que producía una inhibición en el crecimiento de la bacteria. Los valores de CMI_{99} correspondieron a la dosis que inhibía el 99% del crecimiento bacteriano y que se presentan en la Tabla 2.

- *Concentración mínima bactericida (CMB)*

Posteriormente, se determinó la CMB, tomando alícuotas de 100µL de SARM, *E. coli* O157:H7 y *P. aeruginosa,* a partir de los pozos del ensayo anterior y se añadieron a 900µL del caldo de cultivo BHI en tubos Eppendorf, y se llevaron a incubación a 37°C durante 24 horas. Finalmente, se tomó una alícuota de 5µL de cada tubo y se transfirió a placas de agar BHI con el objetivo de confirmar si existía un efecto bactericida, evidenciado en aquellas placas de agar donde no hubiese crecimiento bacteriano. La concentración mínima bactericida (CMB) se definió como la concentración en la cual se inhibió el 100% del crecimiento bacteriano en comparación con el control positivo utilizado (microorganismo creciendo en el medio de cultivo apropiado en ausencia del PAM). los valores de CMB determinados para el péptido SEQ ID No: 6 se muestran en la Tabla 2.

Ejemplo 3: Actividad hemolítica sobre eritrocitos de carnero

Los ensayos de hemolisis de los péptidos en células de mamífero se realizaron mediante evaluación de actividad hemolítica sobre eritrocitos de carnero. Los eritrocitos de 1 mL de sangre desfibrinada de carnero fueron sometidos a centrifugación (1000 x g, 10 min, 4ºC) y posteriormente lavados con medio Hanks + Glc. Los eritrocitos fueron resuspendidos en el medio utilizando una densidad de 2 x 107 células/mL. Posteriormente, se transfirieron alícuotas de 100 µL de la suspensión, a tubos Eppendorf y fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones del PAM en un rango de 0,5 a 50 µM, a una temperatura de 37ºC durante un periodo de 4 h.

Posteriormente, los eritrocitos fueron centrifugados (13.000 x g, 5 min) y se transfirieron alícuotas de 80 µL del sobrenadante, a una microplaca de 96 pocillos para medir la concentración de hemoglobina liberada a una longitud de onda de 550 nm en un lector de microplacas de Elisa. El 100% de hemólisis se considera el obtenido por lisis de eritrocitos con 0.1% Tritón X-100. Se definió como parámetro de actividad la Concentración Hemolítica al 50% (HC_{50}). Los resultados obtenidos para el péptido evaluado SEQ ID No: 6 se presentan en la Tabla. 3 y FIG. 5.

Ejemplo 4: Permeabilización peptídica de la membrana bacteriana

Para determinar la permeabilización de membrana bacteriana se utilizó la sonda fluorescente SYTOX verde, para esto se transfirieron alícuotas de 100 µl del cultivo bacteriano que contenían 1 µM de SYTOX verde en Hanks y glucosa en una microplaca negra de 96 pocillos y se incubaron a 37°C. Posteriormente, se midió la fluorescencia en un espectrofluorímetro Polarstar Galaxy (λexc = 504nm, λemi = 523nm).

Una vez que la fluorescencia basal (en ausencia de péptido) era estable, se añadió el péptido SEQ ID No: 6 a diferentes concentraciones entre 0,1 a 15,0uM a estos pocillos y se registró la fluorescencia hasta que alcanzó una meseta durante un máximo de 40 minutos. Los resultados obtenidos de la evaluación de la permeabilidad de membrana se registran en las FIG. 6.

Ejemplo 5: Estabilidad en suero humano

Para determinar la estabilidad en suero humano, se centrifugaron 5mL de suero humano a 13.000 rpm durante 10min para eliminar los lípidos. Posteriormente, se añadió el péptido SEQ ID No: 6 a una concentración final de 100µM con 10% (v/v) de este suero humano deslipidado, y se incubó a 37ºC durante 360min. Se tomaron alícuotas de 500µl periódicamente y se centrifugaron en ultrafiltros Amicon de 3kDa para separar el suero y el péptido. Los péptidos se cuantificaron mediante RPHPLC,utilizando una columna Agilent C-18 con una fase móvil compuesta por: (A) H_2 O con ácido Trifluoroacetico (TFA) 0,1% (v/v) y (B) acetonitrilo (ACN) que contenía TFA al 0,1% (v/v). Para la elución de péptidos, se utilizó el siguiente programa de gradiente: 30 minutos con 5-70% de B a 1 mL/min y detección a 220nm. Los ensayos se realizaron independientemente por

triplicado. Los resultados obtenidos para la evaluación del péptido SEQ ID No: 6 se ilustran en la FIG. 7.

