

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 685**

21 Número de solicitud: 201731455

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

22.12.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.06.2019

71 Solicitantes:

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (100.0%)
Avenida Blasco Ibáñez, 13
46010 Valencia ES

72 Inventor/es:

REAL GARCÍA, María Dolores;
RAUSELL SEGARRA, Carolina;
GARCÍA ROBLES, Inmaculada;
BENITO JARDÓN, María y
ROBLES FORT, Aída

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **Péptido y composiciones farmacéuticas del mismo para uso como antimicrobiano y en el tratamiento del cáncer**

57 Resumen:

Péptido y composiciones farmacéuticas del mismo para uso como antimicrobiano y en el tratamiento del cáncer.

La presente invención se refiere a un péptido derivado de la defensina 3 del escarabajo rojo de la harina *Tribolium castaneum* y composiciones farmacéuticas que lo contienen y a su uso como antimicrobiano en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias Gram+, bacterias Gram- y hongos. La presente invención también se refiere al uso de dicho péptido y composiciones farmacéuticas que lo contienen, en el tratamiento del cáncer, en particular, el cáncer de mamá. El compuesto descrito es un péptido derivado de la defensina 3 del escarabajo rojo de la harina *T. castaneum*.

ES 2 717 685 A1

DESCRIPCIÓN

Péptido y composiciones farmacéuticas del mismo para uso como antimicrobiano y en el tratamiento del cáncer

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

10 La presente invención se refiere a compuestos y composiciones farmacéuticas para uso como antimicrobiano en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias Gram+, bacterias Gram- y hongos. La presente invención también se refiere a compuestos y composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento del cáncer, en particular, el cáncer de mamá. El compuesto descrito es un péptido derivado de la defensina 3 del escarabajo rojo de la harina *Tribolium castaneum*.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

20 Los péptidos antimicrobianos (AMPs, del inglés *antimicrobial peptides*) son candidatos prometedores como nuevos agentes antibióticos, dado que poseen un mecanismo de acción alternativo al de los antibióticos convencionales. Son excelentes agentes para contrarrestar el desarrollo de resistencia a los antibióticos. La rapidez con la que los péptidos antimicrobianos promueven la muerte celular es un factor adicional que contribuye a disminuir la probabilidad de desarrollar resistencia. Por otra parte, estos péptidos también pueden actuar sinérgicamente con los antibióticos convencionales potenciando y mejorando su actividad
25 terapéutica.

Los péptidos antimicrobianos tienen un tamaño pequeño, generalmente presentan cargas positivas y una relación entre residuos hidrofílicos e hidrofóbicos que les proporciona características anfipáticas. La combinación de hidrofobicidad con el carácter catiónico les
30 permite interactuar electrostáticamente con las membranas microbianas que típicamente presentan superficies aniónicas y ricas en lípidos.

Estos péptidos forman parte de la inmunidad innata de todos los organismos vivos, desde bacterias, hasta vertebrados, pasando por hongos, insectos y plantas, aunque no al mismo
35 nivel. Mientras que en invertebrados constituyen la principal arma de defensa de su sistema inmunológico, en vertebrados, además, modulan la inmunidad adaptativa mediante actividad

quimiotáctica, señalización proinflamatoria y antiinflamatoria y también ayudan al proceso de cicatrización.

5 *Tribolium castaneum*, el escarabajo rojo de la harina, es un insecto responsable de plagas de alimentos almacenados, y un organismo modelo para investigación en biología del desarrollo, evolución, inmunidad, etc.

El documento Contreras *et al.*, 2015 describe el efecto antimicrobiano de fragmentos de las defensinas del coleóptero *T. castaneum* (Tc) frente a *Bacillus thuringiensis* (Bt). Frente a las
10 toxinas entomopatógenicas Cry3Aa y Cry3Ba de esta bacteria, las larvas del insecto desarrollan una respuesta inmune en la que se induce la expresión de las defensinas 2 y 3 de *T. castaneum* (TcDef2 y TcDef3). En el documento se describe que TcDef3-pep, un fragmento peptídico de TcDef2, de 29 aminoácidos, tiene actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, destacando especialmente la susceptibilidad
15 de *S. aureus*. El péptido TcDef3-pep corresponde a la secuencia identificada por SEQ ID NO: 2 de la presente invención.

El documento Rajamuthiah *et al.*, 2015 describe péptidos antimicrobianos con actividad frente a *S. aureus*. Los autores describen un péptido obtenido a partir de *T. castaneum* (XM_968482,
20 codifica el péptido XP_973575.3) con actividad antibacteriana. Aunque los autores de este artículo se refieren a la defensina 1, la secuencia aminoacídica que aparece en la Figura 1A corresponde a la defensina 3 de *T. castaneum*.

El documento Tonk *et al.*, 2015 describe la actividad antimicrobiana de defensinas de *T.*
25 *castaneum* frente a bacterias Gram +. Las tres defensinas (Def1, Def2 y Def3) tienen actividad frente a *Micrococcus luteus* y *B. thuringiensis*, y sólo Def1 y Def2 tienen actividad frente a *Staphylococcus epidermis*. Los autores ensayan la actividad de las defensinas frente a *S. aureus*, observando ausencia de actividad antimicrobiana frente a este microorganismo (Figura 2 del citado documento).

30 Los cinco tipos de cáncer que causan mayor mortalidad son el pulmonar, el hepático, el colorrectal, el gástrico y el mamario. Concretamente, el cáncer de mama es el de mayor incidencia en Europa (458.718 casos, 13% del total) y el segundo a nivel mundial (1.7 millones de casos, 12% del total), ocupando el tercer y el quinto puesto en cuanto a mortalidad,
35 respectivamente.

Los carcinomas mamarios presentan neoplasias con una gran heterogeneidad, que han originado la necesidad de desarrollar diferentes sistemas de clasificación: histológica, de marcadores moleculares y funcional. La clasificación más utilizada en clínica es la dependiente de marcadores moleculares, que incluye los receptores de estrógeno (ER), los
5 receptores de progesterona (PR) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2). De acuerdo con la presencia o ausencia de estos marcadores, los tumores de mama se distribuyen en cuatro subtipos básicos: ER o PR positivo y HER2 negativo ([ER+ | PR+] HER2-), ER o PR positivo y HER 2 positivo ([ER+ | PR+] HER2+), ER y PR negativo y HER2 positivo ([ER- | PR-] HER2+), también llamado HER2 positivo y por último, ER y PR negativo
10 y HER2 negativo ([ER- | PR-] HER2-) también llamado triple negativo (TNBC, del inglés *Triple Negative Breast Cancer*), siendo éste el más agresivo y el de peor pronóstico.

El tratamiento del cáncer de mama requiere un abordaje multidisciplinar personalizado para cada individuo, que combina cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapias hormonales. El
15 cáncer de mama triple negativo plantea varios problemas añadidos, puesto que no responde a las terapias hormonales ya que carece de receptores, está asociado con un riesgo de metástasis cuatro veces mayor que otros tipos de tumores mamarios, y, además, el pico de riesgo de recurrencia se observa entre el primer y el tercer año, ocurriendo la mayoría de las muertes en los primeros cinco años. La quimioterapia es el único tratamiento que,
20 actualmente, mejora el resultado del TNBC, pero su alta citotoxicidad también para las células sanas y la aparición de quimiorresistencias hace que se estén investigando otras opciones de tratamiento, como las terapias dirigidas por moléculas. Desafortunadamente, la mayoría de este tipo de terapias conlleva adquisición de resistencias por parte de las células tumorales que limitan la eficacia del tratamiento. Una mejora interesante sería el desarrollo de nuevos
25 fármacos contra el cáncer de mama triple negativo, que maten selectivamente células tumorales o mermen su proliferación y que no se vean afectados por los mecanismos de resistencia ya conocidos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 En el contexto de productos con actividad antimicrobiana, el problema del estado de la técnica consiste en proporcionar péptidos derivados de la defensina 3 de *T. castaneum* con actividad antimicrobiana mejorada respecto a los péptidos derivados de la defensina 3 de *T. castaneum* descritos en el estado de la técnica.

35

La presente invención soluciona dicho problema proporcionando un péptido y una composición farmacéutica del mismo, que no han sido descritos en el estado de la técnica. Este nuevo péptido y composición farmacéutica del mismo tienen un efecto inesperado y muestran una mayor actividad frente a *S. aureus* que otros péptidos derivados de la defensina 3 de *T. castaneum* con actividad antimicrobiana descritos en el estado de la técnica.

El péptido de secuencia SEQ ID NO: 1 tiene 31 aminoácidos, un aminoácido adicional en cada extremo respecto al péptido TcDef3-pep, descrito en Contreras *et al.*, 2015, siendo ésta la diferencia estructural entre los dos péptidos.

El péptido descrito en Rajamuthiah *et al.*, 2015, denominado Tca1, presenta actividad frente a *S. aureus*, pero su secuencia posee 44 amino ácidos, frente a los 31 de SEQ ID NO: 1.

En el contexto de productos con actividad frente al cáncer, el problema del estado de la técnica consiste en proporcionar compuestos efectivos para su uso en el tratamiento del cáncer.

La presente invención soluciona dicho problema proporcionando un péptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 y una composición farmacéutica del mismo, efectivos para uso en el tratamiento del cáncer. Este nuevo uso en el tratamiento del cáncer no ha sido previamente descrito en el estado de la técnica.

En la presente memoria, el término “PaSK” hace referencia al péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1. Por tanto, en la presente memoria los términos y expresiones “PaSK”, “péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1” y “secuencia SEQ ID NO: 1”, son intercambiables.

En la presente memoria, el término “TcDef3-pep” hace referencia al péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2. Por tanto, en la presente memoria los términos y expresiones “TcDef3-pep”, “péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2” y “secuencia SEQ ID NO: 2”, son intercambiables.

Péptido y composición farmacéutica que comprende el péptido

La presente invención proporciona un péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1.

En una realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1 y al menos un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

5 En una realización, el portador está seleccionado del grupo que consiste en nanopartículas orgánicas, seleccionadas del grupo que consiste en: lípidos, nanoemulsiones, micelas poliméricas, nanopartículas SCK, liposomas, nanogeles, hidrogeles, lipoplexos, poliplexos; polímeros seleccionados del grupo que consiste en: albúmina, celulosa, quitosano, alginato, gelatina, poli- ϵ -caprolactona (PCL), hidroxietilo de almidón (HES; MEA), poliglicolato (PGA),
10 poli-(láctico-co-glicólido), polilactida (PLA), poli(d,1-láctido-co-glicólido) (PLGA), polietilenglicol (PEG), *N*-(2-Hidroxipropil) metacrilamida (poli(HPMA); PHPMA) y dextrano; dendrímeros, seleccionados del grupo que consiste en: poliéter-hidroxilamina (PEHAM), poliamidoamina (PAMAM), poliesteramina, polipropilenimina y poliglicerol; nanofibras, seleccionadas del grupo que consiste en: nanotubos de carbono, nanofibras de poli(d,1-
15 láctido-co-glicólido) (PLGA), de polietilenglicol (PEG), de quitosano, de poli(alcohol vinílico) (PVA), de polilactida (PLA), de óxido de polietileno y de poli- ϵ -caprolactona (PCL); y nanopartículas inorgánicas, seleccionadas del grupo que consiste en: nanopartículas de oro, nanopartículas de óxidos metálicos, nanopartículas de óxidos de titanio, nanopartículas de óxido de platino, nanopartículas de óxidos de hierro superparamagnéticas (SPIO-NPs),
20 nanopartículas basadas en diamante y nanopartículas QD.

En la presente memoria, el término "nanoemulsiones" hace referencia a mezclas heterogéneas de dos líquidos inmiscibles con un emulsificador que estabiliza las gotas dispersadas.

25 En la presente memoria, el término "micelas poliméricas" hace referencia a cadenas copoliméricas anfifílicas autoensambladas en medio acuoso, que presentan un núcleo hidrofóbico rodeado de una corona hidrofílica. Las micelas poliméricas incluyen micelas poliméricas del tipo poliiónico (PIC, del término inglés "*polyion complex*") y micelas complejo
30 polímero-metal.

El acrónimo "SCK" proviene del término inglés "*shell cross-linked knedel-like*". En la presente memoria, el término "nanopartículas SCK" hace referencia a cadenas copoliméricas anfifílicas autoensambladas en micelas poliméricas, en las que se realiza un entrecruzamiento selectivo
35 en la capa externa.

En la presente memoria, el término “lipoplexos” hace referencia a complejos formados por ácidos nucleicos (ADN/ARN) y lípidos catiónicos. Incluyen lipoplexos PEGilados.

5 En la presente memoria, el término “poliplexos” hace referencia a complejos formados por ácidos nucleicos (ADN/ARN) y polímeros. Incluyen poliplexos PEGilados.

En la presente memoria, el término “nanotubos de carbono” hace referencia a hojas de grafenos cilíndricas de pared única o multipared.

10 El acrónimo “SPIO-NPs” proviene del término inglés “*superparamagnetic iron oxides nanoparticles*”.

15 El acrónimo “QD” proviene del término inglés “*quantum dots*”. En la presente memoria, el término “nanopartículas QD” hace referencia a nanopartículas inorgánicas semiconductoras, muy utilizadas como fluoróforos en técnicas de imagen.

En una realización, la composición farmacéutica comprende una cantidad efectiva del péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1.

20 Se define como cantidad efectiva, a efectos de la presente invención, aquella cantidad del compuesto que proporciona una mejora objetivamente identificable en el estado del paciente, reconocida por un observador cualificado y donde dicho paciente es tratado con una composición farmacéutica que comprende dicha cantidad del compuesto.

25 Son excipientes farmacéuticamente aceptables, a efectos de la presente invención, ingredientes inertes tales como, pero no limitados a: codisolventes, tensioactivos, aceites, humectantes, emolientes, conservantes, estabilizadores y antioxidantes. Dicho excipiente o vehículo puede ser, por ejemplo, un diluyente. La composición farmacéutica puede estar en forma cristalina, en polvo, granular, sólida compactada, líquida, en solución, suspensión, elixir,
30 jarabe, emulsión, crema, gel, gota, neblina, vapor o pulverizador. Se pueden usar técnicas convencionales para la preparación de la composición farmacéutica. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede estar comprendida en una cápsula, tableta, píldora, comprimido oblongo, ampolla, sobre, jeringa, cartucho, nebulizador u otro recipiente.

35 La composición farmacéutica de la invención puede ser administrada por sí sola, o en combinación con otros principios activos.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar a un sujeto de diferentes maneras, dependiendo de si el tratamiento es local o sistémico, y dependiendo del área a tratar. Así, por ejemplo, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse a un sujeto por vía ocular, vaginal, rectal, intranasal, oral, por inhalación o por vía parenteral, ya sea intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intrarrectal, intraarterial, intralinfática, intravenosa, intratecal, intraocular, intracraneal e intratraqueal. La administración parenteral, si se usa, generalmente se realiza por inyección. Las soluciones para inyección se pueden preparar de varias maneras, tales como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para disolverse o colocarse en suspensión antes de la inyección, o como emulsiones. Otras formas de administración parenteral usan sistemas de liberación lenta o sostenida, de modo que se logra una dosis constante. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles, y también pueden contener tampones y aditivos diluyentes y otros. Ejemplos de disolventes no acuosos son: propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos para inyección tales como oleato de etilo. Los ejemplos de disolventes acuosos son: agua, soluciones acuosas de alcohol, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina y tampón. Ejemplos de vehículos parenterales son: solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, cloruro de sodio y dextrosa, etc. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes, etc. Las formulaciones para administración tópica pueden incluir cremas, lociones, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Ciertos portadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, bases oleosas o, en polvo, espesantes, etc. también pueden ser necesarios. Las composiciones para administración oral pueden incluir polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medio no acuoso, cápsulas o tabletas. Puede ser deseable incluir agentes espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, dispersantes, etc.

La composición farmacéutica de la invención puede ser administrada en dosis simples o múltiples.

30

En una realización, la composición farmacéutica comprende además un agente antibiótico.

En una realización, dicho agente antibiótico está seleccionado del grupo que consiste en ácido fusídico, arsfenamina, clindamicina, cloranfenicol, etambutol, fosfomicina, furazolidona, isoniazida, lincomicina, linezolid, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoína, pirazinamida, platensimicina, quinupristin, rifampicina y tinidazol o un antibiótico de la clase seleccionada

35

de: aminoglucósidos, ansamicinas, carbacefem, carbapenem, cefalosporinas, glicopéptidos, macrólidos, monobactámicos, penicilinas, polipéptidos, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas.

5 *Péptido o composición farmacéutica para uso como medicamento y como antimicrobiano*

En una realización, la presente invención proporciona el péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1 o la composición farmacéutica, para uso como medicamento.

