

PÉPTIDOS SINTÉTICOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA

CAMPO DE LA INVENCION

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

DESCRIPCION 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 FRWCFRVICYKGRCRYKCR (SEQ ID NO: 3), RRWCFRVICYKGFCRYKCR

(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 taquiplexininas, aisladas de *Tachypleus tridentatus*, *Tachypleus gigas* y *Carcinoscorpius rotundicauda*, caracterizados por contener 18 y 17

5 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.

10 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

15 (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.

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)

25 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

30 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 INVENCION

- 5 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 tienen una secuencia de 17 L-aminoácidos con la siguiente estructura:

10 $AX_1KKCGLX_2X_3ILKGVGKI$

en donde:

X_1 es Treonina (T) o Lisina (K);

X_2 es Fenilalanina (F) o Triptófano (W) y

X_3 es Serina (S) o Lisina (K).

- 15 Los péptidos ejemplares de estas fórmulas generales incluyen SEQ ID No: 1 a SEQ ID No: 4.

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 enfrentar la bacteria o levadura con una concentración efectiva inhibidora de un péptido que tiene

- 20 una secuencia de 17 L-aminoácidos con la siguiente estructura:

$AX_1KKCGLX_2X_3ILKGVGKI$

en donde:

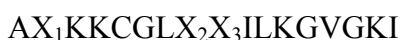
X_1 es Treonina (T) o Lisina (K);

X_2 es Fenilalanina (F) o Triptófano (W) y

- 25 X_3 es Serina (S) o Lisina (K).

Los péptidos ejemplares empleados en el método de inhibición incluyen las fórmulas generales SEQ ID No: 1 a SEQ ID No: 4.

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 (~10⁷parásitos/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:



en donde:

X₁ es Treonina (T) o Lisina (K);

X₂ es Fenilalanina (F) o Triptófano (W) y

X₃ es Serina (S) o Lisina (K).

Los péptidos ejemplares empleados en el método de inhibición incluyen las fórmulas generales SEQ ID No: 1 a SEQ ID No: 4.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Cromatogramas obtenidos de los péptidos SEQ ID No: 1 a SEQ ID No: 4.

FIG. 2 Espectros de masas obtenidos de los péptidos SEQ ID No: 1 a SEQ ID No: 4.

FIG. 3 Espectro de Dicroísmo circular de los péptidos SEQ ID No: 1 a SEQ ID No: 4.

FIG. 4 Estructura secundaria de los péptidos A) SEQ ID No: 1, B) SEQ ID No: 2, C) SEQ ID No: 3 y D) SEQ ID No: 4.

FIG. 5 Actividad hemolítica de los péptidos SEQ ID No: 1 a SEQ ID No: 4.

FIG. 6 Incremento de la fluorescencia de la sonda Sytox Green tras la adición de diluciones del péptido SEQ ID NO: 3 para: A) *E. coli* O157:H7, B) *Ps. aeruginosa* y C) *S. aureus*.

FIG. 7 Incremento de la fluorescencia de la sonda Sytox Green tras la adición de diluciones del péptido SEQ ID NO: 4 para: A) *E. coli* O157:H7, B) *Ps. aeruginosa* y C) *S. aureus*.

FIG. 8 Estabilidad en suero del péptido SEQ ID No: 4.

5 **FIG. 9** Citotoxicidad de los péptidos SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 3 y SEQ ID No: 4.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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
10 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
15 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,
20 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
25 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 "*cationico*" 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 presente invención comprenden una secuencia de 17 L-aminoácidos: AX₁KKCGLX₂X₃ILKGVGKI en donde: X₁ es Treonina (T) o Lisina (K); X₂ es Fenilalanina (F) o Triptófano (W) y X₃ es Serina (S) o Lisina (K). 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: ATKKCGLFSILKGVGKI (SEQ ID No: 1), AKKKCGLFSILKGVGKI (SEQ ID No: 2), ATKKCGLFKILKGVGKI (SEQ ID No: 3) y ATKKCGLWSILKGVGKI (SEQ ID No: 4)

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: 4, así como los grupos más amplios de péptidos que tienen sustituciones hidrofílicas e hidrófobas 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.

Por otro lado, la actividad antimicrobiana de los péptidos de la invención puede ser mejorada mediante la generación de derivados carboxi-terminales, tales como ésteres metílicos carboxi-terminales, amidas carboxi-terminales, y similares. Los péptidos de la invención pueden modificarse fácilmente en el extremo carboxi-terminal utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como la amidación. Un experto en la técnica podría realizar ensayos de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para identificar otros péptidos, análogos o derivados relacionados con los péptidos de la invención.

Los péptidos de la presente invención se diseñaron mediante la estrategia de optimización de algoritmos genéticos, que proporciona candidatos péptidos con actividad biológica en tiempo computacional corto. La búsqueda de péptidos se realizó para el descriptor físico-químico seleccionado estableciendo: rangos de carga, hidrofobicidad promedio, punto isoelectrico, y el índice de inestabilidad. La optimización se realizó utilizando la Ecuación 1, donde x_1 , x_2 , x_3 y x_4 son la carga, el punto isoelectrico, la hidrofobicidad y el índice de inestabilidad, respectivamente.

$$\min f(x_1, x_2, x_3, x_4) = (x_1 - 4)^2 + (x_2 - 9.5)^2 + x_3^2 + x_4$$

$$s. t. \quad 0 < x_1 < 8; \quad 7 < x_2 < 12; \quad -1.5 < x_3 < 1.5; \quad x_4 < 40 \quad (1)$$

Los péptidos de la presente invención se producen mediante síntesis química utilizando diferentes técnicas que se encuentran estandarizadas. Por ejemplo, mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) usando el procedimiento de bolsa de té publicado por [Houghten, R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1985; 82, 5131-5135]. Esta estrategia

permite la síntesis simultánea de péptidos, de acuerdo con la metodología de Cloruro de fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) y usando una resina Rink amida 4MBHA (100-200 mallas; 0,63 mmol/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 *In situ*. 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 del NH₂-terminal, se realizó con un tratamiento con piperidina al 20%. Adicionalmente, se empleó una porción de péptido-resina para el acoplamiento con Rodamina B.

Los péptidos obtenidos que incluyen SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 se separaron mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA)/triisopropilsilano (TIS)/etanoditiol/H₂O (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 Eficacia 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, compuesto por: (A) H₂O con TFA 0,1% (v/v) y (B) acetonitrilo (ACN) que contiene TFA 0,1% (v/v) entre 5 y 70% de B a un flujo de 1ml/min y detección a una longitud de onda de 220nm. Los cromatogramas obtenidos de la fase de purificación de los péptidos sintetizados que incluyen los péptidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 se muestran en la FIG. 1. La masa molar de los péptidos purificados se determinó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y los espectros de masa obtenidos para los péptidos sintetizados que incluyen SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 se muestran en la FIG. 2.