Ejemplo 6: Actividad citotóxica

Se cultivó una línea celular A549 de carcinoma de pulmón utilizando microplacas de 96 pocillos en un volumen final de 0,2 ml de medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB); conteniendo 7500 células/pocillo. Las microplacas se incubaron en atmósfera humidificada de 5% de CO_2 a 37 ° C. Después de 24 h de incubación, las células fueron tratadas con el péptido SEQ ID No: 6 a concentraciones finales entre 5,0 y 100 µM, durante 48 h.

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de los péptidos diseñados SEQ ID No: 1 a SEQ ID No: 9

Péptido	Secuencia	Carga neta	*m/w* (Da)	pI*	Índice de Inestabilidad	GRAVY**
SEQ ID NO: 1	NVAATARGWLKKKGKKI	+6	1869.29	11,90	-1,04	-0,17
SEQ ID NO: 2	NVAAWARGWLKKIGKKI	+5	1939.38	11,84	-9,88	0,30
SEQ ID NO: 3	NVAATARGWLKKWGKKI	+5	1927.33	11,84	-2,14	1,04
SEQ ID NO: 4	NVAATAKGWLKKIGKKI	+5	1826.26	11,14	-1,04	-0,17
SEQ ID NO: 5	NVAATARGFLKKIGKKI	+5	1815.24	11,84	-15,55	0,53
SEQ ID NO: 6	NVAATARGWLKKIGKKI	+5	1854,04	11,33	-1,04	-0,2
SEQ ID NO: 7	NVAATARFWLKKIGKKI	+5	1944.40	11,84	-3,30	0,50
SEQ ID NO: 8	NVAATARGWLKKIFKKI	+5	1944.40	11,84	-4,88	0,50
SEQ ID NO: 9	NVAATARYWLKKIGKKI	+5	1960.40	11,10	-13,84	0,26

*punto isoeléctrico (pI)
**Índice promedio de hidrofobicidad (GRAVY)

Tabla 2. Actividad antimicrobiana SEQ ID No: 6

	***E. coli* O157:H7**				***P. aeruginosa***				**MRSA**			
Secuencia	CMI_{99} (µM)	CMI_{99} (µg/mL)	CMB (µM)	CMB (µg/mL)	CMI_{99} (µM)	CMI_{99} (µg/mL)	CMB (µM)	CMB (µg/mL)	CMI_{99} (µM)	CMI_{99} (µg/mL)	CMB (µM)	CMB (µg/mL)
SEQ ID NO: 6	5.0	9.3	25.0	46.6	10.0	18.6	>100.0	>186.4	10.0	18.6	25.0	46.6

Tabla 3. Toxicidad en Macrófagos peritoneales SEQ ID No: 6

Secuencia	**Toxicidad en Macrófagos**			**Eritrocitos**
	%Células viables (25.0 µM) 4 h	**%Células viables (25.0 µM) Overnight**	**%Células viables (5.0 µM) Overnight**	**HC_{50} (µM)**
SEQ ID NO: 6	13,1	22,4	86,0	> 50,0

A continuación, se añadieron 200 µL de MTT (0,5 mg/ml) y después de tres horas de incubación se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se añadieron 200 µL de DMS a las células para disolver los cristales de formazán formados y se cuantificó la viabilidad celular midiendo la absorbancia del sobrenadante a 550 nm empleando un lector de microplacas de Elisa (Thermo). Los resultados obtenidos de la evaluación del péptido SEQ ID No: 6 se muestran en la FIG. 8.

Ejemplo 7: Actividad antiparasitaria

La metodología para determinación de la actividad antiparasitaria, fue la descrita por Silva, T.; Abengozar, M. A.; Fernandez-Reyes, M.; Andreu, D.; Nazmi, K.; Bolscher, J.G.; Bastos, M.; Rivas, L. *Amino Acids*. 2012. 43. 2265–2277 con algunas modificaciones. Los parásitos ensayados fueron *Leishmania donovani y Leishmania pifanoi*, los cuales fueron colectados en fase de crecimiento exponencial tardía (~10^7parásitos/mL) mediante centrifugación (1000 x g, 10 min, 4ºC). A continuación, se efectuaron lavados mediante centrifugación, utilizando solución salina de Hanks (137 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 0.4 mM KH_2PO_4, 4.2 mM $NaHCO_3$ y 0.4 mM Na_2HPO_4, pH = 7.2) suplementada con $_D$-glucosa 10 mM. Tras los lavados, las células fueron resuspendidas a una densidad de 2x 10^7 parásitos/mL en este mismo medio para la realización de cada ensayo.

La actividad del péptido SEQ ID No: 6 se determinó mediante la inhibición de la reducción del MTT a corto plazo y bajo condiciones de proliferación. Las células vivas y metabólicamente activas reducen el MTT al compuesto formazán de color azul oscuro e insoluble utilizando las reductasas mitocondriales. La pérdida de viabilidad celular supone la inhibición de dicha reducción. Los parásitos, preparados según las condiciones estándar, se incubaron en alícuotas de 120 µL con la correspondiente concentración de péptido (0,5-50 µM), durante 4h a 25ºC para promastigotes y 32ºC para amastigotes. Posteriormente, se transfirió una alícuota de 20 µL de cada pocillo en una nueva microplaca de 96 pocillos con 130 µL/pocillo de su respectivo medio y se incubaron durante 72 h a 25ºC o 96 h a 32ºC para permitir la proliferación de los promastigotes o amastigotes sobrevivientes, respectivamente (ensayo de proliferación).