10 En una realización, la presente invención se refiere al péptido o la composición farmacéutica para uso como medicamento antimicrobiano.

En una realización preferente, la presente invención se refiere al péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1 o la composición farmacéutica que lo comprende, para uso como medicamento
15 antimicrobiano en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias Gram+, bacterias Gram- y hongos.

En una realización preferente, dicha bacteria Gram+ es *S. aureus*.

20 En una realización preferente, dicha bacteria Gram- es *E. coli*.

En una realización preferente, dicho hongo es *C. albicans*.

Péptido o composición farmacéutica para uso en el tratamiento del cáncer

25

En una realización, la presente invención proporciona un péptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 o una composición farmacéutica que comprende dicho péptido y al menos un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento del cáncer.

30 En una realización, la composición farmacéutica comprende una cantidad efectiva del péptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1.

Son excipientes farmacéuticamente aceptables, ingredientes inertes tales como, pero no limitados a: codisolventes, tensioactivos, aceites, humectantes, emolientes, conservantes,
35 estabilizadores y antioxidantes. Dicho excipiente o vehículo puede ser, por ejemplo, un diluyente. La composición farmacéutica puede estar en forma cristalina, en polvo, granular,

sólida compactada, líquida, en solución, suspensión, elixir, jarabe, emulsión, crema, gel, gota, neblina, vapor o pulverizador. Se pueden usar técnicas convencionales para la preparación de la composición farmacéutica. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede estar comprendida en: una cápsula, tableta, píldora, comprimido oblongo, ampolla, sobre, jeringa, 5 cartucho, nebulizador u otro recipiente.

La composición farmacéutica puede ser administrada por sí sola o en combinación con otros principios activos.

10 La composición farmacéutica se puede administrar a un sujeto de diferentes maneras, dependiendo de si el tratamiento es local o sistémico, y dependiendo del área a tratar. Así, por ejemplo, la composición farmacéutica puede administrarse a un sujeto por vía ocular, vaginal, rectal, intranasal, oral, por inhalación o por vía parenteral, ya sea intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intrarrectal, intraarterial, intralinfática, intravenosa, 15 intratecal, intraocular, intracraneal e intratraqueal. La administración parenteral, si se usa, generalmente se realiza por inyección. Las soluciones para inyección se pueden preparar de varias maneras, tales como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para disolverse o colocarse en suspensión antes de la inyección, o como emulsiones. Otras formas de administración parenteral usan sistemas de liberación lenta o sostenida, de modo 20 que se logra una dosis constante. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles, y también pueden contener tampones y aditivos diluyentes y otros. Ejemplos de disolventes no acuosos son: propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos para inyección tales como oleato de etilo. Los ejemplos de disolventes acuosos son: agua, 25 soluciones acuosas de alcohol, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina y tampón. Ejemplos de vehículos parenterales son: solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, cloruro de sodio y dextrosa, etc. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes, etc. Las formulaciones para administración tópica pueden incluir 30 cremas, lociones, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Ciertos portadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, bases oleosas o, en polvo, espesantes, etc. también pueden ser necesarios. Las composiciones para administración oral pueden incluir polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medio no acuoso, cápsulas o tabletas. Puede ser deseable incluir agentes espesantes, aromatizantes, diluyentes, 35 emulsionantes, dispersantes, etc.

La composición farmacéutica puede ser administrada en dosis simples o múltiples.

En una realización particular, la presente invención proporciona un péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1 o una composición farmacéutica que comprende el péptido que
5 consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1 y al menos un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento del cáncer.

En una realización, el cáncer está seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de mama resistente a terapia anti-HER2, carcinoma de mama, adenocarcinoma de
10 mama, carcinoma gástrico, adenocarcinoma gástrico, carcinoma de colon, adenocarcinoma de colon, carcinoma de páncreas, adenocarcinoma de páncreas, carcinoma de células renales, carcinoma de células renales de células claras, carcinoma ovárico, adenocarcinoma ovárico, carcinoma ovárico, carcinoma endometrial, carcinoma del cuello uterino, carcinoma pulmonar, adenocarcinoma pulmonar, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer pulmonar de
15 células pequeñas, carcinoma tiroideo, carcinoma tiroideo papilar metastásico, carcinoma folicular tiroideo, carcinoma vesical, carcinoma de células transicionales de la vejiga urinaria, carcinoma de próstata, cáncer de linaje glial del sistema nervioso central (glioma), sarcomas, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, sarcoma de Edwing humano, sarcoma del estroma endometrial, osteosarcoma, rabdomiosarcoma, melanoma, cánceres embrionarios,
20 neuroblastoma, meduloblastoma, retinoblastoma, nefroblastoma, hepatoblastoma, cánceres hematológicos, leucemia de células B o T, linfoma no Hodgkin, linfoma no Hodgkin de células B o células T, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, leucemias, linfoma de células B o T, y mieloma múltiple.

25 En una realización preferente, el cáncer es cáncer de mama.

En una realización más preferente, el cáncer de mama es cáncer de mama triple negativo.

El péptido de la presente invención puede penetrar eficientemente en células tumorales
30 heterogéneas, lo que les permite ejercer su actividad intrínseca anticancerígena o en sinergia con otros agentes terapéuticos, y presenta una menor probabilidad de desarrollar resistencias que otros agentes terapéuticos.

En una realización, el péptido o la composición farmacéutica es para uso en el tratamiento del
35 cáncer en combinación con un tratamiento con un agente quimioterapéutico, con un tratamiento con un agente inmunoterapéutico, o con un tratamiento de radioterapia.

En una realización, dicho agente quimioterapéutico está seleccionado del grupo que consiste en: anastrozol, capecitabina, carboplatino, oxaliplatino, ciclofosfamida, cisplatino, docetaxel, doxorubicina, eribulina, fulvestrant, imiquimod, letrozol, paclitaxel, romidepsin, triciribina, xemestano, 5-fluorouracilo y gemcitabina.

5

En una realización, dicho agente inmunoterapéutico está seleccionado del grupo que consiste en: dovitinib, ipilimumab, lapatinib, margetuximab, neratinib, nivolumab, olaparib, palbociclib, pembrolizumab, pertuzumab, ruxolitinib, trastuzumab y veliparib.

10 En una realización de la composición farmacéutica para uso en el tratamiento del cáncer, dicho portador está seleccionado del grupo que consiste en nanopartículas orgánicas, seleccionadas del grupo que consiste en: lípidos, nanoemulsiones, micelas poliméricas, nanopartículas SCK, liposomas, nanogeles, hidrogeles, lipoplexos, poliplexos; polímeros
 15 seleccionados del grupo que consiste en: albúmina, celulosa, quitosano, alginato, gelatina, poli- ϵ -caprolactona (PCL), hidroxietilo de almidón (HES; MEA), poliglicolato (PGA), poli-(láctico-co-glicólido), polilactida (PLA), poli(d,1-láctido-co-glicólido) (PLGA), polietilenglicol (PEG), *N*-(2-Hidroxipropil) metacrilamida (poli(HPMA); PHPMA) y dextrano; dendrímeros, seleccionados del grupo que consiste en: poliéter-hidroxilamina (PEHAM), poliamidoamina (PAMAM), poliesteramina, polipropilenimina y poliglicerol; nanofibras, seleccionadas del
 20 grupo que consiste en: nanotubos de carbono, nanofibras de poli(d,1-láctido-co-glicólido) (PLGA), de polietilenglicol (PEG), de quitosano, de poli(alcohol vinílico) (PVA), de polilactida (PLA), de óxido de polietileno y de poli- ϵ -caprolactona (PCL); y nanopartículas inorgánicas, seleccionadas del grupo que consiste en: nanopartículas de oro, nanopartículas de óxidos metálicos, nanopartículas de óxidos de titanio, nanopartículas de óxido de platino,
 25 nanopartículas de óxidos de hierro superparamagnéticas (SPIO-NPs), nanopartículas basadas en diamante y nanopartículas QD

En una realización, la composición farmacéutica para uso en el tratamiento del cáncer comprende además un agente quimioterapéutico o un agente inmunoterapéutico.

30

En una realización, dicho agente quimioterapéutico está seleccionado del grupo que consiste en: anastrozol, capecitabina, carboplatino, oxaliplatino, ciclofosfamida, cisplatino, docetaxel, doxorubicina, eribulina, fulvestrant, imiquimod, letrozol, paclitaxel, romidepsin, triciribina, xemestano, 5-fluorouracilo y gemcitabina.

35

En una realización, dicho agente inmunoterapéutico está seleccionado del grupo que consiste en: dovitinib, ipilimumab, lapatinib, margetuximab, neratinib, nivolumab, olaparib, palbociclib, pembrolizumab, pertuzumab, ruxolitinib, trastuzumab y veliparib.

5 Los resultados de los Ejemplos 3 y 4 demuestran que PaSK (péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1) inhibe el crecimiento y la proliferación tumoral regulando la progresión del ciclo celular, afectando a la transición G1/S en células de cáncer de mama triple negativo. La proteína supresora de tumores p53 normalmente media la detención del ciclo celular y la apoptosis en respuesta al estrés genotóxico. Las células MDA-MB-231
10 poseen mutaciones puntuales que hacen que la proteína p53 no sea funcional en ellas. Por tanto, la inhibición del crecimiento y la proliferación de células de cáncer de mama triple negativo por PaSK no dependiente de p53, proporciona al péptido PaSK gran interés para su uso terapéutico en tumores de mama en los que p53 a menudo se encuentra mutado.

15 Definiciones

En la presente memoria, el término "cáncer" puede abarcar todos los tipos de procesos oncogénicos y/o crecimientos cancerosos. En realizaciones, el cáncer incluye tumores primarios, así como tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados
20 malignamente. En realizaciones, el cáncer abarca todas las histopatologías y etapas, por ejemplo, etapas de invasividad/gravedad, de un cáncer. En realizaciones, el cáncer incluye cáncer recidivante y/o resistente. Los términos "cáncer" y "tumor" pueden usarse indistintamente.

25 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos tienen el mismo significado que los comúnmente entendidos por una persona experta en la técnica en el campo de la invención. Se pueden usar métodos y materiales similares y equivalentes a los descritos aquí en la práctica de la presente invención.

30 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, el término "comprende", "que comprende" y sus variantes no son de naturaleza limitativa y, por lo tanto, no pretenden excluir otras características técnicas.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, el término "que consiste" o "que consiste
35 en", cuando se refiere, particularmente, a secuencias biológicas, significa que los compuestos

de la invención están restringidos de forma precisa al fragmento identificado como tal por la secuencia indicada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

Figura 1. Actividad antimicrobiana de los péptidos hBD-3, TcDef3-pep y PaSK contra *S. aureus*. Gráficas de la fluorescencia obtenida en las ventanas del citómetro de flujo de los controles negativo (A) y control positivo hBD-3 (B). Gráficas de la fluorescencia obtenida en las ventanas del citómetro de flujo de los péptidos TcDef3-pep (C) y PaSK (D). En el eje de ordenadas, FITC se refiere a la fluoresceína e indica las células que han incorporado SYBR green. En el eje de abscisas, PerCP-Cy5.5-A hace referencia a proteínas *peridinin-chlorophyll* y corresponde a las células que han captado yoduro de propidio. La ventana P2 muestra células vivas y la ventana P3 muestra células muertas.

15 **Figura 2.** Comparación de la citotoxicidad entre los péptidos hBD-3, TcDef3-pep y PaSK contra *S. aureus*. La actividad se midió a una concentración de 25 µg/mL en 2 réplicas. Se muestra la actividad para el control negativo (control), control positivo hBD-3, TcDef3-pep y PaSK. En la gráfica se representa la media de las dos réplicas con sus correspondientes desviaciones estándar.

20

Figura 3. Actividad antimicrobiana de los péptidos TcDef3-pep y PaSK contra *S. aureus*. Los puntos representan las medias de dos réplicas con sus correspondientes desviaciones estándar. Datos del péptido TcDef3-pep adquiridos a partir de Contreras *et al.*, 2015.

25 **Figura 4.** Imágenes del daño provocado por los péptidos en *S. aureus* realizadas con microscopía electrónica de barrido. Se muestran células no tratadas con péptidos (A-B) y tratadas con hBD-3 (C-D), TcDef3-pep (E-F) y PaSK (G-H) a una concentración de 25 µg/mL durante 1 hora. Las flechas continuas señalan roturas y abombamientos en la membrana, las flechas discontinuas señalan restos citoplasmáticos. El número que representa la escala es 3
30 µm (A), 2 µm (B), 4 µm (C), 2 µm (D), 4 µm (E), 500 nm (F), 2 µm (G) y 2 µm (H).

Figura 5. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido del biofilm producido por células de *S. aureus* tratadas con TcDef3-pep (A) y PaSK (B), a una concentración de 25 µg/mL durante 1 h. El número que representa la escala es 1 µm (A, foto superior), 2 µm (A, foto central), 4 µm (A, foto inferior), 4 µm (B, foto superior), 2 µm (foto central) y 3 µm (foto inferior).

Figura 6. Imágenes del daño provocado por los péptidos en *S. aureus* realizadas con microscopía electrónica de transmisión. Se muestran células no tratadas con péptidos (A-B) y tratadas con hBD-3 (C-D), TcDef3-pep (E-F) y PaSK (G-H) a una concentración de 25 µg/mL durante 1 h. Se señalan restos citoplasmáticos y de pared celular (6), malformaciones, desprendimientos en la membrana y adelgazamiento del peptidoglicano (4), lisis celular (5), vacuolización citoplásmica (7), malformación del septo de división (8) y unas estructuras muy electrodensas que solo aparecen en las células tratadas con el péptido PaSK (9). El número que representa la escala es 200 nm (A), 100 nm (B), 600 nm (C), 200 nm (D), 400 nm (E), 200 nm (F), 600 nm (G) y 200 nm (H).

10

Figura 7. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión del biofilm producido por células de *S. aureus* tratadas con los péptidos TcDef3-pep (A) y PaSK (B), a una concentración de 25 µg/mL durante 1 h. El número que representa la escala es 400 nm (A, izquierda), 400 nm (A, derecha), 400 nm (B, izquierda), 400 nm (B, derecha)

15

Figura 8. Determinación del efecto citotóxico del péptido PaSK en dos líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, una humana (MDA-MB-231) y otra de ratón (4T1), y una línea de células epiteliales mamarias normales de ratón (HC-11) por un ensayo MTS. Se muestran resultados para una concentración de suero fetal bovino de 0.5% y 24 h de incubación. El péptido PaSK tiene una IC₅₀ promedio de aproximadamente 200 µM (700 µg/mL) en los tres casos.

20

Figura 9. El péptido PaSK inhibe la proliferación de células de cáncer de mama triple negativo humanas (MDA-MB-231). Las células se incubaron con Oregon Green. El análisis de proliferación celular se realizó mediante citometría de flujo de células tumorales marcadas con el fluoróforo Oregon Green. Se muestran los resultados del control no proliferativo (pico con área en color negro), células no tratadas con el péptido (pico con área en color blanco) y células tratadas con 50 µM (200 µg/mL) de péptido PaSK (pico con área en color gris).

25

Figura 10. Actividad citotóxica del péptido PaSK contra células tumorales MDA-MB-231. Gráficas de las células vivas y muertas obtenidos en el citómetro de flujo, control (A) y tratamiento con PaSK (B). En el eje de ordenadas, SSC-A (*Side Scatter*) se refiere a la granularidad de las células de la población seleccionada. En el eje de abscisas, PerCP-Cy5.5-A hace referencia a *Peridinin-chlorophyll proteins* y corresponde a las células que han captado el yoduro de propidio. La actividad se midió a una concentración de 200 µg/mL de PaSK en

35

dos réplicas. Gráfica de viabilidad en la que se representan las medias de dos réplicas con sus correspondientes desviaciones estándar (C).

Figura 11. Actividad antiproliferativa del péptido PaSK contra células tumorales MDA-MB-231.

5 Análisis de progresión del ciclo celular usando el software ModFit LT, A) Control B) PaSK (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se detectó la distribución de células en las diferentes fases del ciclo celular en 2 réplicas. C) Gráfica del porcentaje de células observado en cada fase del ciclo celular, en la que se representan las medias de dos réplicas con sus correspondientes desviaciones estándar. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (test t-Student, $p \leq 0.05$). D) Esquema del ciclo celular mostrando la fase afectada por la acción del péptido PaSK.

Figura 12. Análisis discriminante de las medidas cuantitativas de proteínas obtenidas en las réplicas control y tratamiento del análisis proteómico diferencial con el software Marker View
15 1.3. Se analizaron 8 muestras (4 réplicas del control (muestras C1-C4) y 4 réplicas del tratamiento con PaSK (muestras P1-P4)).