Por otra parte, se determinó la estructura peptídica secundaria por Dicroísmo Circular (DC). Los espectros de DC del péptido se midieron a 25°C 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. Los espectros de dicroísmo circular (DC) obtenidos para los péptidos sintetizados que incluyen SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 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: 4 se caracterizan por una estructura secundaria alfa hélice como se muestra en la FIG. 4, un peso molecular entre 1760 a 1810 Da, carga neta entre +3 a +6, punto isoeléctrico entre 10 a 11; índice de inestabilidad de -18 a 10, índice de hidropatía entre 0,3 a 0,6 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 1×10^8 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 100 μ M 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 $\lambda = 595$ 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 100 μ l 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 μ L 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 4°C; 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 100 μ l de 2×10^7 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 80 μ l 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 hemólisis (%) = $(A_s - A_0) / (A_{100} - A_0) \times 100$, donde A_s 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
5 de 100 μl del cultivo junto con 1 μM de SYTOX fluorescente 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 a 25 μM a los pocillos y se registró la fluorescencia hasta que
10 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
15 la fracción lipídica. Posteriormente, se preparó una suspensión que contenía el PAM en una concentración final de 100 μM y suero humano deslipidado al 10%, y se incubó a 37°C durante 360 min. A continuación, se tomaron alícuotas de 500 μl 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
20 de alta resolución de fase reversa (RPHPLC). Esto se realizó usando una columna Agilent C-18 usando una fase móvil que contenía: (A) H₂O 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
25 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
30

un volumen final de 0,2 mL en medio; después se incubaron en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% a 37°C, 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 viabilidad en células A549 comprendidas entre el 38 a 99% en presencia del PAM en concentraciones de 0.5 y 50 µM, respectivamente.

Como resultado se obtuvo una hemólisis al 100% por lisis de eritrocitos con Tritón X-100 al 0,1% y un porcentaje de células A549 viables entre el 38 a 99% en un rango de concentración entre el 0.5 y 50 µM de los péptidos sintetizados, purificados y evaluados que incluyen SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4.

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 adicionar a una cepa bacteriana en un rango de concentración entre 1×10^6 a 1×10^8 CFU/mL de los péptidos sintetizados, purificados y evaluados que incluyen SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 en una concentraciones entre 0.5 y 50 µM

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

Ejemplo 1: Determinación de las propiedades físico-químicas de los péptidos

Las propiedades físico-químicas de los péptidos SEQ ID No: 1 a SEQ ID No: 4 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*.

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

- Cultivo bacteriano:

La bacteria patógena Gram positiva *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (SARM) fue cultivada en agar Müller Hilton (MH) y las patógenas Gram negativos *Escherichia coli* 10 O157:H7 (*E. coli* O157:H7) y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) fueron cultivadas en el medio Luria Bertani (LB). Por otro lado, los péptidos fueron diluidos en buffer fosfato de potasio 1 mM a pH=7.0.

- Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se empleó el método de microdilución en placas para la estimación de los valores de CMI, 15 utilizando placas multipocillo de ELISA. Inicialmente, se preparó un preinóculo de SARM en caldo MH; y *E. coli* O157:H7 y *P. aeruginosa* en caldo LB. Cada preinóculo se mantuvo en agitación orbital constante de 200 rpm a 37°C durante 14h. Posteriormente, el preinóculo se diluyó con el medio de cultivo respectivo (1:10) y se determinó la absorbancia del caldo bacteriano hasta obtener un valor en el rango de 0.08 a 0.1, que 20 corresponde a una concentración de 1×10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL, según la escala McFarland.

Luego, se realizó el seguimiento de la cinética de crecimiento empleando el preinóculo bacteriano diluido en microplacas tipo ELISA a una temperatura de 37°C, que previamente contenía diferentes concentraciones de los péptidos (entre 0.5 y 80 μ M) a 37°C, 25 manteniendo agitación constante de 200 rpm durante 8h. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro lector de microplaca ELISA (Biorad, imarck) usando una longitud de absorbancia de 595 nm. La CMI se definió como la menor concentración de péptido que produce una inhibición en el crecimiento de la bacteria. Los valores de

CMI₉₉ corresponden a la dosis que inhibe el 99% del crecimiento bacteriano. Los resultados se encuentran en la Tabla 2.

- Concentración mínima bactericida (CMB)

5 Posterior a la determinación de la CMI, se determinó la CMB. Para esto se utilizaron los cultivos de SARM, *E. coli* O157:H7 y *P. aeruginosa* que fueron inhibidos por los PAMs durante la determinación de la CMI. Se tomaron muestras de estos cultivos y se inocularon en el caldo de cultivo de Infusión Cerebro Corazón (BHI) en tubos Eppendorf a 37°C durante 24 horas.

10 A continuación, se tomó una alícuota de cada tubo y se realizó una siembra en la superficie de las cajas de Petri que contuvieran BHI agar con el fin de corroborar el efecto bactericida en aquellas donde no hubo crecimiento de colonias bacterianas. El valor de CMB se determinó como aquella concentración donde el 100% del crecimiento bacteriano fue inhibido completamente en comparación con el control positivo (sin tratamiento con péptido), los valores de CMB determinados para los péptidos SEQ ID No: 1 a SEQ ID No: 15 4 se enuncian en la Tabla 2.

Ejemplo 3: Actividad hemolítica sobre eritrocitos de carnero

Los ensayos de hemólisis citotoxicidad 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, 4°C) y posteriormente lavados con medio de Hanks + Glc. Los eritrocitos fueron re- 20 suspendidos en el medio utilizando una densidad de 2×10^7 células/mL. Posteriormente, fueron transferidas alícuotas de 100 µL de esta suspensión, a tubos Eppendorf y fueron incubadas en presencia de los PAMs a las diferentes concentraciones (0,5-50 µM) a una temperatura de 37°C por un periodo de, 4 h.

25 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 determinar la concentración de hemoglobina liberada a una absorbancia 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}) (Concentración Hemolítica 50). Los resultados obtenidos para los péptidos evaluados SEQ ID No: 1 a SEQ ID No: 4 se presentan en la FIG. 5 y Tabla 3.

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 μ l del cultivo bacteriano que contenían 1 μ M 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 ($\lambda_{exc} = 504\text{nm}$, $\lambda_{emi} = 523\text{nm}$).