Para determinar el EC_{50} (concentración efectiva de péptido que causa el 50% de inhibición de la reducción de MTT a 4 h de incubación), los 100 µL de muestra restante fueron transferidos a un tubo Eppendorf al cual se adicionó 1mL de medio de cultivo Hanks + Glc a 4ºC para detener la incubación.

Los parásitos fueron centrifugados (13000g, 4min, 4ºC en una microcentrífuga), re-suspendidos en una solución de 0.5 mg/mL MTT en medio de cultivo Hanks + Glc y transferidos a una placa de microcultivo de 96 pocillos. Las células fueron incubadas durante 2h en oscuridad a la temperatura de crecimiento respectiva para el estado del desarrollo del parásito. El formazán resultante de la reducción de MTT por efecto del metabolismo de los parásitos, fue solubilizado mediante la adición de 100 µL de 10% (p/v) SDS e incubado a 25ºC en ausencia de luz (4h). Finalmente, se determinó la absorbancia

del formazán a 595 nm en un lector de microplacas ELISA. De esta misma manera se determinó el LC_{50} (Concentración de péptidos que causa 50% de inhibición en la proliferación de Leishmania). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y en condiciones de esterilidad. Los resultados obtenidos para el péptido SEQ ID No: 6 se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Actividad antiparasitaria SEQ ID No: 6

Secuencia	**Promastigotes *L.donovani***		**Amastigotes *L. pifanoi***			
	%Células viables (25.0 µM) 4h	**%Células viables (25 µM) 72h**	**%Células viables (25.0 µM) 4 h**	**%Células viables (25 µM) 72 h**	**EC_{50} (µM)**	**LC_{50} (µM)**
SEQ ID NO: 6	77,7(±0.1)	74,3 (±0.07)	34,3(±0.01)	0,2 (±0.04)	7,8	0,45

REIVINDICACIONES

1. Un péptido catiónico caracterizado por la secuencia:

$$NVAAX_1AX_2X_3X_4LKK\ X_5X_6KKI$$

en donde:

X_1 es Treonina (T) o Triptófano (W);

X_2 es Arginina (R) o Lisina (K);

X_3 es Glicina (G), Fenilalanina (F).o Tirosina (Y);

X_4 es Triptófano (W) o Fenilalanina (F);

X_5 es Isoleucina (I), Lisina (K) o Triptófano (W), y

X_6 es Glicina (G) o Fenilalanina (F).

2. El péptido catiónico de la Reivindicación 1, caracterizado por una estructura secundaria alfa hélice y un peso molecular entre 1815 a 1960 Da.

3. El péptido catiónico de la Reivindicación 1, caracterizado por las siguientes propiedades; carga neta entre +4 a +6, hidrofobicidad promedio entre -1 y 1, punto isoeléctrico entre 10 a 12; índice de inestabilidad de -16 a 0, índice de hidropatía entre -1 a 1 y porcentaje de estructura secundaria alfa hélice entre 90 y 99%.

4. El péptido catiónico de la Reivindicación 1, que muestra actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas seleccionadas de: *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis, Escherichia coli* (*E. coli*) O157: H7, *Pseudomona aeruginosa* (*P. aeruginosa), Pseudomona fluorescens, Salmonella typhimurium, Burkholderia cenocepacia, Listeria monocytogenes, Streptococcus mutans y Enterobacter cloacae.*

5. El péptido catiónico de la Reivindicación 1, que muestra actividad antiparasitaria frente al parasito *L.donovani* y *L.pifanoi.*

6. El péptido catiónico de la Reivindicación 1, caracterizado por presentar una actividad hemolítica entre 10 y 40% en un rango de concentraciones del péptido entre 0.5 y 50 μM .

7. El péptido catiónico de la Reivindicación 1, que muestra citotoxicidad con un porcentaje de células A549 viables entre el 38 a 99% en un rango de concentración del péptido entre el 0.5 y 50 μM.

8. El péptido catiónico de la Reivindicación 1 a 7, que es amidado en la región C-terminal.

9. Un método para inhibir el crecimiento de bacterias y levaduras que se encuentran en concentraciones de 1x106 a 1x108 CFU/ml y parásitos en concentración de alrededor de 107 parásitos/mL, expuestos al péptido en concentraciones entre 0,5 y 5,0 µM, de acuerdo con las Reivindicaciones 1 a 8.