Figura 13. Agrupaciones de proteínas diferenciales por función molecular. Agrupaciones de proteínas con abundancia disminuida (A) e incrementada (B) en la relación
20 tratamiento/control, realizadas en Uniprot (<http://www.uniprot.org>).

Figura 14. Imágenes del daño provocado por PaSK en células tumorales MDA-MB-231 realizadas con microscopía electrónica de barrido. Se muestran células no tratadas con el péptido PaSK (A-B) y tratadas con PaSK a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 72 horas
25 (D-F). Se señala la membrana (1) y expansiones de ésta (5), en las células sin tratamiento. Se señala la membrana de las células tratadas con PaSK (2) e invaginaciones y abombamientos (3). El número que representa la escala es 10 μm (A), 5 μm (B), 10 μm (C), 50 μm (D), 10 μm (E) y 10 μm (F).

30 **Figura 15.** Imágenes del daño provocado por PaSK en células tumorales MDA-MB-231 realizadas con microscopía electrónica de transmisión. Se muestran células no tratadas con el péptido PaSK (A-B) y tratadas con PaSK a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 72 horas (D-F). Se señala la membrana (1) y expansiones de ésta (5), en las células sin tratamiento. Se señala la membrana de las células tratadas con PaSK (2), invaginaciones y
35 abombamientos (3) y roturas de la membrana y vesículas con restos citoplasmáticos (4). El

número que representa la escala es 2 µm (A), 2 µm (B), 2 µm (C), 2 µm (D), 1 µm (E), 2 µm (F).

DESCRIPCIÓN DE MODOS DE REALIZACIÓN

5

Materiales y métodos

Péptidos utilizados

Los péptidos sintéticos utilizados en este estudio fueron: TcDef3-pep y PaSK, fragmentos de la defensina 3 de *T. castaneum*, y la defensina humana hBD-3 (PeptaNova).

Cepa bacteriana de Staphylococcus aureus subsp. aureus

Se utilizó la cepa CECT 4013 de *S. aureus* subsp. *aureus*, cepa accesible al público depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

15

Línea celular tumoral de glándula mamaria humana MDA-MB-231

Se utilizó la línea celular tumoral de glándula mamaria humana MDA-MB-231, identificada como ATCC® HTB-26™, línea celular accesible al público depositada en la autoridad de depósito *American Type Culture Collection* (ATCC). Las células se cultivaron en frascos de 75 cm² con medio DMEM, suplementado con suero fetal bovino 10%, penicilina y estreptomycinina 1% y fungizona 0.1%, y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera que contenía 5% de CO₂.

Preparación de muestras

Las células MDA-MB-231 se cultivaron en placas de 6 pocillos con una densidad de 5x10⁴ células por pocillo, a las que se añadieron 200 µL o 400 µL de PaSK (concentraciones finales 100 µg/mL y 200 µg/mL) o el mismo volumen de medio (solvente con el que se realizó la dilución del péptido) en los correspondientes controles. Las células se incubaron a 37°C durante 72 h.

30

Citometría de flujo de células de S. aureus

A partir de células de *S. aureus* cultivadas durante toda la noche en medio líquido LB (peptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%) a 37°C y en agitación, se realizaron alícuotas en medio líquido nuevo y se dejaron crecer hasta obtener una densidad óptica a 600 nm (OD600) de 0.5, óptima para su detección en el citómetro de flujo. Se prepararon alícuotas con una concentración de 5x10⁶ ufc/100µL de *S. aureus* a las que se añadieron 10, 15, 20 y 25 µg/mL

35

- de PaSK, 25 µg/mL de TcDef3-pep y H₂O (control negativo), solvente con el que se realizaron las diluciones de los péptidos. Las mezclas se incubaron a 37°C durante 8 h y se marcaron con los fluorocromos SYBR Green (Invitrogen) (25 µL de una solución de SYBR Green 25X en H₂O) que tiñe todas las células y yoduro de propidio (Sigma) (10 µL de yoduro de propidio 1 mg/mL) que tiñe células muertas. Finalmente, se analizó la muerte celular producida por los péptidos mediante citometría de flujo con el equipo BD FACS Verse (Becton Dickinson), de la sección de cultivos celulares y citometría de flujo de los Servicios Centrales de Soporte a la Investigación de la Universitat de València. Los experimentos se realizaron por duplicado.
- 10 El citómetro de flujo fuerza a las células a pasar una a una por una aguja creando una delgada fila de líquido y detecta cómo interactúa el rayo láser (láser de argón emisión a 488 nm, en el equipo empleado) con las células, dependiendo de cómo se desvía la luz incidente y la fluorescencia que emiten los fluorocromos excitados. Los resultados se presentan en forma de gráficas obtenidas con el programa de análisis BD FACS suite v1.0.5.3841 (Becton
- 15 Dickinson). Primero se realizó una gráfica control con los parámetros FSC (*Forward Scatter*) y SSC (*Side Scatter*) para buscar todos los eventos celulares. Dichos parámetros proporcionan el tamaño celular y la granularidad, respectivamente. A continuación, se realiza una segunda gráfica con los parámetros SSC y FITC (parámetro de fluorescencia que indica las células que presentan SYBR Green), para diferenciar las células del resto de partículas
- 20 que puede haber en la muestra. Por último, se realiza una tercera gráfica con los parámetros de fluorescencia FITC y PerCPCy5.5 (indica las células teñidas con yoduro de propidio) para diferenciar las células que solo se han teñido con SYBR Green de las que se han teñido con yoduro de propidio y que serán las que han muerto.
- 25 *Citometría de flujo de células tumorales de glándula mamaria humana MDA-MB-231*
Para estimar la viabilidad celular, las células de la línea celular *MDA-MB-231* se incubaron con 0.5 µL de una dilución 1:1000 del fluorocromo yoduro de propidio (IP) 1 mg/mL (Sigma-Aldrich), con el que se tiñeron las células muertas.
- 30 Para el análisis del ciclo celular se utilizó el kit CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit (Sigma-Aldrich). Se realizaron dos lavados con tampón citrato (contiene citrato de sodio, sacarosa y dimetil sulfóxido (DMSO)), centrifugando las muestras en cada uno de ellos a 300xg durante 5 min, y un lavado final, en el que se ajustó el número de células a 5x10⁵ y se centrifugaron a 400xg durante 5 min. A continuación, se añadieron 250 µL de solución A (contiene tripsina en
- 35 un tampón detergente con tetrahidrocloruro de espermina), 200 µL de solución B (contiene un inhibidor de tripsina y ribonucleasa A, en un tampón estabilizador de citrato con

tetrahidrocloruro de espermina) y 200 μ L de solución C (incluye IP y el tampón estabilizador de citrato con tetrahidrocloruro de espermina), dejando entre la adición de cada solución un intervalo de 10 min a temperatura ambiente y realizando el último, antes del filtrado, en cámara fría y en oscuridad. Los análisis de la muerte celular producida por el péptido y de la fase del ciclo celular en la que se encontraban las células se realizaron con el equipo BD FACS Verse (Becton Dickinson). El modelado del ciclo celular se llevó a cabo utilizando el software Modfit LT, versión 3.3.11. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Método MTS

La viabilidad celular se determinó utilizando el método MTS. Las células MDA-MB-231 cultivadas en placas de 96 pocillos a 37°C en una atmósfera humidificada con 10% de CO₂ hasta una densidad de 5x10³ células/pocillo, se incubaron con diferentes concentraciones del péptido PaSK durante 24 h. A continuación, se añadieron 20 μ L de la solución MTS/PMS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio/fenacina metosulfato) a cada pocillo y tras incubar durante 2 h en oscuridad, se efectuó la lectura de la absorbancia a 490 nm en un lector de placas. El porcentaje de reducción en el número de células se calculó mediante la ecuación $(1 - E/C) \times 100$, donde E es la absorbancia de las células tratadas con el péptido y C la absorbancia de las muestras de las células control.

Microscopía Electrónica de Barrido de células de S. aureus

Se prepararon las células del mismo modo que para la técnica de citometría de flujo y se realizaron las mismas alícuotas y tratamientos. Las muestras se incubaron a 37°C durante 1 h. Las bacterias se fijaron con Karnosky (2.5% paraformaldehído y 0.5 glutaraldehído) durante 2 h a 4°C. Después de un lavado (centrifugación y eliminación del sobrenadante), se fijaron con tetraóxido de osmio al 2% durante otras 2 h, se volvieron a lavar y se filtraron utilizando un filtro de 0.2 μ m. Seguidamente, las células se deshidrataron en series graduadas de etanol (30°, 50°, 70°, 90°, 100°) durante 10 min, en cada gradación. Para realizar el secado de punto crítico se sustituyó el etanol por CO₂ líquido, se aumentó la temperatura para acelerar la evaporación y se bajó la presión lentamente para conservar la forma exacta de las bacterias. Finalmente, se sombreó con oro paladio durante 2 min y se observaron los resultados en el equipo FEG-SEM HITACHI S4800 a 10 Kv.

Microscopía Electrónica de Barrido de células tumorales de glándula mamaria humana MDA-MB-231

Las células MDA-MB-231, control o tratadas con 100 μ g/mL de PaSK, se prepararon tal como se describe en el apartado "Preparación de muestras". Las células se fijaron con Karnosky

(paraformaldehído 2.5% y glutaraldehído 0.5%) durante 2 h a 4°C. Después de un lavado (centrifugación y eliminación del sobrenadante), se fijaron con tetraóxido de osmio al 2% durante otras 2 h, se volvieron a lavar y se filtraron utilizando un filtro de 0.2 µm. Seguidamente, las células se deshidrataron en series graduadas de etanol (30°, 50°, 70°, 90°, 100°) durante 10 min, en cada gradación. Para realizar el secado de punto crítico se substituyó el etanol por CO₂ líquido, se aumentó la temperatura para acelerar la evaporación y se bajó la presión lentamente para conservar la forma exacta de las células. Finalmente, se sombreó con oro paladio durante 2 min y se observaron los resultados en el equipo FEG-SEM HITACHI S4800 a 10 Kv.

10

Microscopía Electrónica de Transmisión de células de S. aureus y de células tumorales de glándula mamaria humana MDA-MB-231

Las muestras se prepararon del mismo modo que para microscopía electrónica de barrido, a excepción de la serie de deshidratación graduada con etanol en la que solo se llegó hasta la gradación de 90°. A continuación, se realizó la inclusión de las muestras en resina, en 4 pasos: etanol 96° - resina LR-White 2:1 (20 h), etanol 100° - resina 2:1 (20 h), etanol 100° - resina 1:2 (20 h) y 100% resina (24 h a 60°C). Una vez incluidas las muestras en la resina, se preparó el bloque para los cortes ultrafinos de 60 nm en el equipo Leica UC6 Ultracut Microtome. Finalmente, los cortes se contrastaron con plomo y se observaron los resultados en el equipo TEM JEOL-JEM1010 a 70kV.

20

Ejemplo 1. Análisis de la actividad antimicrobiana del péptido PaSK contra S. aureus

En este ejemplo se comparó la actividad antimicrobiana del péptido PaSK con la actividad antimicrobiana del péptido TcDef3-pep. La actividad antimicrobiana del péptido TcDef3-pep contra S. aureus ha sido descrita en Contreras *et al.*, 2015.

25

La actividad antimicrobiana del péptido PaSK se determinó mediante citometría de flujo. Dicha técnica se basa en la dispersión de la luz por parte de las células y la utilización de fluorocromos para discriminar entre células vivas y muertas. Todas las células son permeables al fluorocromo SYBR green, mientras que solo las células muertas lo son para el yoduro de propidio, ya que éste requiere que las membranas bacterianas estén dañadas para penetrar en su interior. Por tanto, la utilización de estos dos fluorocromos proporciona un método para determinar viables cuantificando la pérdida de viabilidad celular a partir del aumento de yoduro de propidio en el interior de las células muertas.

35

Tras la incubación de las células de la cepa CECT 4013 de *S. aureus* con 25 µg/mL de los péptidos TcDef3-pep y PaSK se determinó el porcentaje de células muertas. Como control positivo se utilizó, a la misma concentración, la defensina humana hBD-3, que posee actividad antimicrobiana contra distintos tipos de microorganismos, entre ellos *S. aureus*. Las Figuras 1A-1D muestran las gráficas correspondientes a la fluorescencia obtenida en las ventanas del citómetro de flujo. La ventana P2 muestra células vivas y la ventana P3 muestra células muertas.

En la Figura 2 se muestran los porcentajes de células muertas y las desviaciones estándar (SD) de las dos réplicas analizadas para los tratamientos con cada péptido y para las células control. La citotoxicidad de hBD-3 y TcDef3-pep fue alrededor del 70% y del 55%, respectivamente. Sin embargo, el péptido PaSK presenta un porcentaje de muerte celular casi del 100%. La mortalidad resultó ser estadísticamente significativa con el test t-Student de dos colas, $p \leq 0.05$ en los 3 péptidos respecto del control negativo y en el péptido PaSK también respecto de TcDef3-pep y hBD-3 (Figura 2).

Se analizó además la actividad antimicrobiana del péptido PaSK a concentraciones inferiores, 10, 15 y 20 µg/mL, en las mismas condiciones de los experimentos anteriores. La Figura 3 muestra el porcentaje de muerte celular a dichas concentraciones. Se observa que a la concentración de 10 µg/mL en la que el péptido TcDef3-pep mostró un porcentaje de mortalidad del 9,2% (Contreras *et al.*, 2015), el péptido PaSK ya posee una citotoxicidad próxima al 100%.

Ejemplo 2. Efecto de los péptidos TcDef3-pep y PaSK en la morfología de *S. aureus*

Microscopía Electrónica de Barrido

La microscopía electrónica de barrido proporciona imágenes de alta resolución y se utilizó para visualizar el daño ejercido por los péptidos en la membrana de las bacterias. Las células de *S. aureus* CECT 4013 se trataron con los péptidos hBD-3, TcDef3-pep y PaSK a una concentración de 25 µg/mL, durante 1 h, y se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (Figura 4). En las células sin tratamiento se observó la conformación circular y uniforme típica de *S. aureus* con la membrana intacta, mientras que en las células tratadas se advierten distintos tipos de alteraciones morfológicas. Las imágenes de las células tratadas con hBD-3 muestran daño estructural y lisis de la membrana (flechas continuas), además de una gran fuga del contenido citoplasmático (flechas discontinuas). En las células tratadas con el péptido TcDef3 se observan abombamientos en la membrana bacteriana (flechas

continuas) y algunos restos citoplasmáticos (flechas discontinuas), aunque no tan excesivos como en el tratamiento con hBD-3. Por último, las células tratadas con el péptido PaSK muestran morfologías irregulares de la membrana (flecha continua) y desintegraciones celulares completas con la consecuente liberación de restos citoplasmáticos (flecha discontinua). Con este tratamiento, se aprecian unas estructuras circulares de pequeño tamaño, de menor tamaño que las células de *S. aureus*.

En las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido de las células tratadas con los péptidos, se observó la formación de biofilm en las bacterias (Figura 5). Se descartó que la formación del exopolisacárido estuviese provocada por falta de nutrientes u otras características del medio de cultivo, ya que las muestras tratadas con hBD-3 (control positivo) y las que llevaban H₂O (control negativo) crecieron con el mismo medio y no formaron biofilm (Figura 4).

15 *Microscopía Electrónica de Transmisión*

La microscopía electrónica de transmisión proporciona imágenes de alta resolución y se utilizó para visualizar el daño ultraestructural ejercido por los péptidos en el interior de las bacterias. Las células de *S. aureus* CECT 4013 se trataron con los péptidos hBD-3, TcDef3-pep y PaSK a una concentración de 25 µg/mL, durante 1 hora y se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 6). En las células sin tratamiento se observaron la membrana citoplasmática (3) y la pared de peptidoglicano (2) intactas, típicas de una Gram + como es *S. aureus*, así como el septo de división (1) sin malformaciones, mientras que en las células tratadas se advierten distintos tipos de alteraciones. Las imágenes de las células tratadas con hBD-3 muestran malformaciones (4) y lisis de la membrana (5), además de una gran fuga del contenido citoplasmático, restos de pared desprendida (6) y vacuolización del citoplasma (7). En las células tratadas con el péptido TcDef3-pep se observan malformaciones y abombamientos en la membrana bacteriana (4), algunos restos citoplasmáticos y restos de pared desprendida (6). Por último, las células tratadas con el péptido PaSK muestran desprendimientos, malformaciones y adelgazamientos de la membrana (4), fuga de restos citoplasmáticos (6) y malformaciones e inhibición del septo de división (8). Se observaron estructuras circulares de pequeño tamaño (9). Estas estructuras muestran una electrodensidad diferente a la de las células y carecen de membrana citoplásmica y pared de peptidoglicano. También se observó el biofilm formado por las células tratadas con los péptidos en las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 7) y no se observó en las células tratadas con la defensina humana hBD-3 (Figura 6).