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de los péptidos diseñados SEQ ID No: 1 a SEQ ID No: 4

Péptido	Secuencia	Carga neta	<i>m/w</i> (Da)	pI*	Índice Instabilidad	GRAVY**
SEQ ID No: 1	ATKKCGLFSILKGVGKI	+4	1763.22	10.04	-4.23	0.56
SEQ ID No: 2	AKKKCGLFSILKGVGKI	+5	1790.28	10.2	-4.23	0.37
SEQ ID No: 3	ATKKCGLFKILKGVGKI	+5	1804.31	10.2	-18.06	0.38
SEQ ID No: 4	ATKKCGLWSILKGVGKI	+4	1802.25	10.4	9.70	0.5

* Grand Average of Hydropathicity

*Punto Isoeléctrico (pI)

*Índice promedio de hidrofobicidad

Tabla 2. Actividad antimicrobiana SEQ ID No: 1 a SEQ ID No: 4

	<i>E. coli</i> O157:H7				<i>P. aeruginosa</i>				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: 1	100	176.32	>100	>176.32	100	176.32	>100	>176.32	10	17.63	>100	>176.32
SEQ ID No: 2	50	89.51	>100	179.00	75	134.30	100	179.00	25	44.76	>100	179.00
SEQ ID No: 3	10	18.04	50	90.22	25	45.11	75	135.32	10	18.04	>100	180.43
SEQ ID No: 4	0.5	0.90	10.0	18.0	10.0	18.0	75.0	135.1	5.0	9.0	50.0	90.1

Tabla 3. Toxicidad en macrófagos peritoneales SEQ ID No: 1 a SEQ ID No: 4

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: 1	17.9	25.1	ND**	> 50.0
SEQ ID No: 2	17.7	15.9	ND*	> 50.0
SEQ ID No: 3	20.0	17.9	39.6	> 50.0
SEQ ID No: 4	4.9	4.6	22.4	> 50.0

ND*= No determinado

Una vez que la fluorescencia basal (en ausencia de péptido) era estable, se añadieron los péptidos SEQ ID No: 3 y SEQ ID No: 4 a diferentes concentraciones entre 0,1 a 15,0 µM a estos pocillos y se registró la fluorescencia hasta que alcanzó un valor estable durante un tiempo máximo de 40 min. Los resultados obtenidos de la evaluación de la permeabilidad de membrana se registran en las FIG. 6 y FIG. 7 de los péptidos SEQ ID No: 3 y SEQ ID No: 4 respectivamente.

Ejemplo 5: Estabilidad en suero humano.

Para determinar la estabilidad en suero humano, se centrifugaron 5mL de suero humano a 13.000rpm durante 10min para eliminar los lípidos; posteriormente, se mezcló el péptido SEQ ID No: 4 a 100µM de concentración final con 10% (v/v) de este suero humano deslipidado, y se incubó a 37°C durante 360min. 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).

El RPHPLC se realizó usando una columna Agilent C-18 con una fase móvil compuesta por: (A) H₂O con ácido Trifluoroacético (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. Estos ensayos se realizaron independientemente por triplicado. Los resultados obtenidos para la evaluación del péptido SEQ ID No: 4 se ilustran en la FIG. 8.

Ejemplo 6: Ensayos de citotoxicidad

Se cultivó una línea celular A549 de carcinoma de pulmón utilizando placas de 96 pocillos a un volumen final de 0,2 ml en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB); adicionando 7500 células/pocillo. Posteriormente, se incubaron en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ 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 μ M, durante 48 h.

A continuación, se añadieron 200 μ L de MTT (0,5 mg/ml) y después de tres horas de incubación se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se añadieron 200 μ L de Dimetil Sulfóxido 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 para los péptidos SEQ ID No: 1 a SEQ ID No: 4 se muestran en la FIG. 9.

Ejemplo 7: Actividad antiparasitaria

La metodología para determinación de la actividad antiparasitaria, fue la descrita por Fernández- Reyes y col., J. Med. Chem. 2010, 53(15), 5587-5596, con algunas modificaciones. Para esto, los parásitos fueron colectados en fase de crecimiento exponencial tardía ($\sim 10^7$ parásitos/mL) por centrifugación (1000 x g, 10 min, 4°C). A continuación, se lavaron dos veces con solución salina Hanks suplementada con 1% de glucosa (Hanks + Glc) en idénticas condiciones de centrifugación. Tras los lavados, las células fueron re-suspendidas a una densidad de 2×10^7 parásitos/mL en este mismo medio para la realización de cada ensayo.

La actividad de los péptidos SEQ ID No: 1 a SEQ ID No: 4, se determinó mediante la inhibición de la reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) 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 μ L con la correspondiente concentración de péptido, durante 4h a 25°C para promastigotes y 32°C para amastigotes. A continuación, se extrajo una alícuota de 100 μ L que fue transferida a un tubo Eppendorf al cual se adicionó 1mL de medio de cultivo Hanks + Glc a 4°C para detener la incubación.

Los parásitos fueron centrifugados (13000g, 4min, 4°C en una microcentrifuga), 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 los parásitos fue solubilizado mediante la adición de 100 μ L de 10% (p/v) SDS e incubado a 25°C en ausencia de luz (4h). Finalmente, se determinó la absorbancia del formazán a 595 nm en un lector de microplacas ELISA.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y en condiciones de esterilidad, necesarios para la realización de los ensayos de proliferación. El parámetro de actividad utilizado fue

la determinación de la concentración efectiva del péptido que inhibe la reducción de MTT en un 50%, tras 4h de incubación (EC₅₀). Los resultados obtenidos para los péptidos SEQ ID No: 1 a SEQ ID No: 4 evaluados se listan en la Tabla 4.

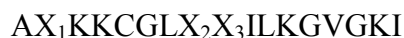
5

Tabla 4. Actividad antiparasitaria SEQ ID No: 1 a SEQ ID No: 4

Secuencia	Promastigotes <i>L.donovani</i>		Amastigotes <i>L. pifanoi</i>			
	%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: 1	94.2 (±0.2)	83.0 (±0.04)	73.0 (±0.01)	65.1 (±0.01)	>50.0	43.0
SEQ ID NO: 2	82.1 (±0.2)	72.6 (±0.11)	71.4 (±0.01)	39.8 (±0.01)	>50.0	3.4
SEQ ID NO: 3	89.9 (±0.1)	79.0 (±0.33)	72.4 (±0.01)	30.5 (±0.01)	42.9	4.76
SEQ ID NO: 4	36.3 (±0.1)	4.4 (±0.16)	32.8 (±0.02)	1.2 (±0.05)	16.0	0.45

REIVINDICACIONES

1. Un péptido catiónico caracterizado por la secuencia:



en donde:

- 5 X₁ es Treonina (T) o Lisina (K);
X₂ es Fenilalanina (F) o Triptófano (W) y
X₃ es Serina (S) o Lisina (K).
2. El péptido catiónico de la Reivindicación 1, caracterizado por una estructura secundaria alfa hélice y un peso molecular entre 1760 a 1810 Da.
- 10 3. El péptido catiónico de la Reivindicación 1, caracterizado por las siguientes propiedades; carga neta entre +3 a +6, punto isoelectrico entre 10 a 11; índice de inestabilidad de -18 a 10, índice de hidropatía entre 0,3 a 0,6 y porcentaje de estructura secundaria alfa hélice entre 90 y 99%.
- 15 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*.
- 20 5. El péptido catiónico de la Reivindicación 1, que muestra actividad antiparasitaria frente al parásito *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.
- 25 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 concentraciones del péptido entre 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 microorganismos tales como bacterias, 30 hongos, virus, parásitos y levaduras que comprende adicionar a la una concentración entre 1x10⁶ a 1x10⁸ CFU/ml de una cepa microorganismos entre 0,5 y 5,0µM del péptido de acuerdo a 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
5 17 L-aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en AX₁KKCGLX₂X₃ILKGVGKI, en donde: X₁ es Treonina (T) o Lisina (K); X₂ es Fenilalanina (F) o Triptófano (W) y X₃ es Serina (S) o Lisina (K). Los péptidos obtenidos exhiben actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas tales como *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 y *Ps. aeruginosa* y muestra actividad antiparasitaria
10 frente a los parásitos *Leishmaniadonovani* y *Leishmania pifanoi*.