****

RESUMEN

La invención se refiere a nuevos péptidos catiónicos con actividad antimicrobiana y antiparasitaria y baja actividad hemolítica. También se incluyen análogos, derivados y variaciones conservativas de los mismos. Los péptidos se caracterizan por la secuencia de 17 L-aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en NVAAX_1A$X_2X_3X_4$LKK X_5X_6KKI, en donde: X_1 es Treonina (T) o Triptófano (W); X_2 es Arginina (R) o Lisina (K), X_3 es Glicina (G), Fenilalanina (F).o Tirosina (Y), X_4 es Triptófano (W) o Fenilalanina (F), X_5 es Isoleucina (I), Lisina (K) o Triptófano (W), y X_6 es Glicina (G) o Fenilalanina (F). Los péptidos obtenidos exhiben actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas tales como *Staphylococcus aureus Resistente a Meticilina* (SARM), *Escherichia coli* O157:H7 y *Pseudomonas aeruginosa.* Además, exhibe actividad antiparasitaria frente al parasito *Leishmania donovani* y *Leishmania pifanoi.*

FIGURAS

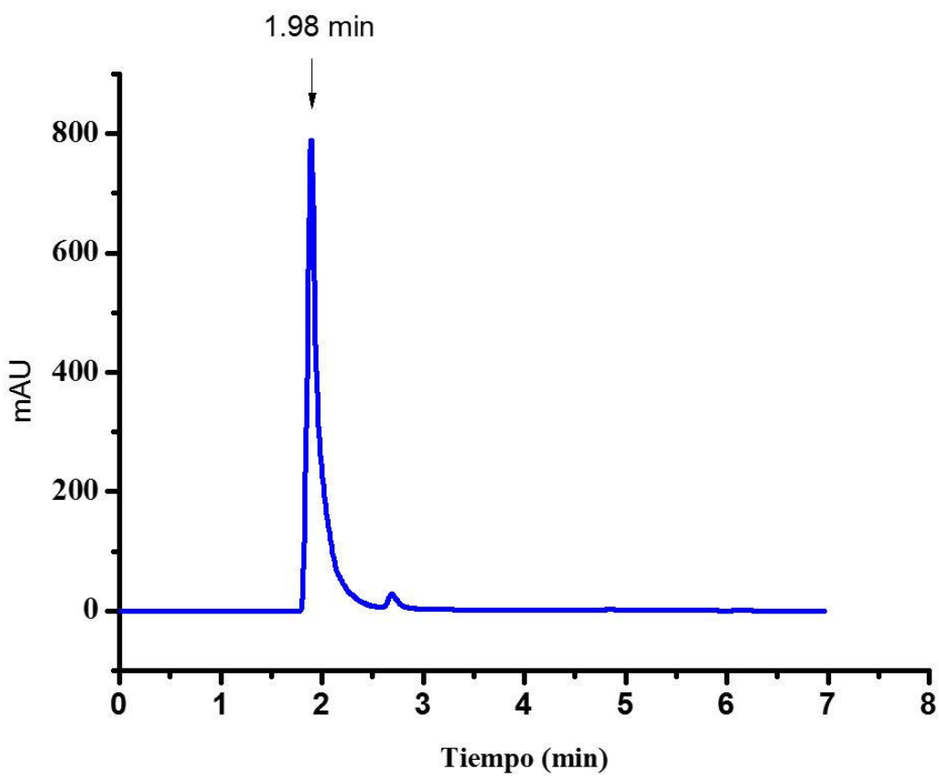


FIG. 1

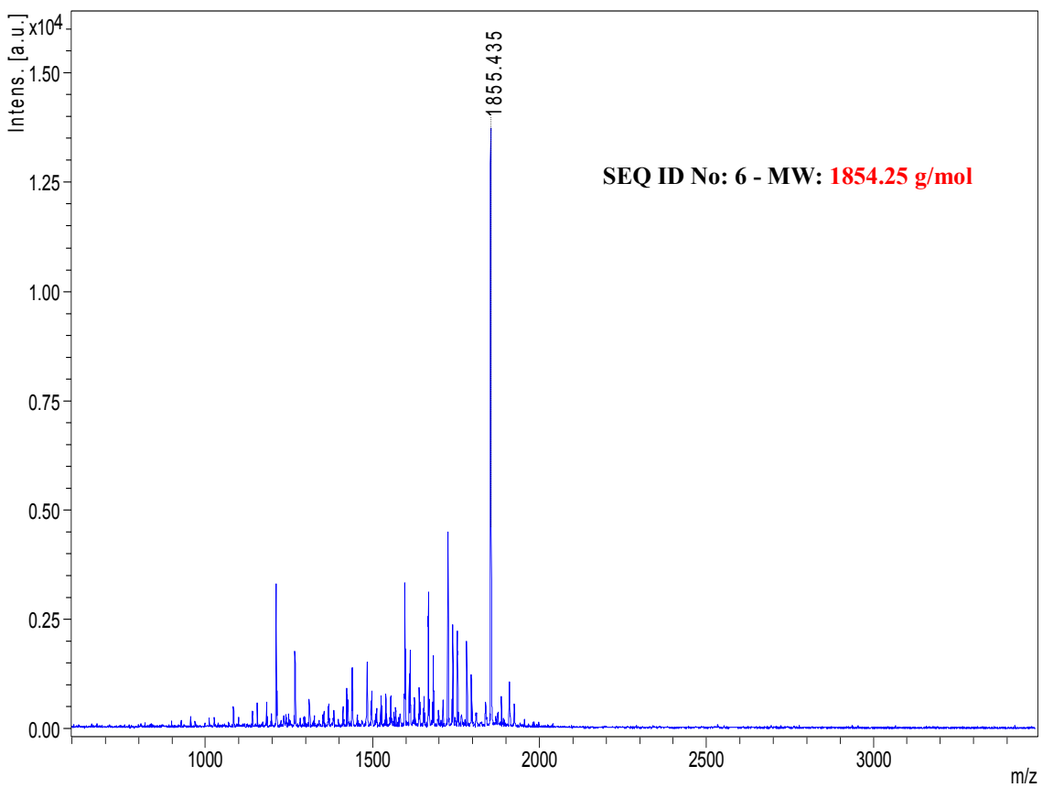

Intens. [a.u.]
x10^4
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
1855.435
SEQ ID No: 6 - MW: 1854.25 g/mol
1000
1500
2000
2500
3000
m/z

FIG. 2

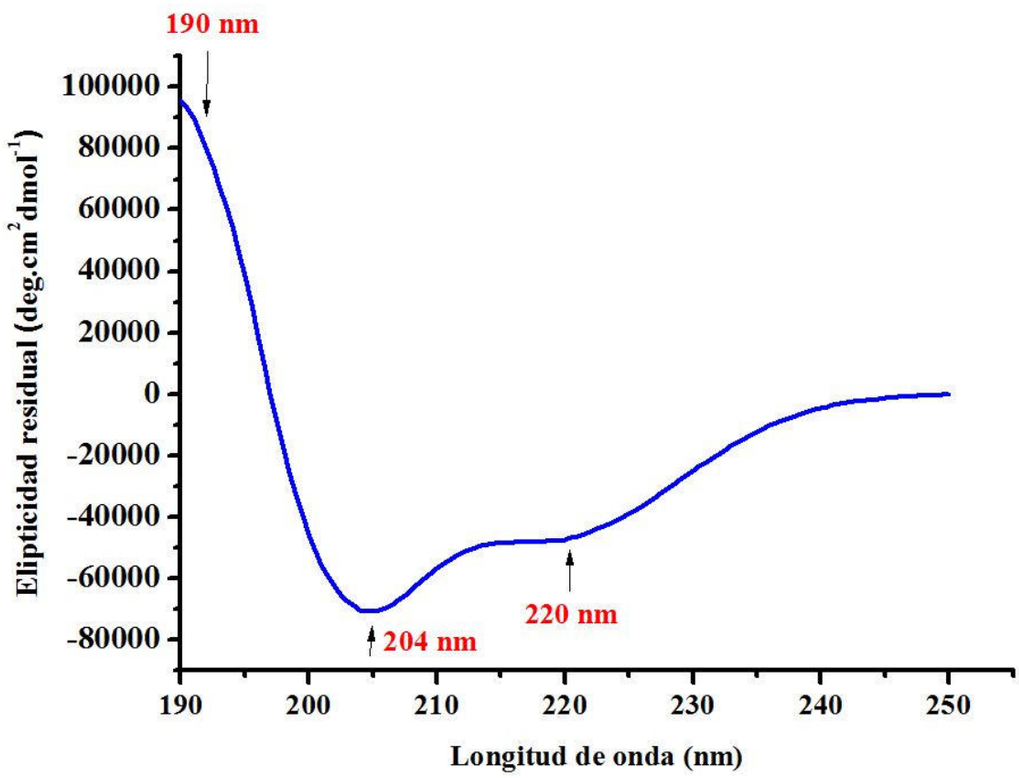

190 nm
204 nm
220 nm
100000
80000
60000
40000
20000
0
-20000
-40000
-60000
-80000
Elipticidad residual (deg.cm2dmol-1)
190
200
210
220
230
240
250
Longitud de onda (nm)