Ejemplo 3. Análisis de la actividad citotóxica y antiproliferativa del péptido PaSK

Se ha estudiado el efecto citotóxico del péptido PaSK en dos líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, una humana (MDA-MB-231) y otra de ratón (4T1), y una línea de células epiteliales mamarias normales de ratón (HC-11). Para ello, se llevó a cabo un ensayo MTS de viabilidad celular basado en la utilización de un compuesto derivado de tetrazolio que es reducido en las células vivas para formar un producto coloreado soluble.

Se ensayaron diferentes concentraciones de péptido (5 µg/mL a 700 µg/mL) a diferentes tiempos (3 h, 24 h y 48 h) y en presencia de distintas concentraciones de suero fetal bovino en el ensayo (0.5% y 10%), ya que se ha descrito que el suero afecta a la actividad de los péptidos antimicrobianos. Los resultados obtenidos mostraron que para una concentración de suero fetal bovino en el ensayo de 0.5% y 24 h de incubación, el péptido PaSK presenta actividad citotóxica dependiente de dosis en las dos líneas celulares de cáncer de mama triple negativo bajo estudio y también en la línea de células epiteliales mamarias normales, con una IC₅₀ promedio de aproximadamente 200 µM (700 µg/mL) en los tres casos (Figura 8). Estos datos confirman que el péptido PaSK presenta actividad citotóxica en células de mamífero a altas concentraciones. Sin embargo, en un rango de concentraciones de péptido alrededor de 100 µM (400 µg/mL), PaSK resultó significativamente más citotóxico para las células de cáncer de mama triple negativo humanas (MDA-MB-231).

Se llevó a cabo un análisis de proliferación celular mediante citometría de flujo de células tumorales marcadas con el fluoróforo Oregon Green posteriormente tratadas con una concentración de 50 µM (200 µg/mL) de péptido PaSK o H₂O como control. Este análisis permitió explorar el uso de PaSK en un tipo de estrategia terapéutica combinada. El uso combinado de agentes terapéuticos dirigidos a inhibir el crecimiento del tumor y su mantenimiento y agentes capaces de estimular la respuesta inmune del paciente en el tratamiento del cáncer es una estrategia de terapia alternativa a las estrategias convencionales basadas únicamente en agentes citotóxicos para reducir el impacto de los dos principales problemas asociados al uso exclusivo de agentes citotóxicos en terapia de cáncer: la toxicidad no específica y la aparición de resistencia.

El reactivo Oregon Green se une covalentemente a grupos amino libres de las células confiriéndoles una fluorescencia homogénea, que se distribuye entre las células hijas durante cada división celular. Como la intensidad de fluorescencia de las células se divide a la mitad aproximadamente tras cada división celular, la intensidad de fluorescencia final después del

tratamiento con el péptido y en las células control no tratadas en relación con la intensidad de fluorescencia inicial de las células proporciona información sobre cuántos ciclos de división celular han ocurrido en cada caso. En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos. Las células tratadas con el péptido PaSK presentan una intensidad de fluorescencia mayor que las células no tratadas, indicando que el péptido inhibe la proliferación de las células de cáncer de mama triple negativo humanas.

Ejemplo 4. Análisis de la actividad citotóxica y antiproliferativa del péptido PaSK

En este ejemplo, se analizó la actividad citotóxica y antiproliferativa del péptido PaSK mediante citometría de flujo, realizando un análisis de viabilidad celular y un análisis del ciclo celular. Tras el tratamiento de las células tumorales MDA-MB-231 con 200 µg/mL (experimentos de viabilidad celular) y 100 µg/mL (análisis del ciclo celular) de PaSK se determinó el porcentaje de células viables, así como la fase del ciclo celular en la que detenían la proliferación.

En las Figuras 10A y 10B se muestran las gráficas correspondientes a la viabilidad celular analizada a partir de la fluorescencia del yoduro de propidio (IP), representada en las gráficas procedentes del citómetro de flujo (la región P3 representa las células muertas). En el experimento control (Figura 10A), se obtuvo una viabilidad celular de 98%, mientras que en el tratamiento con PaSK (Figura 10B) la viabilidad celular fue de 93%.

En la Figura 10C se muestra el porcentaje de células vivas y las desviaciones estándar (SD) de las dos réplicas analizadas para el tratamiento con PaSK y para las células control. El porcentaje de mortalidad del péptido PaSK a una concentración de 200 µg/mL frente a las células MDA-MB-231 fue de alrededor del 5%, estadísticamente significativo respecto al control.

En las Figuras 11A y 11B se representan las gráficas con la distribución de células que se encontró en cada fase del ciclo celular obtenidas mediante citometría de flujo, detectando la fluorescencia del yoduro de propidio. En las células control y en las células tratadas con PaSK se observó la distribución siguiente: en fase G1 52.0% y 57.9%, en fase S 40.0% y 33.2% y en fase G2 8.0% y 9.0%, respectivamente.

La Figura 11C muestra el porcentaje de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular, G1, S y G2 y las desviaciones estándar (SD) de las dos réplicas analizadas para el

tratamiento con PaSK y para las células control. Se comparó si había diferencias estadísticamente significativas en cada fase del ciclo entre las células control y las células tratadas con el péptido utilizando el test t-Student de dos colas. La Figura 11D es un esquema del ciclo celular mostrando la fase afectada por la acción del péptido PaSK.

5

El péptido PaSK muestra actividad antiproliferativa, ya que las células tratadas presentan una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de células en fase S y un aumento en fase G1, aunque este último carente de significatividad estadística (Figura 11C y 11D).

10 Ejemplo 5. Análisis proteómico diferencial en células de cáncer de mama triple negativo tratadas con el péptido PaSK

Se realizó un análisis de proteómica diferencial mediante SWATH para dilucidar los mecanismos moleculares mediante los cuales el péptido ejerce actividad antiproliferativa
15 contra las células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 sin llegar a matar las células.

Se analizaron 8 muestras (4 réplicas del control y 4 réplicas del tratamiento con PaSK) en las cuales se cuantificaron un total de 1.571 proteínas (FDR 1%). A partir de los datos
20 cuantitativos, se realizó un análisis discriminante con el software Marker View 1.3, obteniéndose dos grupos claramente diferenciados, el de las réplicas del control y el de las réplicas del tratamiento (Figura 12).

Se realizó un test t-Student ($p \leq 0.05$) entre ambas condiciones (control y tratamiento) y de las
25 1.571 proteínas totales cuantificadas (FDR 1%), 31 se expresaron diferencialmente. De estas, 24 disminuyeron su abundancia y 7 la incrementaron en el tratamiento respecto del control (no sombreadas y sombreadas, respectivamente, en la Tabla 1).

Tabla 1. Expresión proteica diferencial de las células MDA-MB-231 tratadas y no tratadas con el péptido PaSK. En las muestras tratadas frente a muestras control, las proteínas no sombreadas y sombreadas disminuyen e incrementan su abundancia, respectivamente (test t-Student, $p \leq 0.05$). T significa muestras tratadas, C significa muestras control.

<i>Nombre del pico</i>	<i>Grupo</i>	<i>t-valor</i>	<i>p-valor</i>	<i>Relación cambio T/C</i>
sp O43681 ASN A_HUMAN	ATPasa ASNA1	3,928518034	0,02483	0,21
sp P06132 DCU P_HUMAN	Uroporfirinógeno descarboxilasa	4,993985482	0,00485	0,21
sp Q9H2U1 DH X36_HUMAN	Helicasa de ARN ATP-dependiente DHX36	2,904876045	0,02776	0,27
sp Q6PKG0 LA RP1_HUMAN	Proteína 1 relacionada con La (LARP1)	3,781059497	0,00944	0,28
sp Q9NR46 SH LB2_HUMAN	Endofilina-B2	4,204194474	0,00903	0,29
sp O43583 DEN R_HUMAN	Proteína regulada por densidad	2,881733444	0,02873	0,31
sp P26368 U2A F2_HUMAN	Factor de unión U2AF subunidad de 65 kDa	2,827938614	0,03412	0,31
sp Q9UIG0 BAZ 1B_HUMAN	Tirosina-proteína quinasa BAZ1B	4,121548898	0,00622	0,31
sp Q92544 TM9 S4_HUMAN	Miembro 4 de la superfamilia transmembrana 9	4,361795167	0,01640	0,37
sp P28340 DPO D1_HUMAN	Subunidad catalítica delta de ADN polimerasa	2,992215607	0,04858	0,50
sp P54819 KAD 2_HUMAN	Adenilato quinasa 2, mitocondrial	2,880711379	0,02808	0,51
sp P46777 RL5 _HUMAN	Proteína ribosomal L5 (RPSL5) 60 S	2,540854614	0,04416	0,60
sp Q99961 SH3 G1_HUMAN	Endofilina-A2	3,829746938	0,01530	0,63
sp P55145 MAN F_HUMAN	Factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálicos	2,878103845	0,04330	0,63
sp Q05682 CAL D1_HUMAN	Caldesmón	2,767832865	0,03276	0,71
sp P67936 TPM 4_HUMAN	Cadena alfa-4 de Tropomiosina	2,828936100	0,03159	0,74

Nombre del pico	Grupo	t-valor	p-valor	Relación cambio T/C
sp P37802 TAG L2_HUMAN	Transgelina-2	3,767777780	0,00985	0,75
sp P51114 FXR 1_HUMAN	Proteína 1 relacionada con el síndrome de retraso mental X frágil	2,578347605	0,04190	0,76
sp P62277 RS1 3_HUMAN	Proteína ribosomal S13 (RPS13) 40S	2,983650325	0,02454	0,82
sp P17812 PYR G1_HUMAN	CTP sintasa 1	3,226835542	0,03034	0,82
sp Q9H3H3 CK 068_HUMAN	Proteína UPF0696 C11orf68	5,038964701	0,00243	0,83
sp P55884 EIF3 B_HUMAN	Factor de iniciación de la traducción eucariota 3B (EIF3B)	2,849369384	0,03000	0,84
sp Q92841 DDX 17_HUMAN	Probable Helicasa de ARN ATP-dependiente DDX17	3,097817756	0,04655	0,84
sp Q01105 SET _HUMAN	Proteína SET	2,811921013	0,04233	0,90
sp Q9H5V8 CD CP1_HUMAN	Proteína 1 que contiene el dominio CUB	- 3,095597963	0,03259	1,22
sp Q9Y6N5 SQ RD_HUMAN	Sulfuro:quinona oxidoreductasa (SQRDL), mitocondrial	- 2,721378907	0,03583	1,30
sp O00560 SDC B1_HUMAN	Sintenina-1	- 2,958446255	0,03792	1,43
sp P15153 RAC 2_HUMAN	Sustrato 2 de toxina botulínica C3 relacionado con Ras	- 3,383777979	0,01906	1,45
sp Q16881 TRX R1_HUMAN	Tiorredoxina reductasa 1 (TXNRD1), citoplasmática	- 2,833271929	0,03590	1,59
sp P50281 MMP 14_HUMAN	Metaloproteasa de matriz 14	- 3,227397623	0,03678	1,92
sp P07203 GPX 1_HUMAN	Glutación peroxidasa 1 (GPX1)	- 5,481709009	0,00695	5,89

Adicionalmente, se llevó a cabo la agrupación de proteínas diferenciales en grupos funcionales en Uniprot, donde se observaron las agrupaciones de manera descriptiva tanto para las proteínas con abundancias disminuidas como incrementadas en la relación tratamiento/control. En la Figura 13 se observa la distribución por función molecular. De las

5

de unión (91.7%), las que presentan actividad catalítica (33.3%), con actividad molecular estructural (16.7%), reguladores de función molecular (12.5%) y finalmente, coactivadoras transcripcionales, transportadoras e iniciadoras de la traducción (4.2%) (Figura 13A). Por otro lado, de las proteínas con abundancia incrementada, las mayoritarias también son proteínas de unión (85.7%), las que presentan actividad catalítica (71.4%), con actividad antioxidante y actividad de regulación enzimática, cada una (28.6%) y finalmente, con actividad transportadora de electrones (14.3%) (Figura 13B).

Los resultados del análisis proteómico diferencial confirman que el péptido PaSK actúa sobre dianas intracelulares. De las 31 proteínas con expresión diferencial estadísticamente significativa, 24 disminuyeron su expresión y 7 la incrementaron en células MDA-MB-231 tratadas con el péptido (Tabla 1). Se trata de proteínas con capacidad oncogénica, algunas de las cuales se ha descrito que se encuentran sobreexpresadas en células tumorales de diferentes tipos y están implicadas, por ejemplo, en el transporte de vesículas, transducción de señales y apoptosis, en la alteración de rutas metabólicas, en procesos de reparación del ADN, transcripción o regulación post-transcripcional y traducción, en la adhesión y motilidad celular relacionadas con metástasis y en respuestas al estrés oxidativo.

De las 24 proteínas que disminuyen su expresión en las células tratadas con PaSK destacan, en relación con la regulación del ciclo celular, el factor de iniciación de la traducción eucariota 3B (EIF3B), las proteínas ribosomales S13 y L5 (RPS13 y RPSL5, respectivamente) y Proteína 1 relacionada con La (LARP1). EIF3 es un complejo de proteínas que organiza una red de interacciones entre varios factores de iniciación de la traducción eucariota que se asocian en la subunidad 40S y participan en las diferentes reacciones implicadas en la traducción. Además, posee otras funciones reguladoras como reiniciar la traducción de ARNm policistrónicos y actuar como un receptor de proteínas quinasas que controlan la síntesis de proteínas. Se ha demostrado que la regulación negativa de la expresión de EIF3B causa la acumulación de células en fase G0/G1, reduciendo significativamente el número de células tumorales en fase S, lo que sugiere que EIF3B puede estar asociado con una inhibición en la replicación del ADN que conduce a una reducción de la tasa de crecimiento celular.

Las proteínas ribosomales S13 y L5 forman parte de la subunidad 40S y 60S del ribosoma, respectivamente. Se ha descrito previamente que la sobreexpresión de RPS13 en células de cáncer gástrico promovía el crecimiento y la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, mientras que cuando se regulaba negativamente RPS13 en dichas células, incrementaba el número de células detenidas en fase G1. Se ha descrito que la pérdida de

RPL5 anula la biogénesis de los ribosomas y la síntesis de proteínas. Dicha pérdida no induce una parada completa del ciclo celular, pero inhibe fuertemente la progresión de éste. La disminución, tanto de EIF3B como de RPL5, inducirían un punto de control del ciclo celular independiente de p53. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el análisis de la actividad antiproliferativa del péptido PaSK del Ejemplo 4, donde se observó una disminución significativa de células MDA-MB-231 en fase S (Figura 11C), que sugiere un control del ciclo celular independiente de p53, ya que las células MDA-MB-231 poseen el gen p53 mutado y no funcional, como se ha comentado más arriba.

Tres de las proteínas con abundancia incrementada en las células tratadas con el péptido PaSK son glutatión peroxidasa 1 (GPX1), tioredoxina reductasa 1 (TXNRD1) y sulfuro:quinona oxidoreductasa (SQRDL). Las tres proteínas están implicadas en la respuesta al estrés oxidativo y suelen estar sobreexpresadas en las células tumorales. Debido a que la protección contra la oxidación activa los genes de supervivencia e inhibe la apoptosis, la sobreexpresión de dichas proteínas podría ser una respuesta de las células MDA-MB-231 a la actividad anticancerígena del péptido PaSK.

Ejemplo 6. Efecto del péptido PaSK en la morfología de células de cáncer de mama triple negativo

Tanto la microscopía electrónica de barrido como la microscopía electrónica de transmisión proporcionan imágenes de alta resolución y se utilizaron para visualizar el cambio morfológico y ultraestructural producido por el péptido PaSK en la membrana y el interior de las células tumorales. Las células MDA-MB-231 se trataron con el péptido PaSK a una concentración de 100 µg/mL, durante 72 h, y se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (Figura 14) y microscopía electrónica de transmisión (Figura 15). Las imágenes revelan que el péptido PaSK indujo importantes cambios morfológicos en las células tumorales MDA-MB-231. Tanto en microscopía electrónica de barrido como en microscopía electrónica de transmisión en las células sin tratamiento, se observó una conformación circular con la membrana continua e intacta y las vellosidades típicas de las células humanas (1). Sin embargo, en las células tratadas con PaSK se observó una membrana irregular en la que las vellosidades parecen estar descomponiéndose formando un entramado que se va desintegrando (2). Además, presentaron invaginaciones muy pronunciadas (3) y roturas completas de la membrana, que en algunos casos volvieron a recircularizarse formando vesículas con restos citoplasmáticos (4). Aunque en las células sin tratamiento también se observó lo que parecen ser expansiones de la membrana, dicha membrana es continua (5) y no estaba interrumpida como en las

células tratadas. Estos resultados ponen de manifiesto que el péptido PaSK posee un mecanismo de acción membranolítico.