FIGURAS

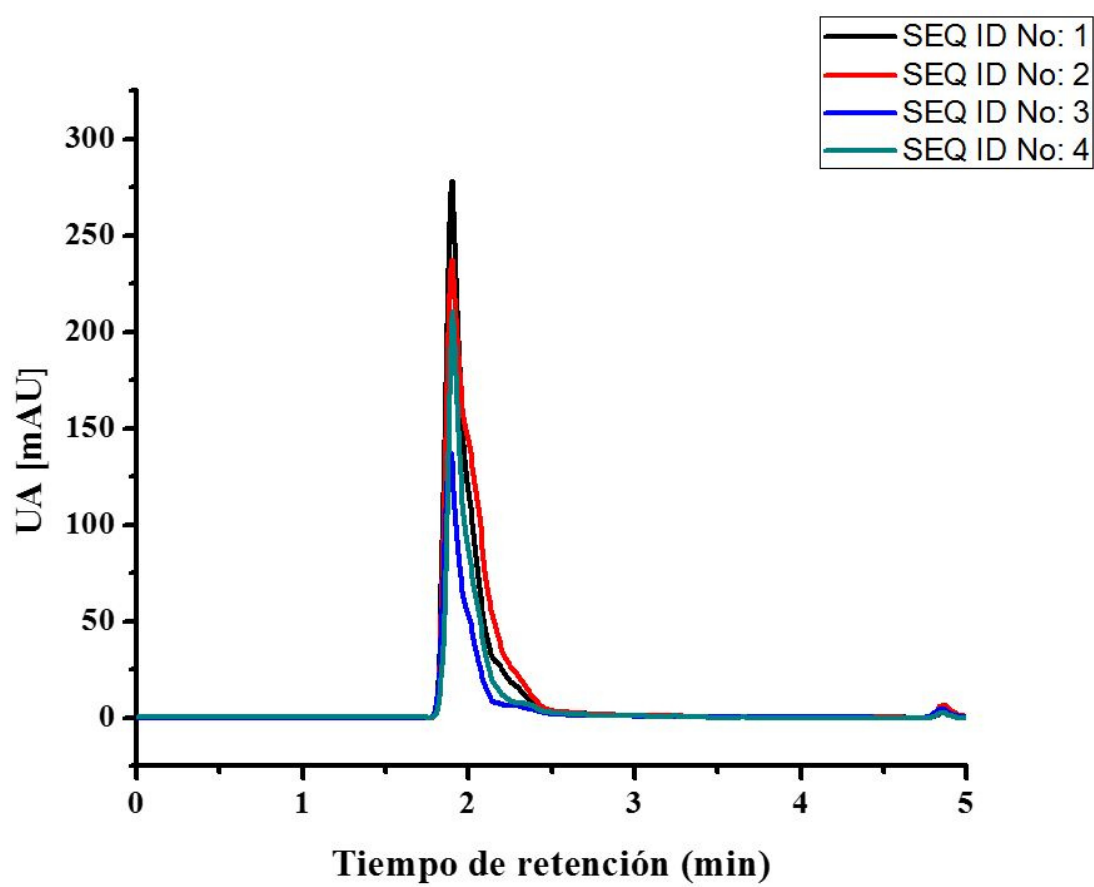


FIG. 1

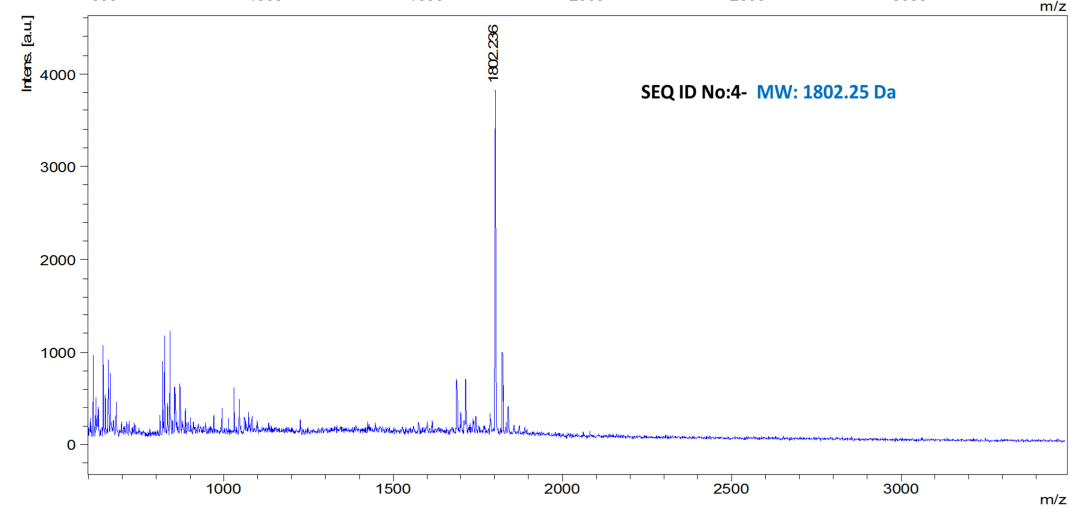
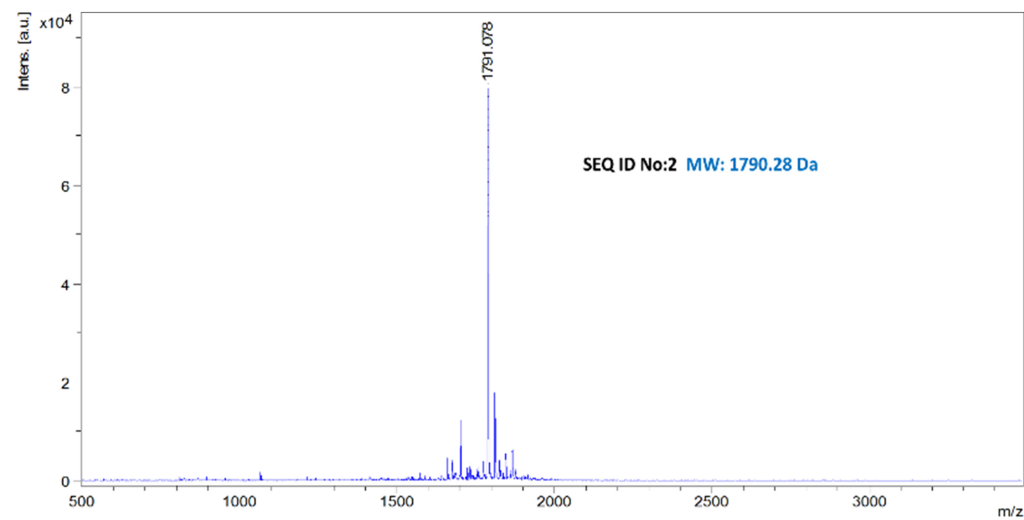
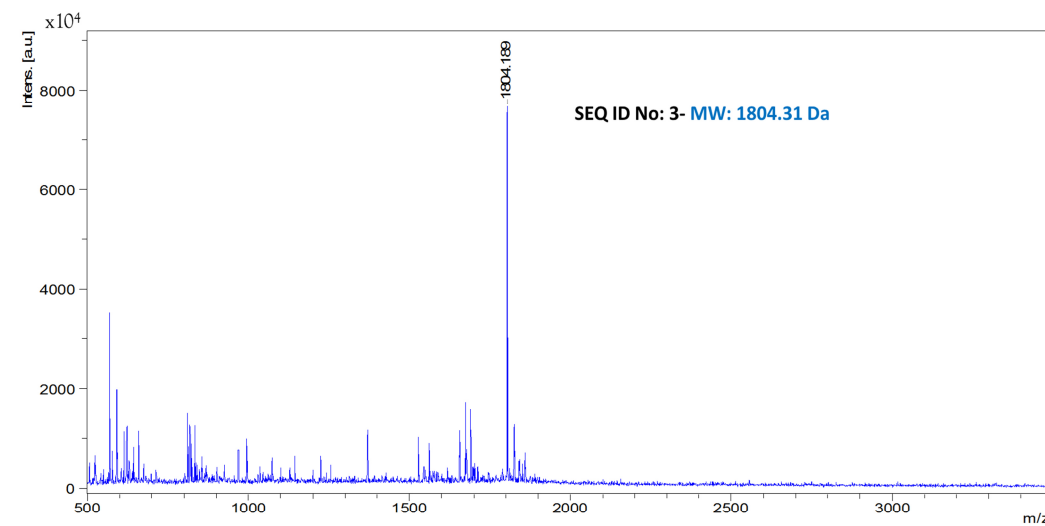
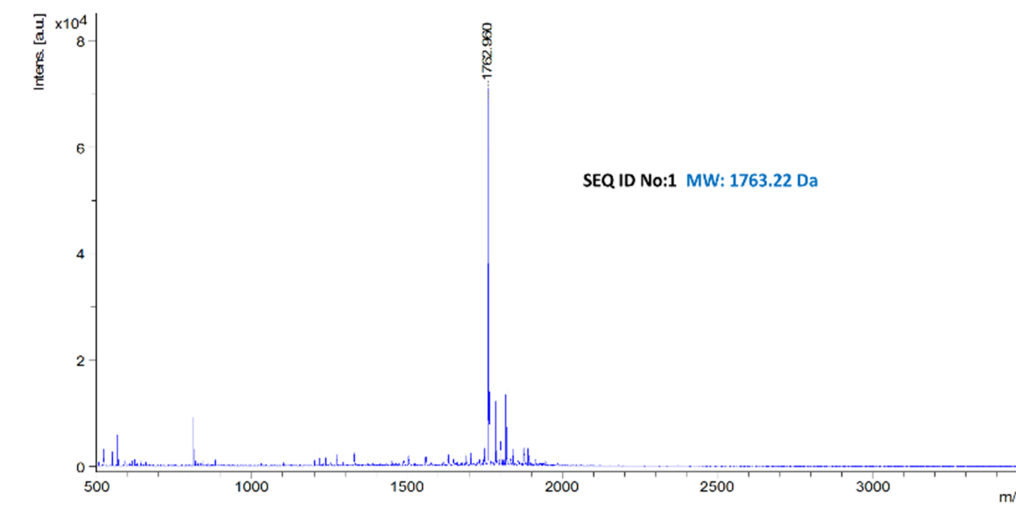