FIG. 3

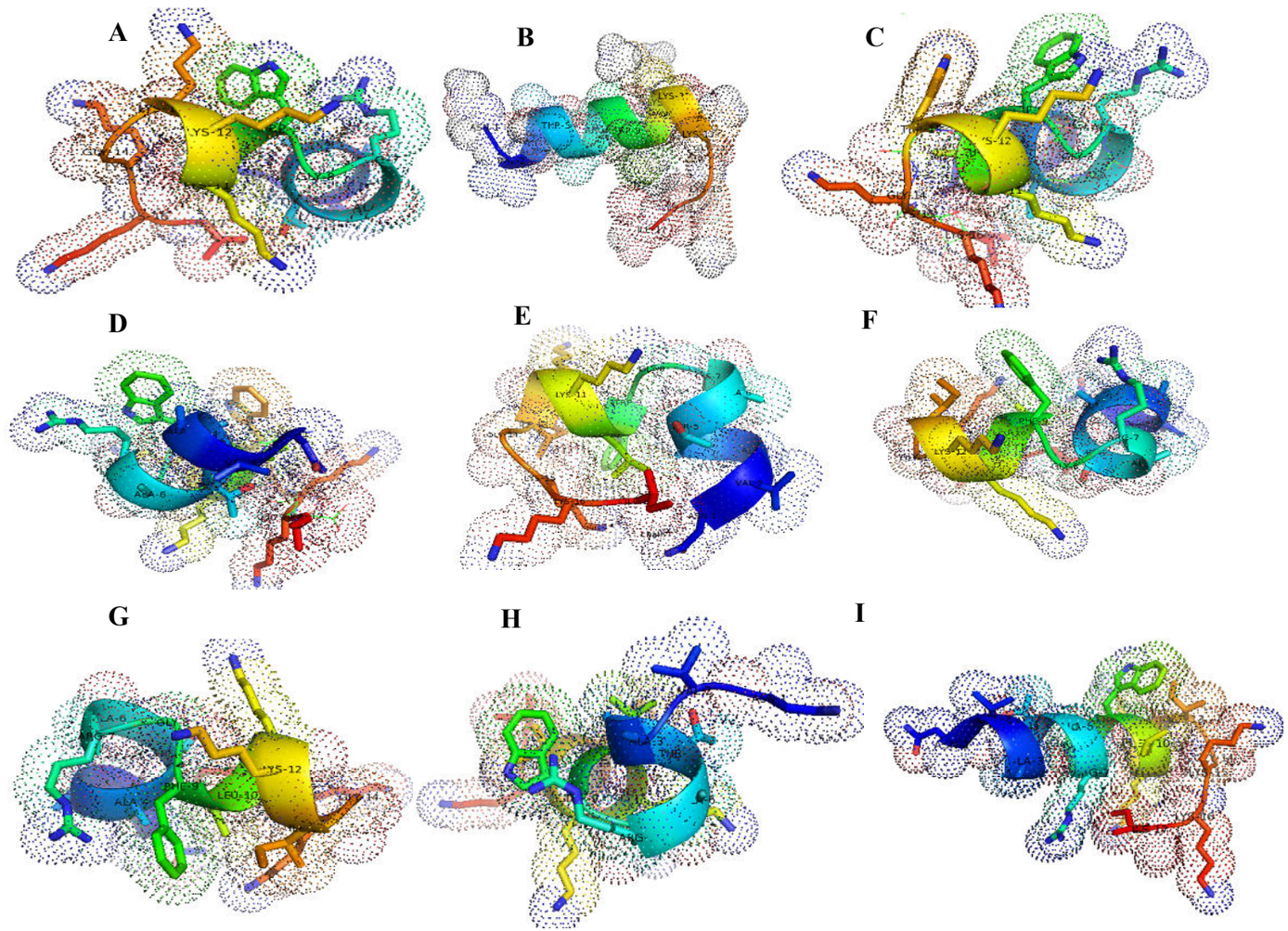


FIG. 4

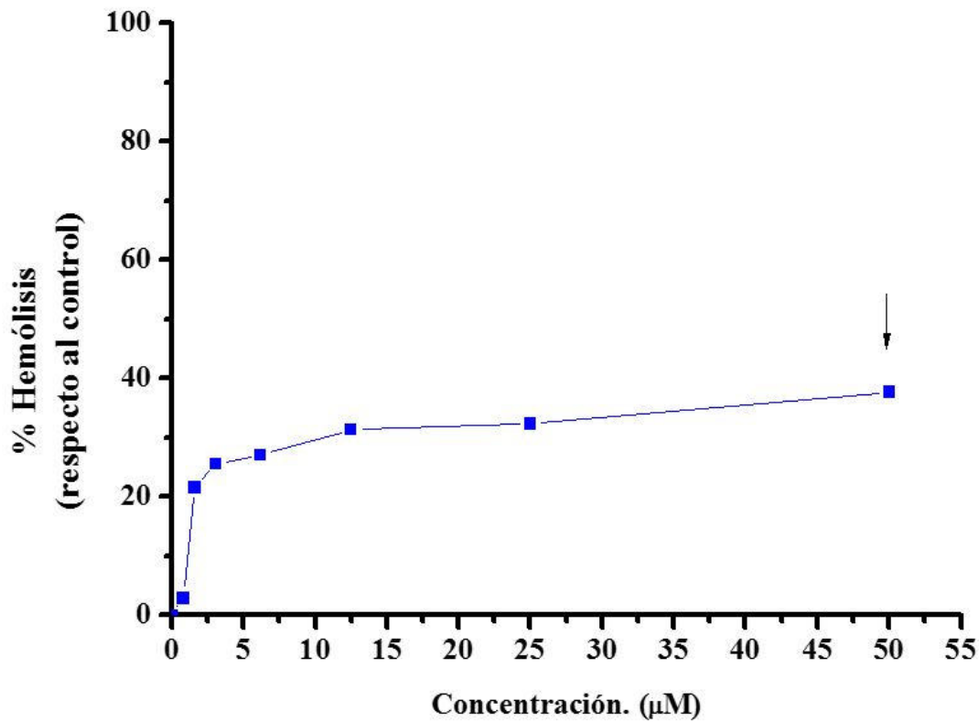
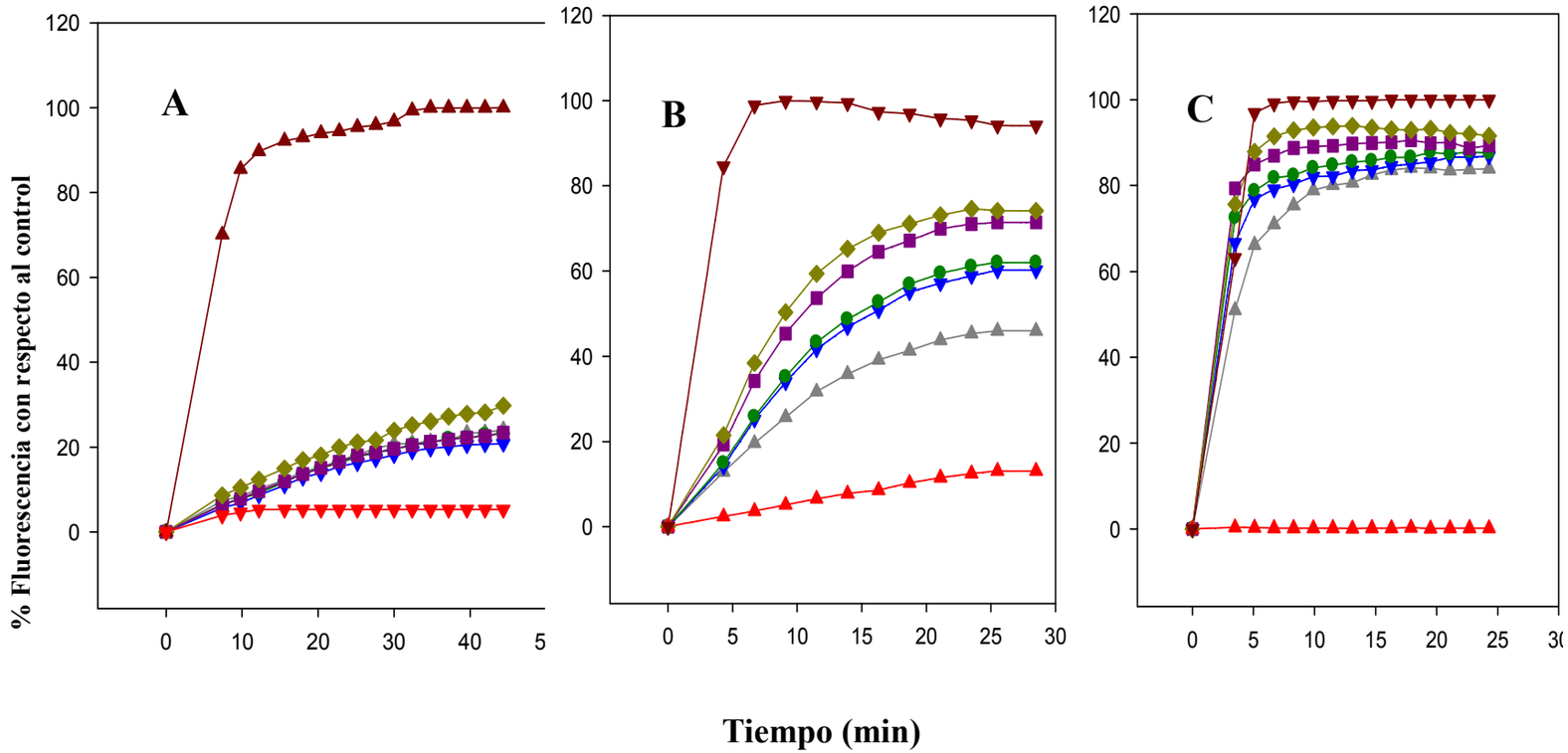

% Hemólisis
(respecto al control)
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Concentración. (μM)

FIG. 5



(▲) CAME+ tritón X-100, (◆) 15.0 µM, (■) 5.0 µM, (●) 0.57 µM, (▼) 0.25 µM, (▲) 0.10 µM y (▲) Control