TEXTO LIBRE DE LA LISTA DE SECUENCIAS

5

SEQ ID NO: 1

Defensina 3 de *Tribolium castaneum*; fragmento PaSK

SEQ ID NO: 2

10 Defensina 3 de *Tribolium castaneum*; fragmento TcDef3-pep

LISTA DE REFERENCIAS

- Contreras, E., Benito-Jardón, M., López-Galiano, M. J., Real, M. D. y Rausell, C. (2015).
15 *Tribolium castaneum* immune defense genes are differentially expressed in response to *Bacillus thuringiensis* toxins sharing common receptor molecules and exhibiting disparate toxicity. *Developmental and Comparative Immunology*. 50, 139-145.
- Rajamuthiah, R. *et al.* (2015). A defensin from the model beetle *Tribolium castaneum* acts synergistically with telavacin and daptomycin against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. *PLOS One*. 10(6):1-14.
20
- Tonk, M. *et al.* (2015). *Tribolium castaneum* defensins are primarily active against Gram-positive bacteria. *J Invertebrate Pathol*. 132: 208-215.

REIVINDICACIONES

1. Péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende el péptido según la reivindicación 1 y al menos un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.
3. La composición farmacéutica según la reivindicación 2, caracterizada por que dicho portador está seleccionado del grupo que consiste en nanopartículas orgánicas,
10 seleccionadas del grupo que consiste en: lípidos, nanoemulsiones, micelas poliméricas, nanopartículas SCK, liposomas, nanogeles, hidrogeles, lipoplexos, poliplexos; polímeros seleccionados del grupo que consiste en: albúmina, celulosa, quitosano, alginato, gelatina, poli- ϵ -caprolactona (PCL), hidroxietilo de almidón (HES; MEA), poliglicolato (PGA), poli(láctico-co-glicólido), polilactida (PLA), poli(d,1-láctido-co-glicólido) (PLGA), polietilenglicol
15 (PEG), *N*-(2-Hidroxipropil) metacrilamida (poli(HPMA); PHPMA) y dextrano; dendrímeros, seleccionados del grupo que consiste en: poliéter-hidroxilamina (PEHAM), poliamidoamina (PAMAM), poliesteramina, polipropilenimina y poliglicerol; nanofibras, seleccionadas del grupo que consiste en: nanotubos de carbono, nanofibras de poli(d,1-láctido-co-glicólido) (PLGA), de polietilenglicol (PEG), de quitosano, de poli(alcohol vinílico) (PVA), de polilactida
20 (PLA), de óxido de polietileno y de poli- ϵ -caprolactona (PCL); y nanopartículas inorgánicas, seleccionadas del grupo que consiste en: nanopartículas de oro, nanopartículas de óxidos metálicos, nanopartículas de óxidos de titanio, nanopartículas de óxido de platino, nanopartículas de óxidos de hierro superparamagnéticas (SPIO-NPs), nanopartículas basadas en diamante y nanopartículas QD.
25
4. La composición farmacéutica según la reivindicación 3, que comprende además un agente antibiótico.
5. La composición farmacéutica según la reivindicación 4, caracterizada por que dicho agente
30 antibiótico está seleccionado del grupo que consiste en ácido fusídico, arsfenammina, clindamicina, cloranfenicol, etambutol, fosfomicina, furazolidona, isoniazida, lincomicina, linezolid, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoína, pirazinamida, platensimicina, quinupristin, rifampicina y tinidazol o un antibiótico de la clase seleccionada de: aminoglucósidos, ansamicinas, carbacefem, carbapenem, cefalosporinas, glicopéptidos, macrólidos,
35 monobactámicos, penicilinas, polipéptidos, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas.

6. El péptido según la reivindicación 1 o la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, para uso como medicamento.
7. El péptido o la composición farmacéutica para uso, según la reivindicación 6, como medicamento antimicrobiano.
8. El péptido o la composición farmacéutica para uso, según la reivindicación 7, como medicamento antimicrobiano en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias Gram+, bacterias Gram- y hongos.
9. El péptido o la composición farmacéutica para uso, según la reivindicación 8, caracterizado por que dicha bacteria Gram+ es *Staphylococcus aureus*.
10. El péptido o la composición farmacéutica para uso, según la reivindicación 8, caracterizado por que dicha bacteria Gram- es *Escherichia coli*.
11. El péptido o la composición farmacéutica para uso, según la reivindicación 8, caracterizado por que dicho hongo es *Candida albicans*.
12. Un péptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 o una composición farmacéutica que comprende el péptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 y al menos un excipiente o un portador farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento del cáncer.
13. El péptido o la composición farmacéutica para uso, según la reivindicación 12, caracterizado por que el cáncer está seleccionado del grupo compuesto por cáncer de mama, cáncer de mama resistente a terapia anti-HER2, carcinoma de mama, adenocarcinoma de mama, carcinoma gástrico, adenocarcinoma gástrico, carcinoma de colon, adenocarcinoma de colon, carcinoma de páncreas, adenocarcinoma de páncreas, carcinoma de células renales, carcinoma de células renales de células claras, carcinoma ovárico, adenocarcinoma ovárico, carcinoma ovárico, carcinoma endometrial, carcinoma del cuello uterino, carcinoma pulmonar, adenocarcinoma pulmonar, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer pulmonar de células pequeñas, carcinoma tiroideo, carcinoma tiroideo papilar metastásico, carcinoma folicular tiroideo, carcinoma vesical, carcinoma de células transicionales de la vejiga urinaria, carcinoma de próstata, cáncer de linaje glial del sistema nervioso central (glioma), sarcomas, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, sarcoma de Edwing humano, sarcoma del estroma endometrial, osteosarcoma, rhabdomiosarcoma, melanoma, cánceres embrionarios,

neuroblastoma, meduloblastoma, retinoblastoma, nefroblastoma, hepatoblastoma, cánceres hematológicos, leucemia de células B o T, linfoma no Hodgkin, linfoma no Hodgkin de células B o células T, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, leucemias, linfoma de células B o T y mieloma múltiple.

5

14. El péptido o la composición farmacéutica para uso, según la reivindicación 13, caracterizado por que el cáncer es cáncer de mama.

15. El péptido o la composición farmacéutica para uso, según la reivindicación 14,
10 caracterizado por que el cáncer de mama es cáncer de mama triple negativo.

16. El péptido o la composición farmacéutica para uso en el tratamiento del cáncer, según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en combinación con un tratamiento con un agente quimioterapéutico, con un tratamiento con un agente inmunoterapéutico, o con un tratamiento
15 de radioterapia.

17. El péptido o la composición farmacéutica para uso, según la reivindicación 16, caracterizado por que dicho agente quimioterapéutico está seleccionado del grupo que consiste en anastrozol, capecitabina, carboplatino, oxaliplatino, ciclofosfamida, cisplatino,
20 docetaxel, doxorrubicina, eribulina, fulvestrant, imiquimod, letrozol, paclitaxel, romidepsin, tricitribina, xemestano, 5-fluorouracilo y gemcitabina.

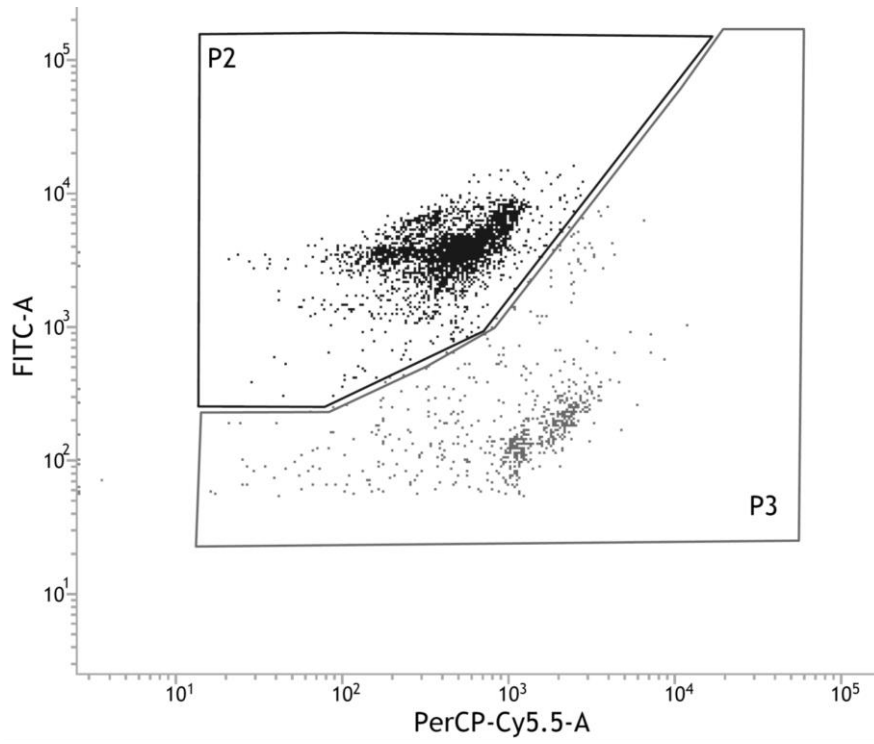
18. El péptido o la composición farmacéutica para uso, según la reivindicación 16, caracterizado por que dicho agente inmunoterapéutico está seleccionado del grupo que
25 consiste en dovitinib, ipilimumab, lapatinib, margetuximab, neratinib, nivolumab, olaparib, palbociclib, pembrolizumab, pertuzumab, ruxolitinib, trastuzumab y veliparib.

19. La composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, caracterizada por que el portador está seleccionado del grupo que consiste en nanopartículas
30 orgánicas, seleccionadas del grupo que consiste en: lípidos, nanoemulsiones, micelas poliméricas, nanopartículas SCK, liposomas, nanogeles, hidrogeles, lipoplexos, poliplexos; polímeros seleccionados del grupo que consiste en: albúmina, celulosa, quitosano, alginato, gelatina, poli- ϵ -caprolactona (PCL), hidroxietilo de almidón (HES; MEA), poliglicolato (PGA), poli-(láctico-co-glicólido), polilactida (PLA), poli(d,1-láctido-co-glicólido) (PLGA),
35 polietilenglicol (PEG), *N*-(2-Hidroxipropil) metacrilamida (poli(HPMA); PHPMA) y dextrano; dendrímeros, seleccionados del grupo que consiste en: poliéter-hidroxilamina (PEHAM),

- poliamidoamina (PAMAM), poliesteramina, polipropilenimina y poliglicerol; nanofibras, seleccionadas del grupo que consiste en: nanotubos de carbono, nanofibras de poli(d,1-láctido-co-glicólido) (PLGA), de polietilenglicol (PEG), de quitosano, de poli(alcohol vinílico) (PVA), de polilactida (PLA), de óxido de polietileno y de poli-ε-caprolactona (PCL); y
- 5 nanopartículas inorgánicas, seleccionadas del grupo que consiste en: nanopartículas de oro, nanopartículas de óxidos metálicos, nanopartículas de óxidos de titanio, nanopartículas de óxido de platino, nanopartículas de óxidos de hierro superparamagnéticas (SPIO-NPs), nanopartículas basadas en diamante y nanopartículas QD.
- 10 20. La composición farmacéutica para uso, según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19, que comprende además un agente quimioterapéutico o un agente inmunoterapéutico.
21. La composición farmacéutica para uso, según la reivindicación 20, caracterizada por que dicho agente quimioterapéutico está seleccionado del grupo que consiste en anastrozol,
- 15 capecitabina, carboplatino, oxaliplatino, ciclofosfamida, cisplatino, docetaxel, doxorubicina, eribulina, fulvestrant, imiquimod, letrozol, paclitaxel, romidepsin, triciribina, xemestano, 5-fluorouracilo y gemcitabina.
22. La composición farmacéutica para uso, según la reivindicación 20, caracterizada por que
- 20 dicho agente inmunoterapéutico está seleccionado del grupo que consiste en dovitinib, ipilimumab, lapatinib, margetuximab, neratinib, nivolumab, olaparib, palbociclib, pembrolizumab, pertuzumab, ruxolitinib, trastuzumab y veliparib.

FIGURA 1

A



B

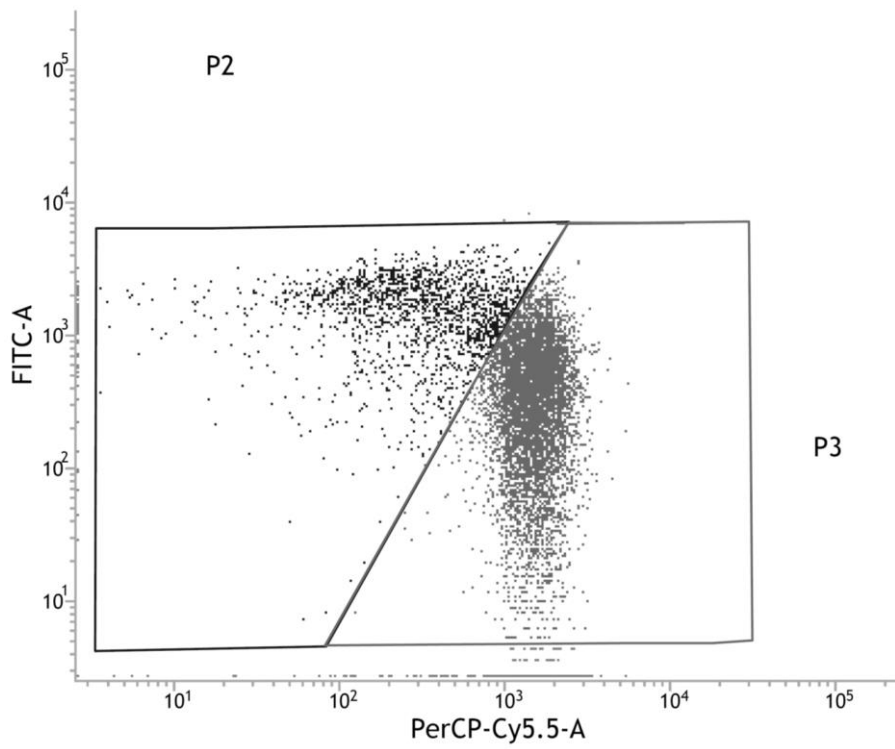
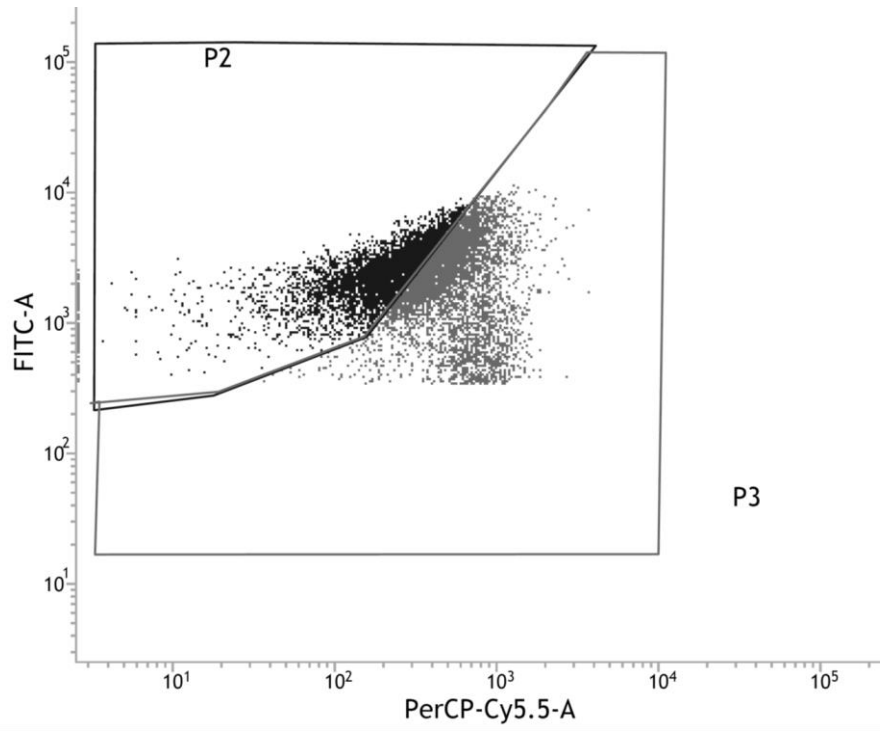


FIGURA 1 (Cont.)