FIG. 2

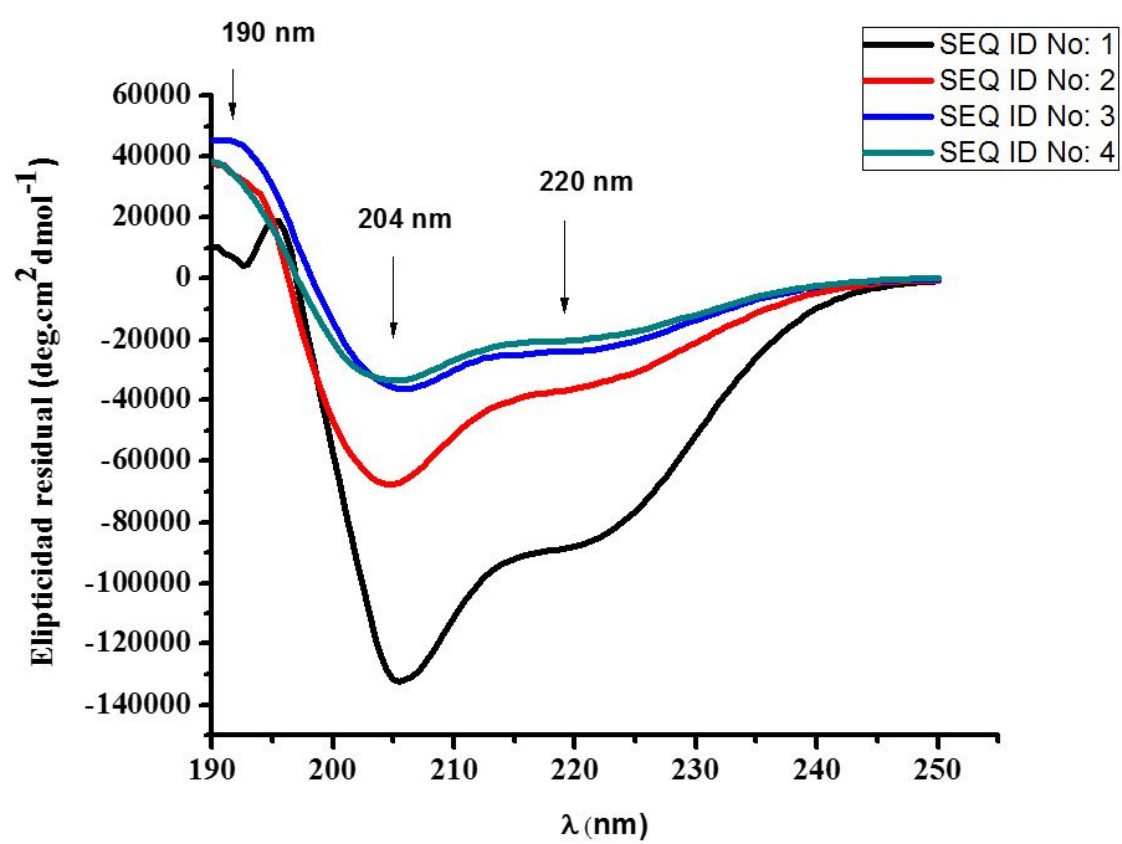


FIG. 3

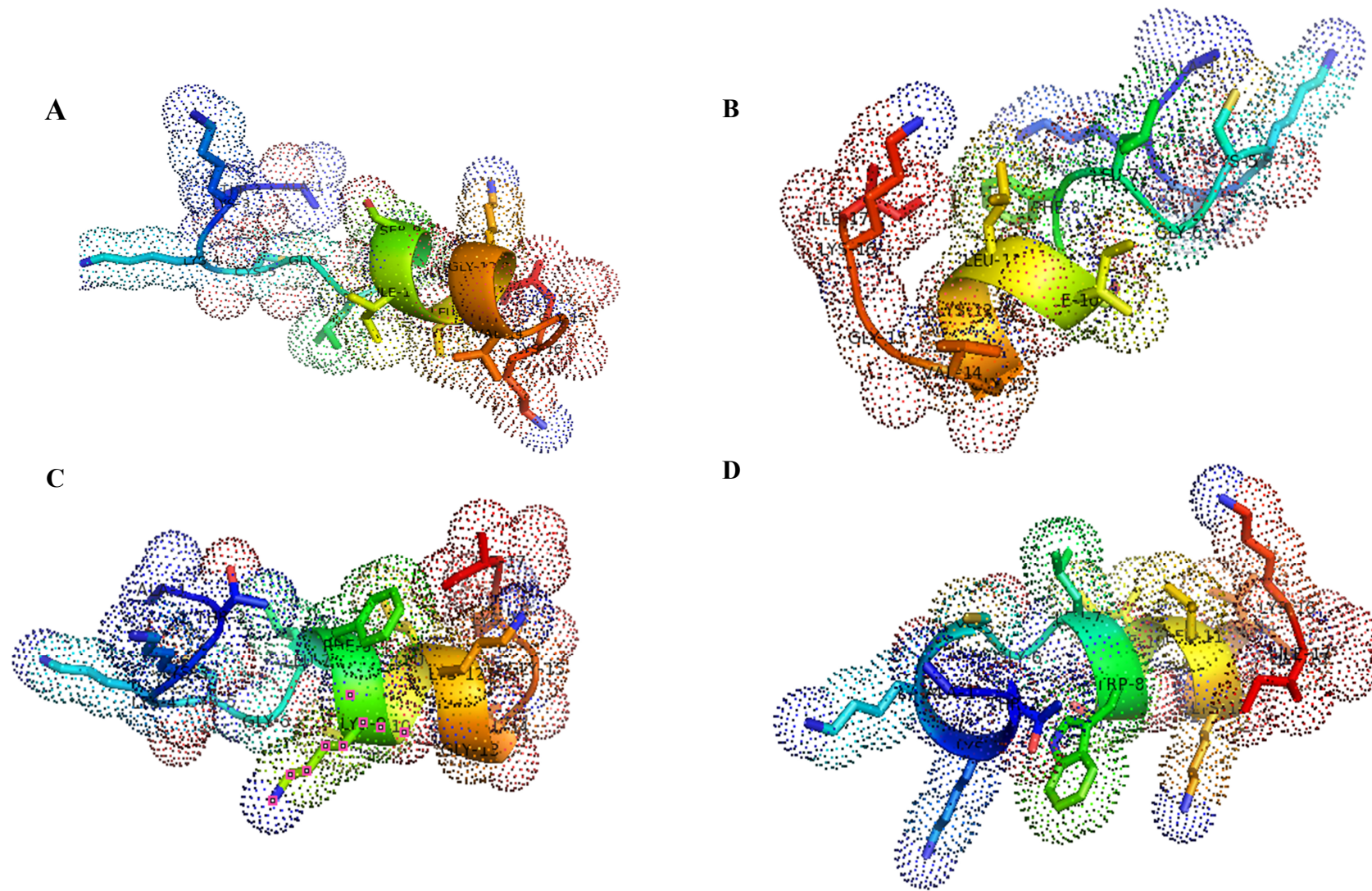


FIG. 4