FIG. 6

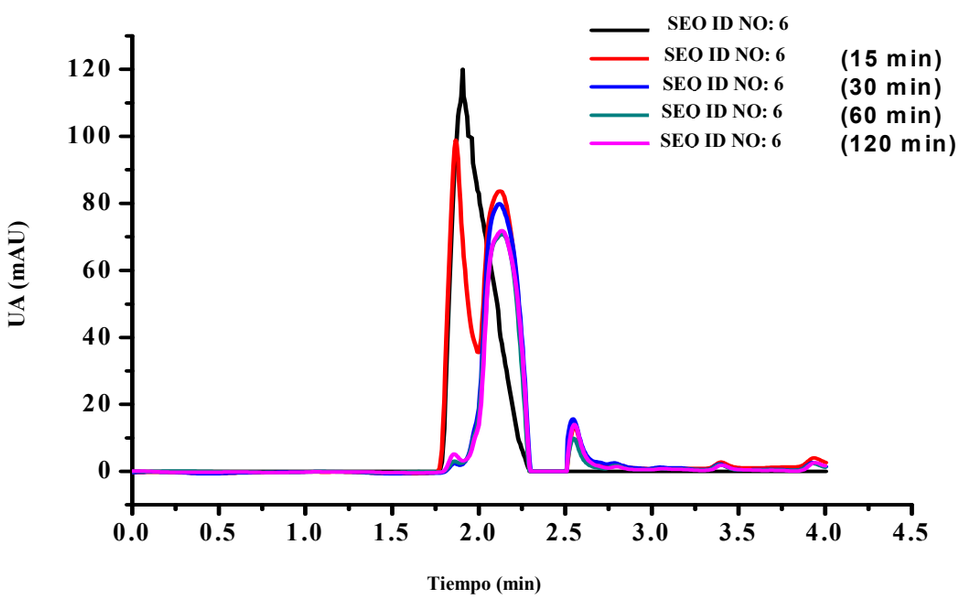

SEO ID NO: 6
SEO ID NO: 6
SEO ID NO: 6
SEO ID NO: 6
SEO ID NO: 6
(15 min)
(30 min)
(60 min)
(120 min)
UA (mAU)
120
100
80
60
40
20
0
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
Tiempo (min)

FIG. 7

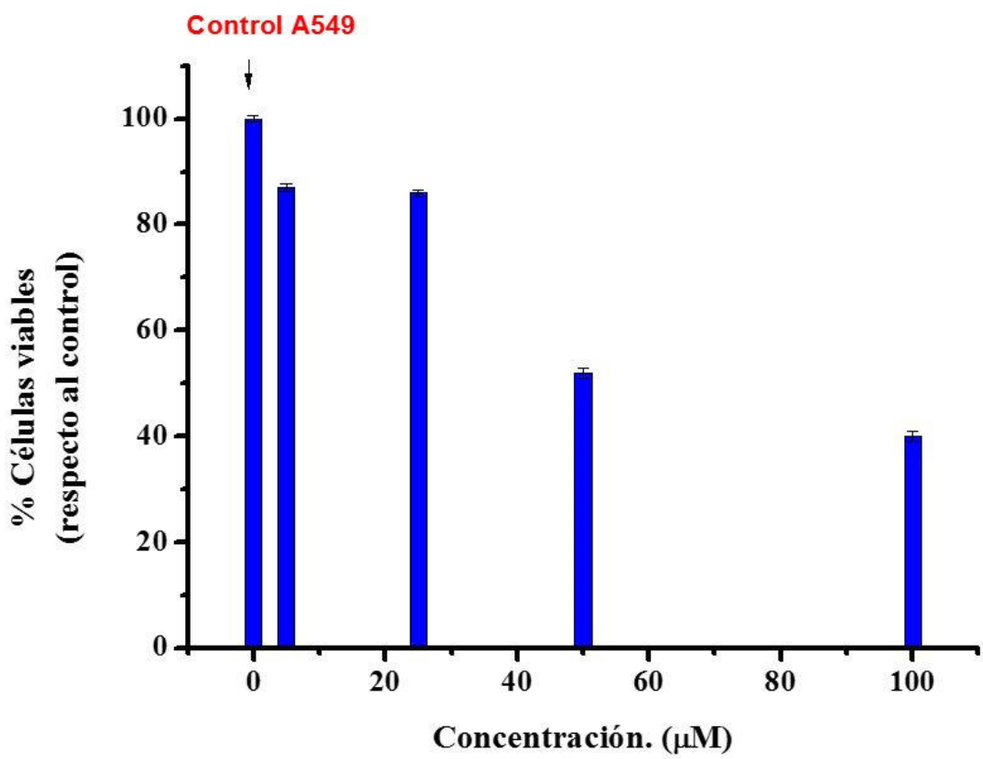

Control A549
% Células viables
(respecto al control)
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
Concentración. (μM)

FIG. 8