C



D

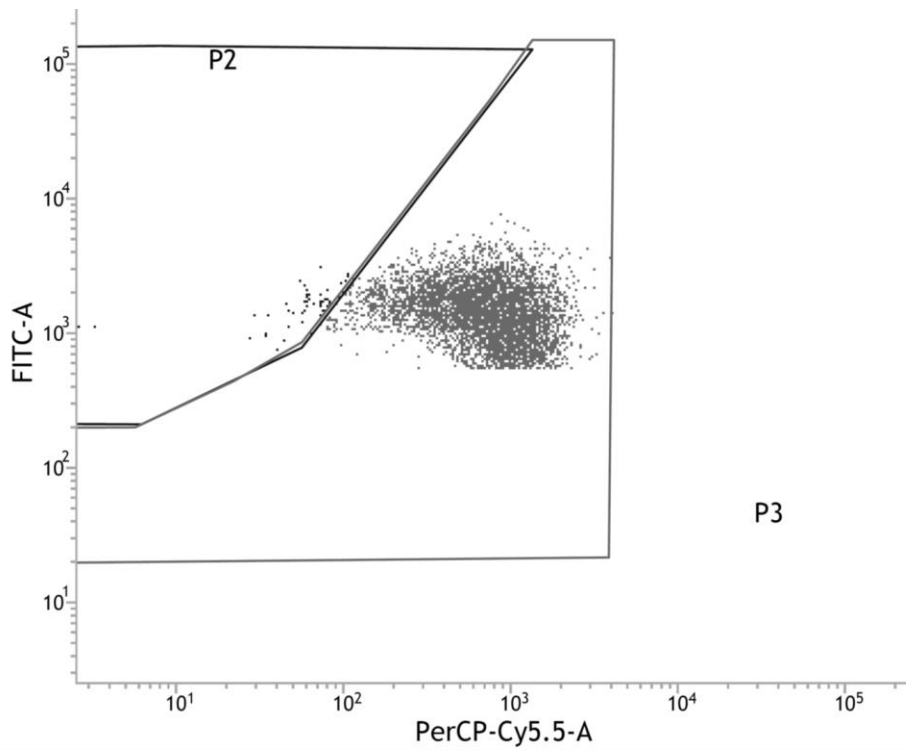


FIGURA 2

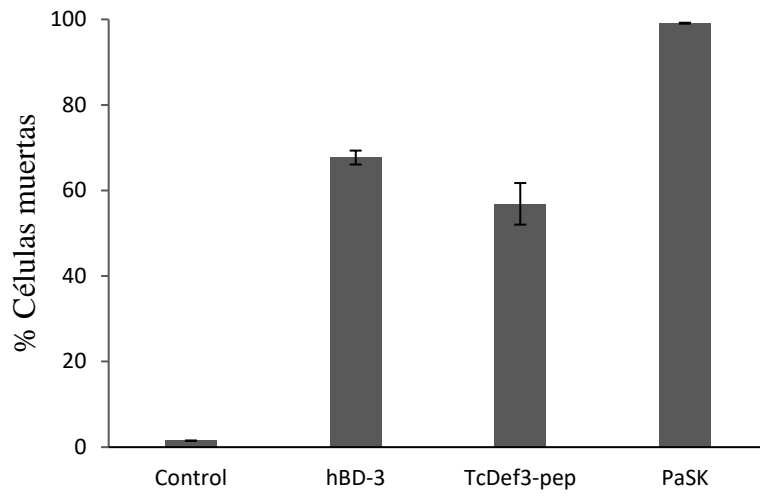


FIGURA 3

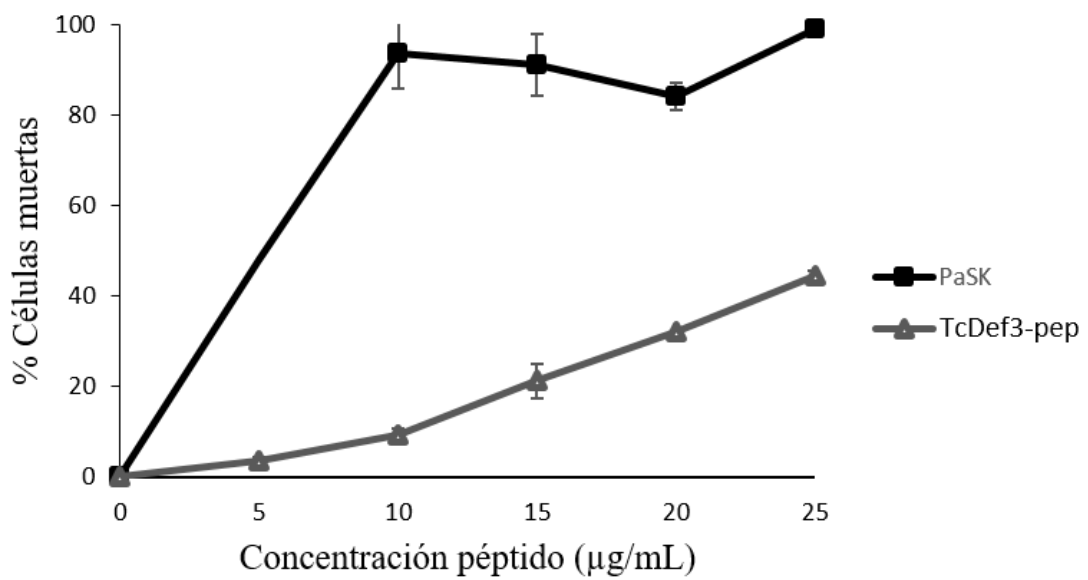


FIGURA 4

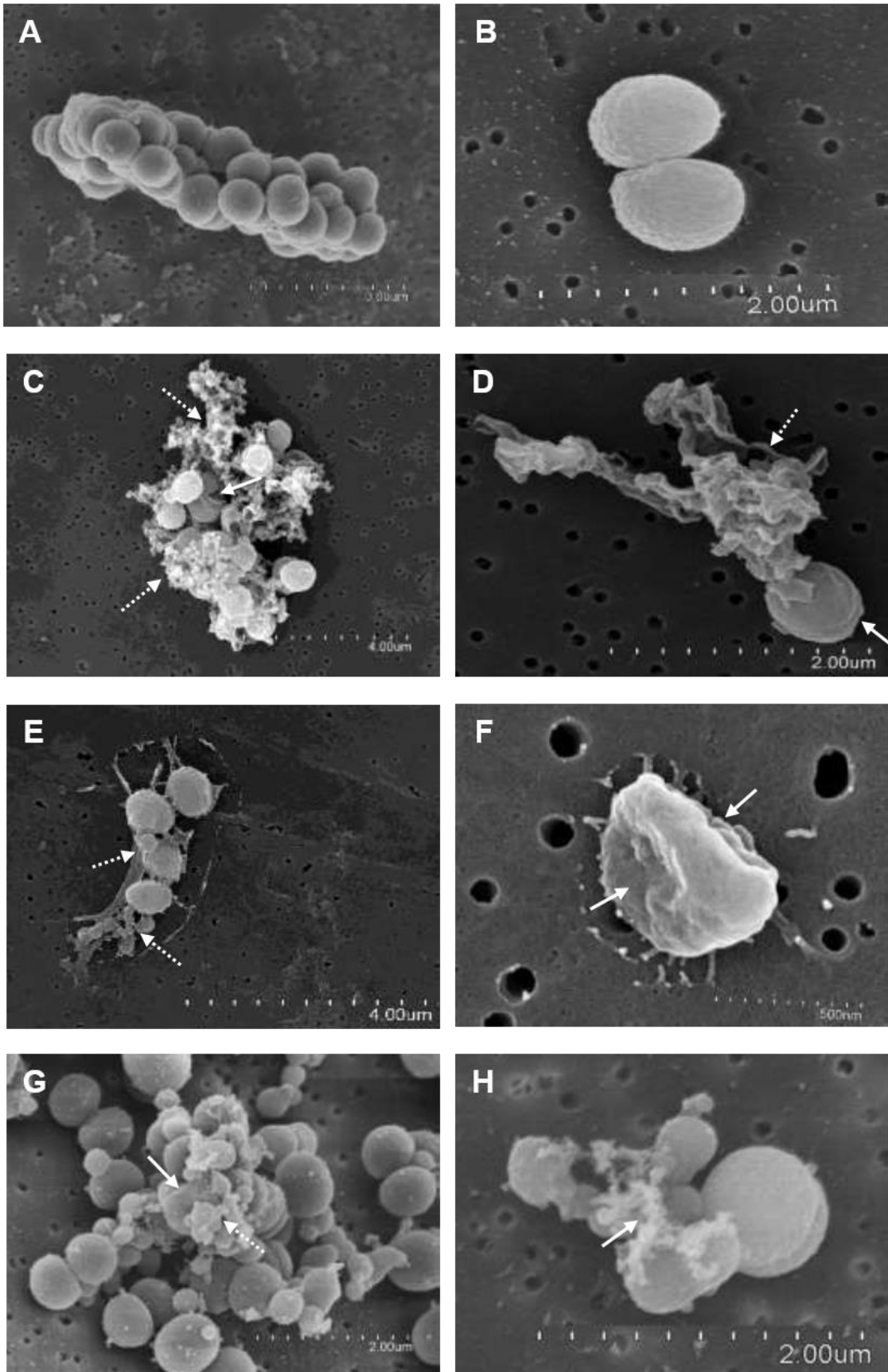


FIGURA 5

A

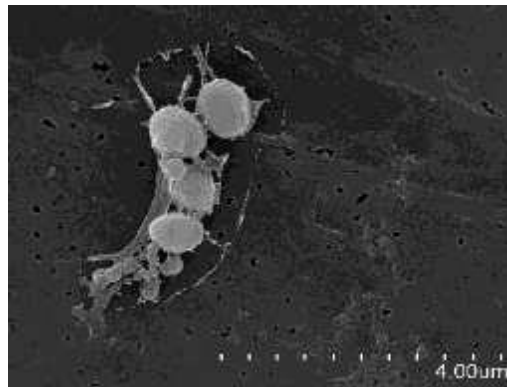
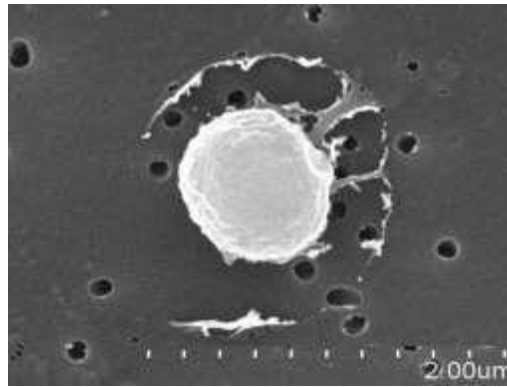
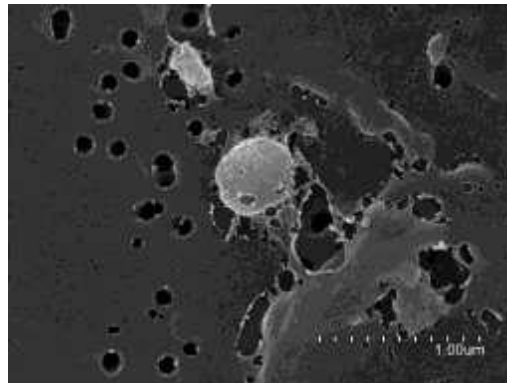


FIGURA 5 (Cont.)

B

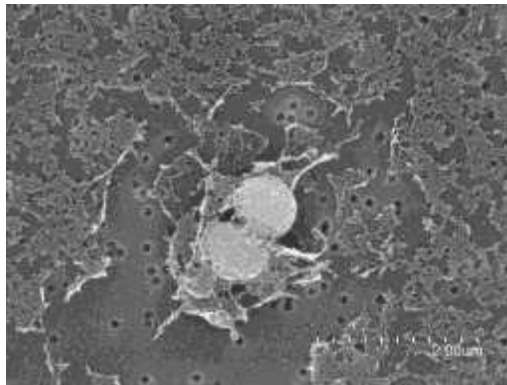
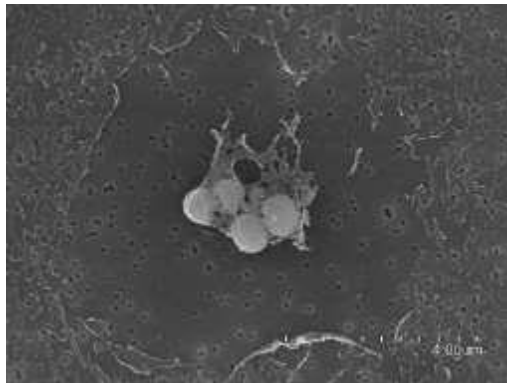


FIGURA 6

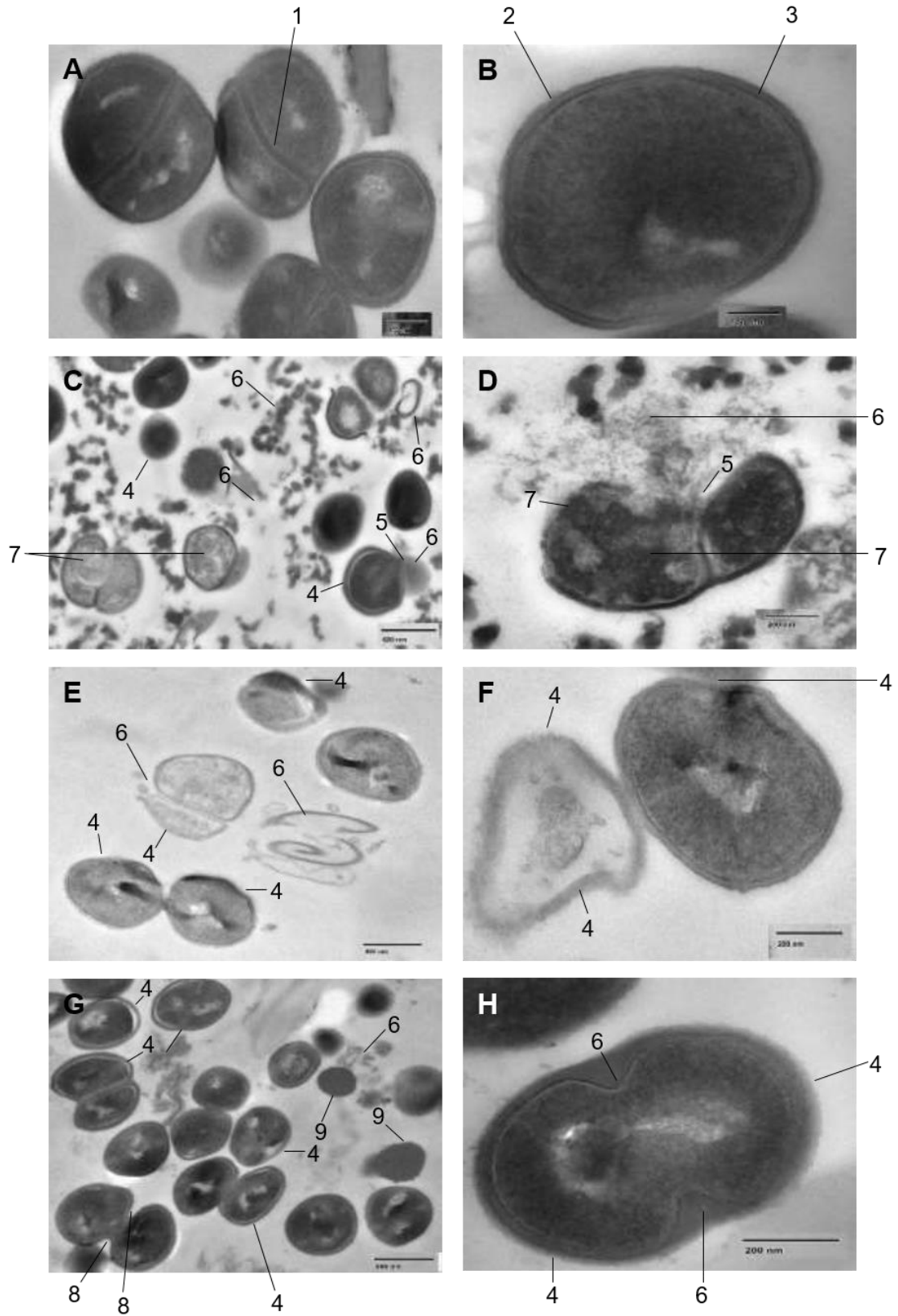
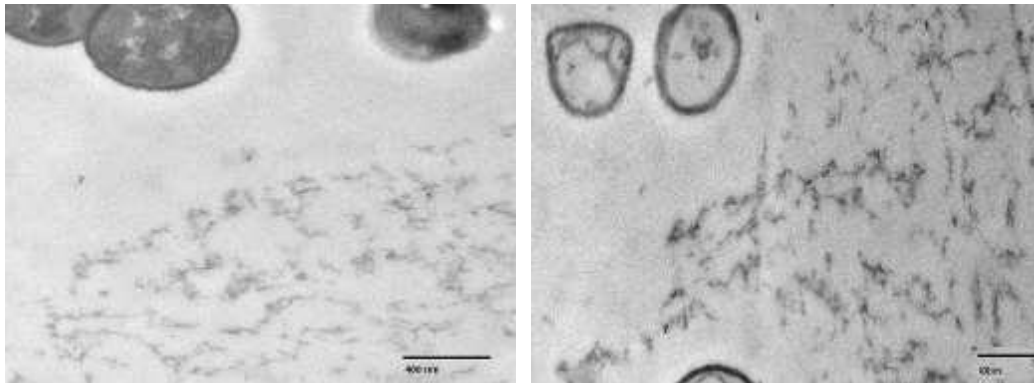