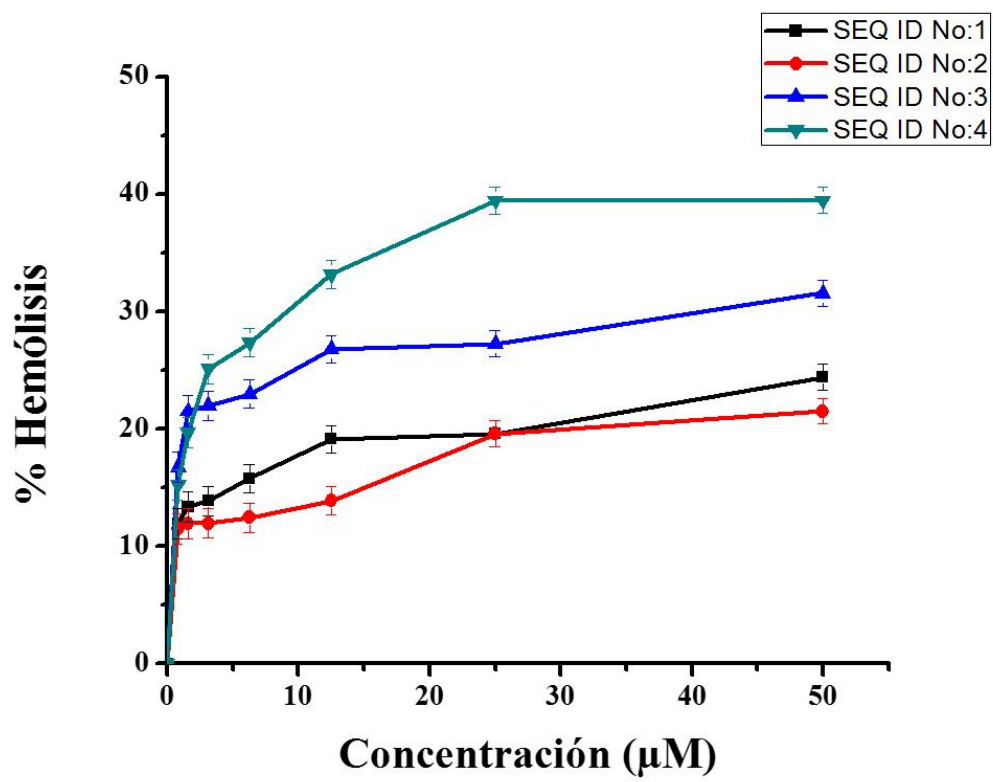


FIG. 5

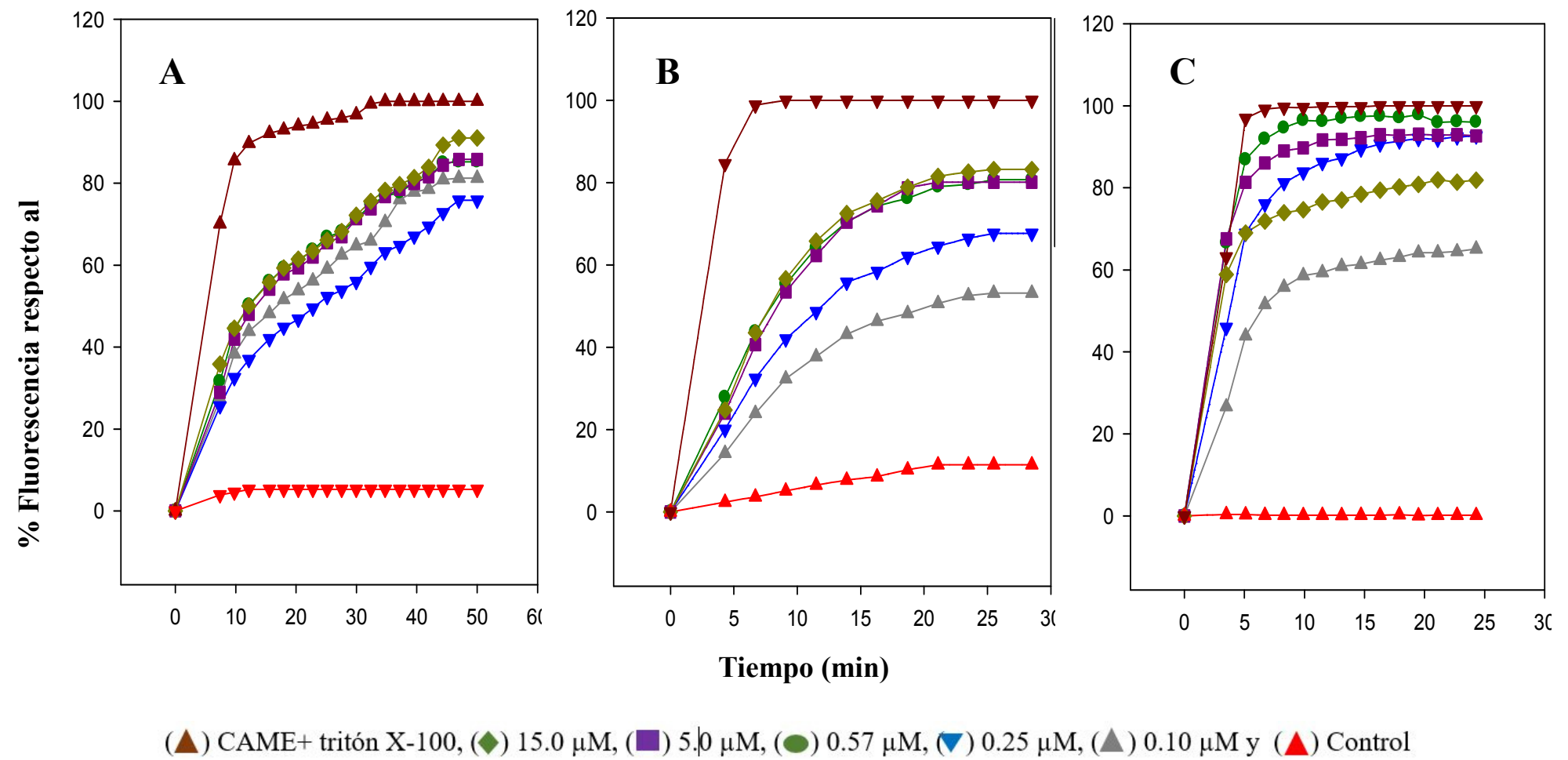


FIG. 6

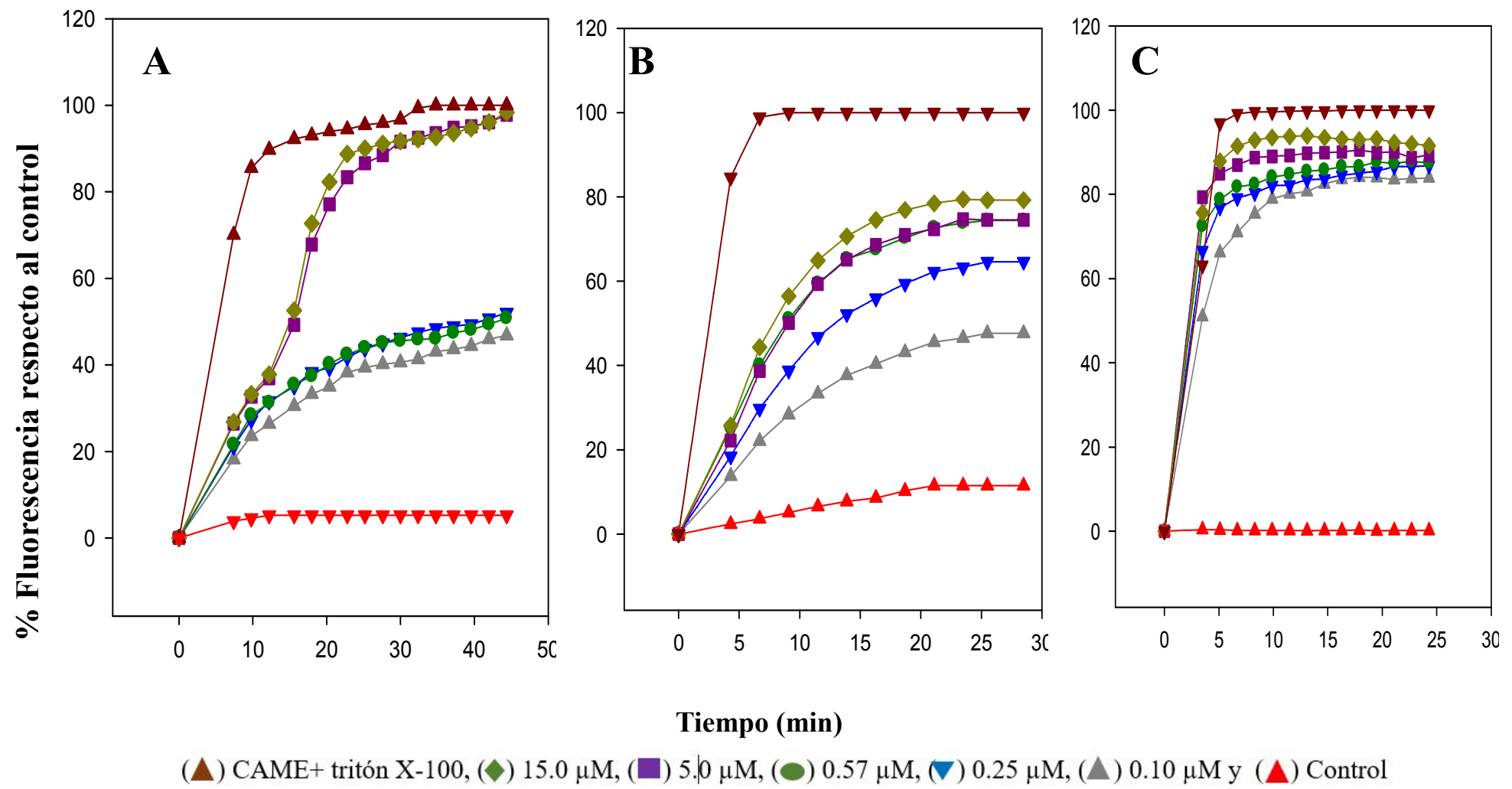