FIGURA 7

A



B

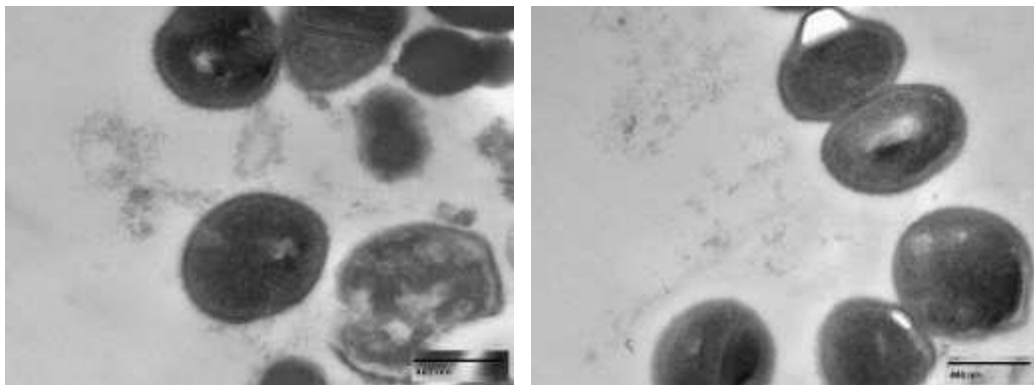


FIGURA 8

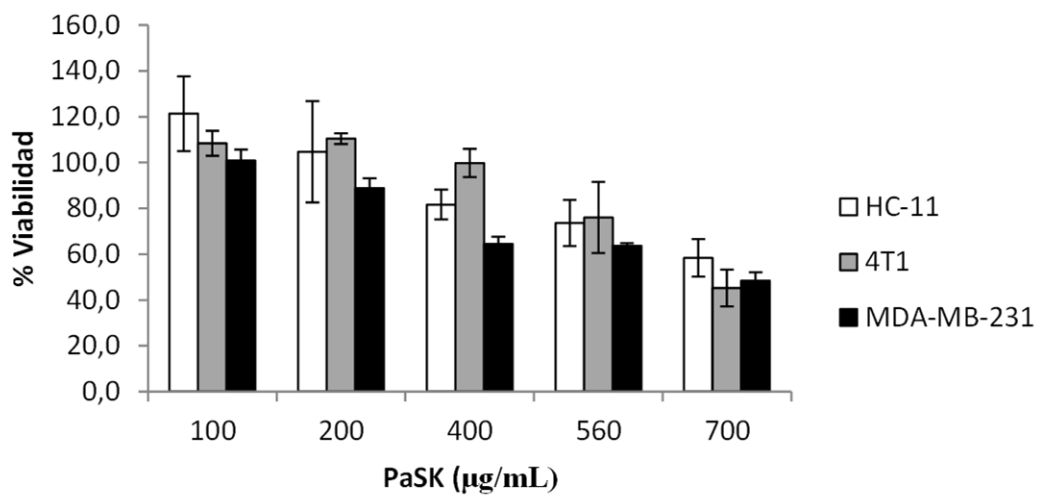


FIGURA 9

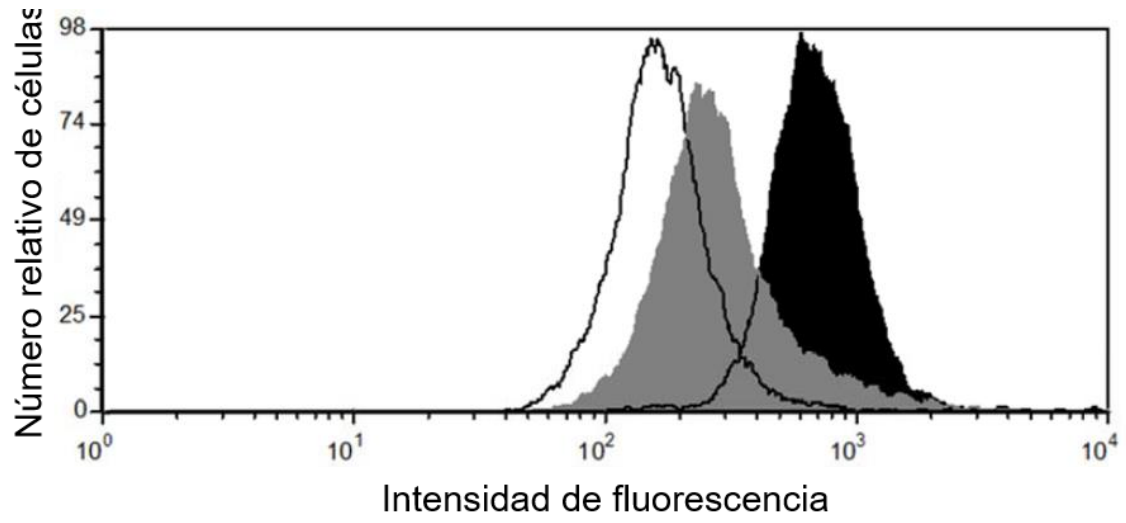
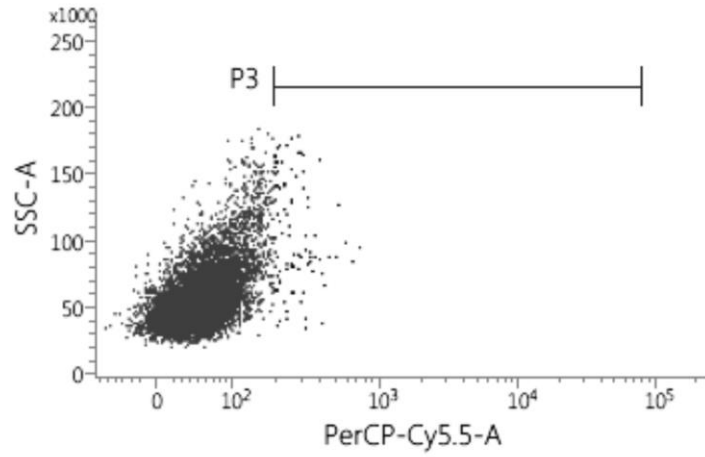
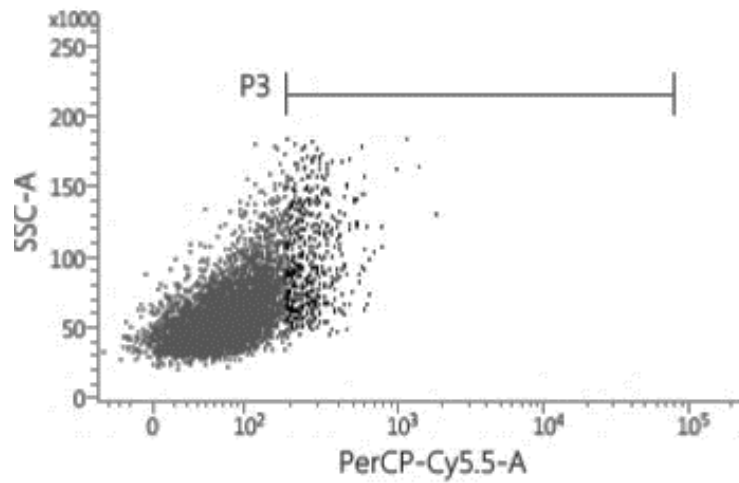


FIGURA 10

A



B



C

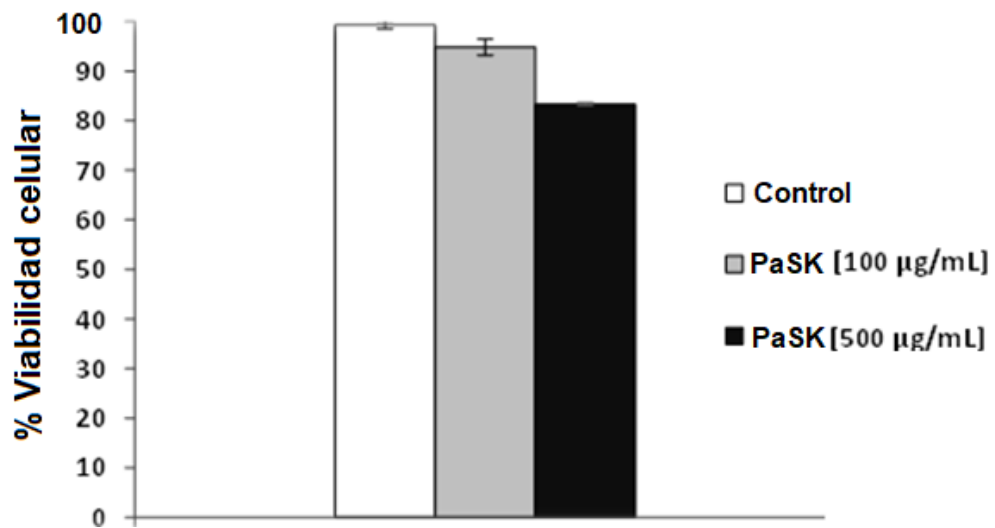
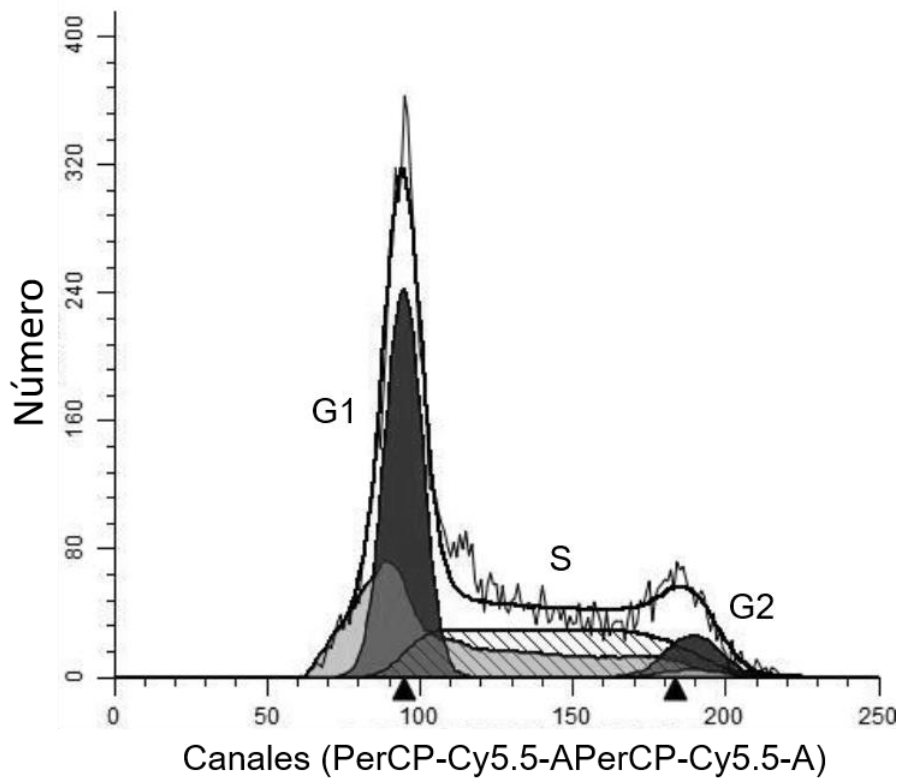


FIGURA 11

A



B

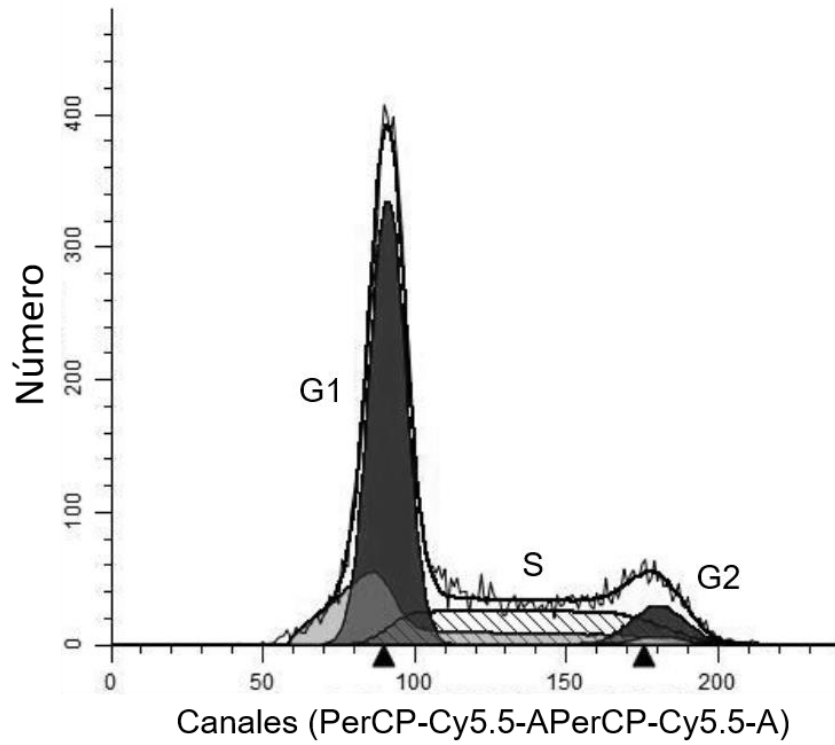


FIGURA 11 (Cont.)

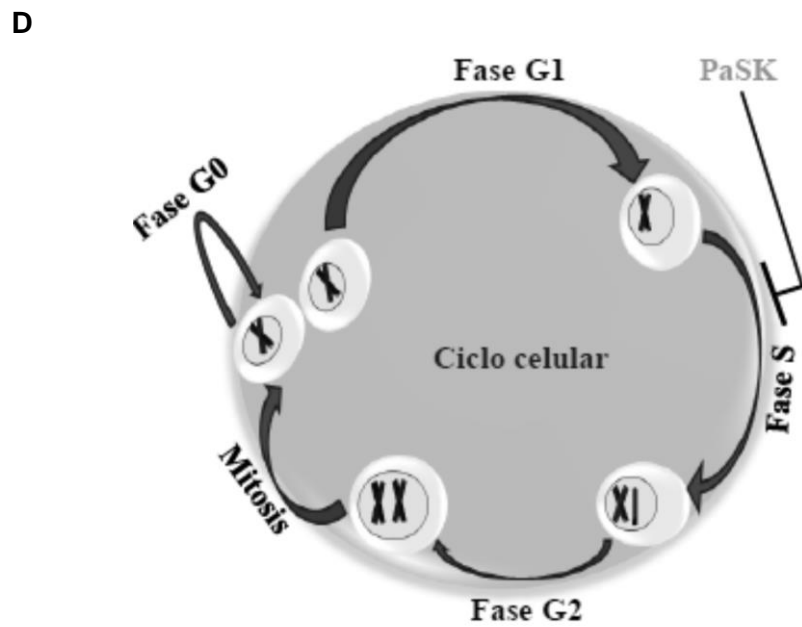
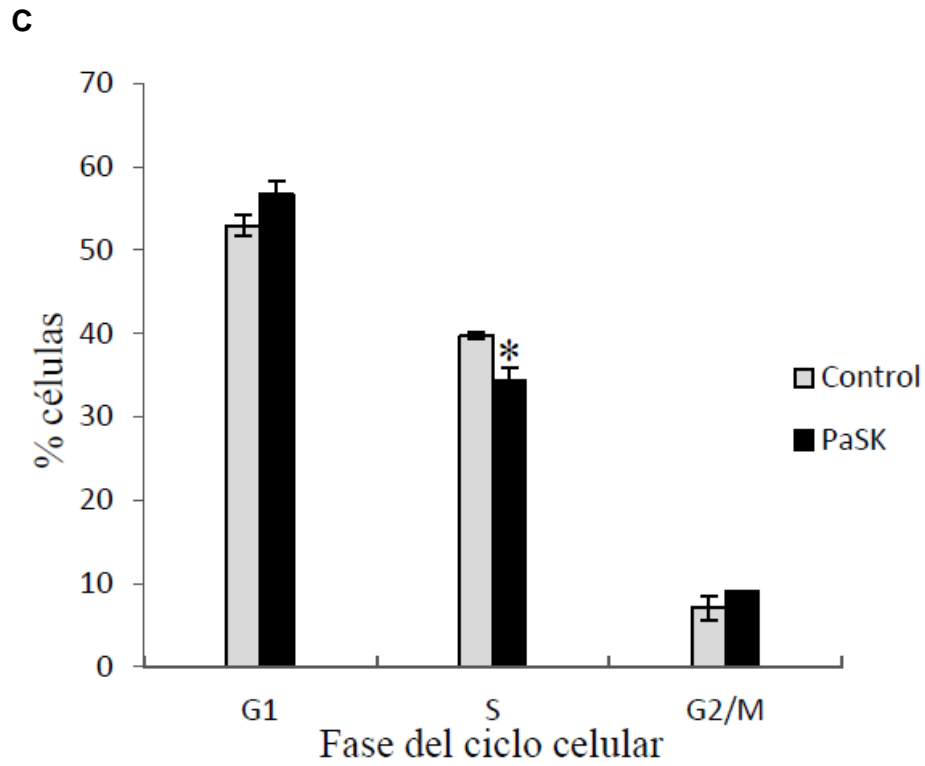


FIGURA 12

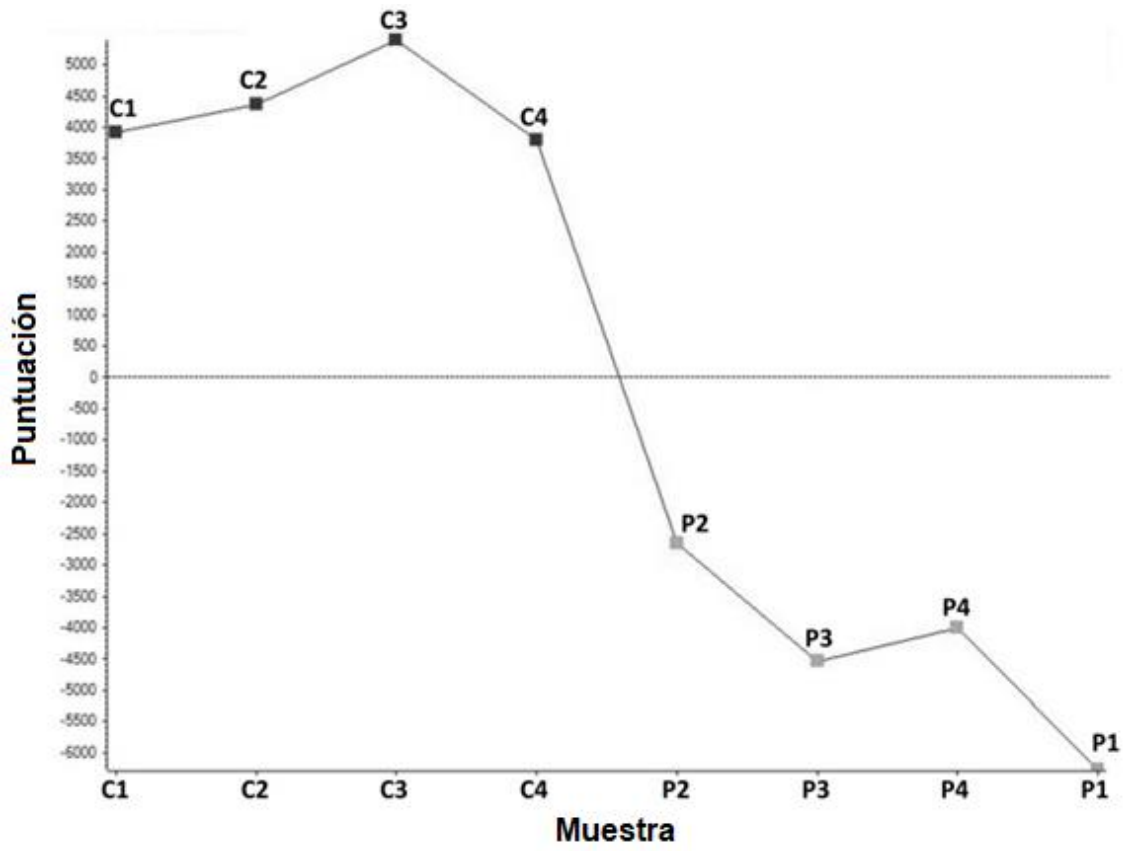
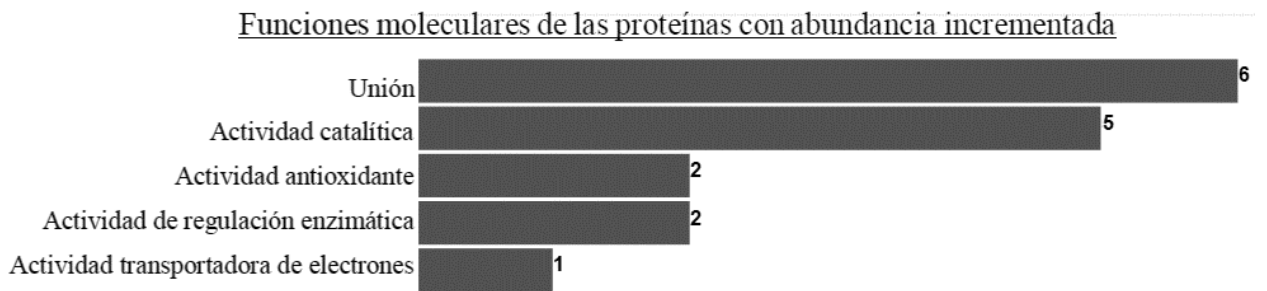


FIGURA 13

A



B

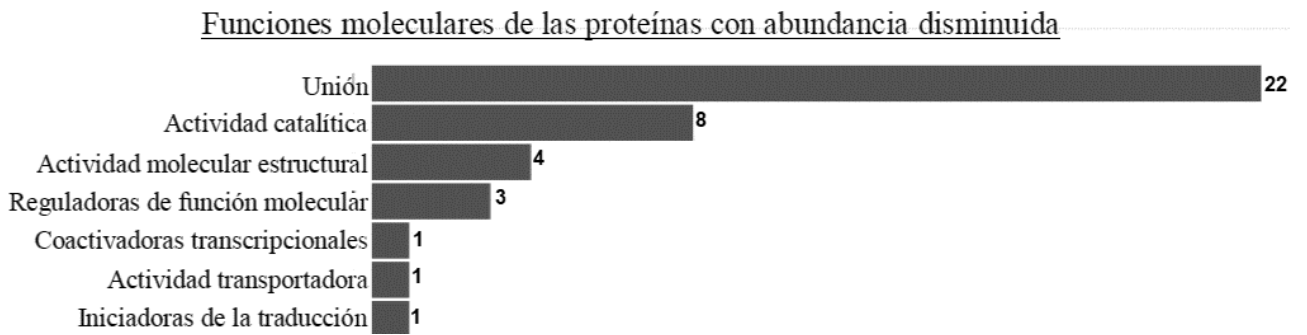


FIGURA 14

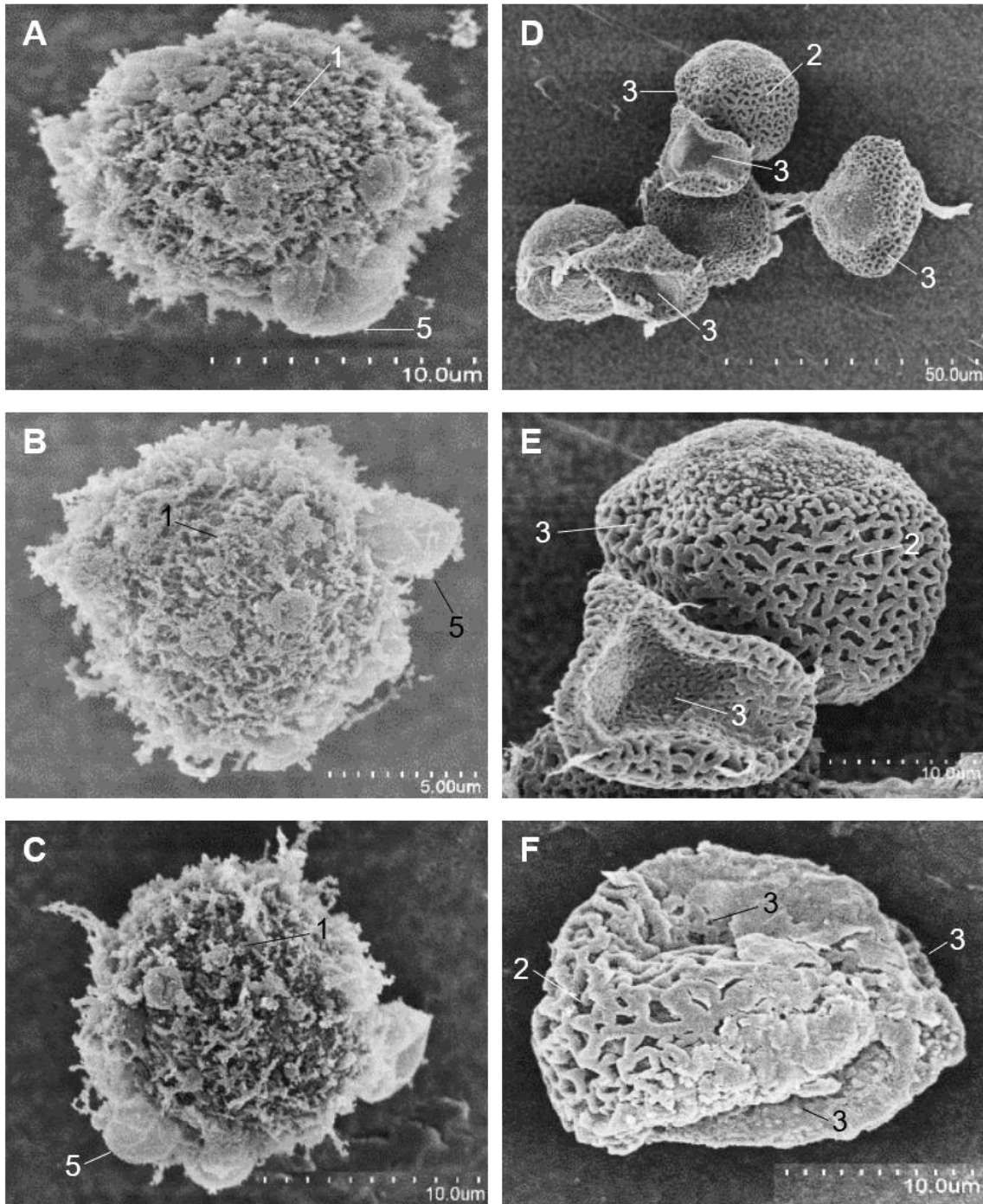
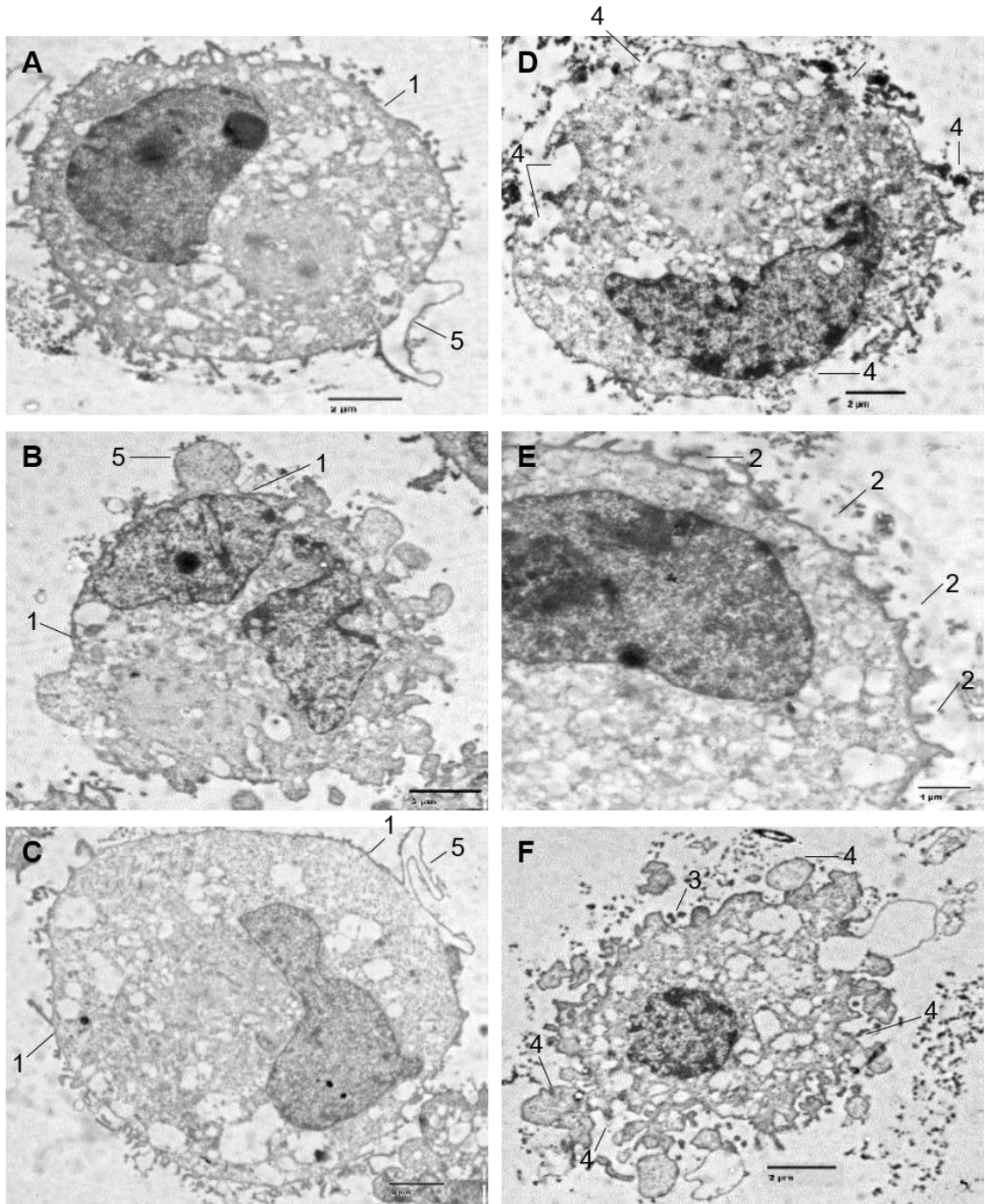


FIGURA 15





- ②① N.º solicitud: 201731455
②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.12.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	TONK M. et al. <i>Tribolium castaneum</i> defensins are primarily active against Gram-positive bacteria. Journal of Invertebrate Pathology, 02/11/2015, Vol. 132, Páginas 208-215 (todo el documento)	1-12, 15-22
A	RAJAMUTHIAH R. et al. A Defensin from the Model Beetle <i>Tribolium castaneum</i> Acts Synergistically with Telavancin and Daptomycin against Multidrug Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> . PLoS ONE, 10/06/2015, Vol. 10, Nº 6, Páginas 1-14 (todo el documento)	1-12, 15-22
A	CONTRERAS E. et al. <i>Tribolium castaneum</i> immune defense genes are differentially expressed in response to <i>Bacillus thuringiensis</i> toxins sharing common receptor molecules and exhibiting disparate toxicity. Developmental and Comparative Immunology, 12/02/2015, Vol. 50, Páginas 139-145 (todo el documento)	1-12, 15-22
A	IWASAKI T. et al. Selective cancer cell cytotoxicity of enantiomeric 9-mer peptides derived from beetle defensins depends on negatively charged phosphatidylserine on the cell surface. Peptides, 30/12/2008, Vol. 30, Páginas 660-668 (todo el documento)	1-12, 15-22
A	FIGUEIRA T. N. et al. Challenging metastatic breast cancer with the natural defensin PvD ₁ . Nanoscale, 10/2017, Vol. 9, Nº 43, Páginas 16887-16899 (todo el documento)	1-12, 15-22

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
01.10.2018

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K14/435 (2006.01)

A61K38/17 (2006.01)

A61P31/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS, EBI, REGISTRY