FIG. 7

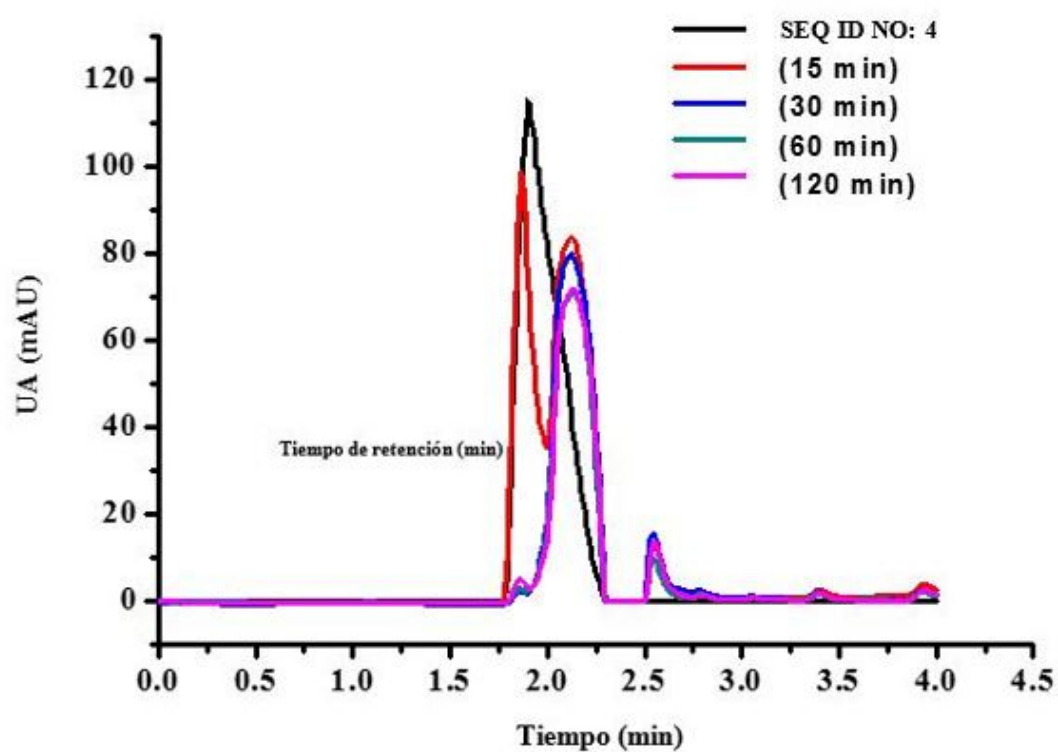


FIG. 8

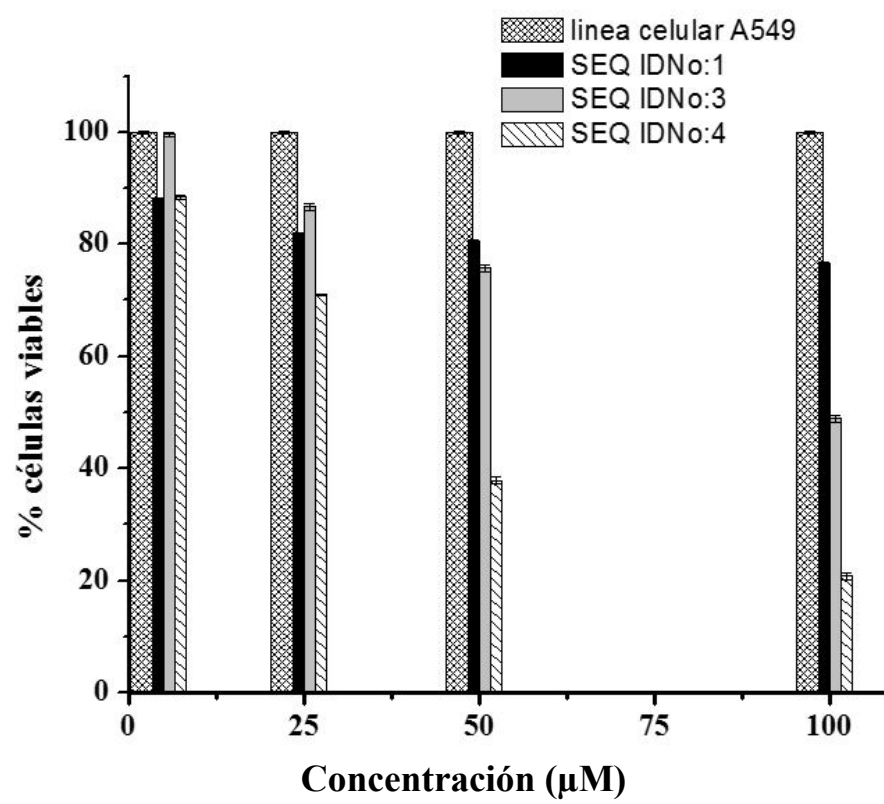


FIG. 9