



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 867**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01) **C07K 7/08** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01) **C12P 21/02** (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) **A23B 4/20** (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02792890 .2**

96 Fecha de presentación : **04.12.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1453855**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.09.2004**

54 Título: **Péptidos de bolisina antimicrobianos.**

30 Prioridad: **07.12.2001 EP 01129094**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.05.2009

73 Titular/es: **IPF Pharmaceuticals GmbH**
Feodor-Lynen-Str. 31
30625 Hannover, DE

72 Inventor/es: **Liepke, Cornelia;**
Baxmann, Susann y
Adermann, Knut

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 320 867 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 320 867 T3

DESCRIPCIÓN

Péptidos de bolisina antimicrobianos.

5 La invención se refiere a péptidos con actividad antimicrobiana de alta eficacia, a un procedimiento para su preparación, así como a su uso.

Se sabe que los péptidos presentes en la naturaleza pueden tener un efecto antibiótico. Así, por ejemplo, el documento WO 97/35877 describe la presencia y la purificación de péptidos antibióticos a partir de leche de vaca, y el documento PCT/EP 01/06518, la obtención de péptidos antimicrobianos a partir de extracto de placenta humana y de extracto de timo bovino, así como su uso.

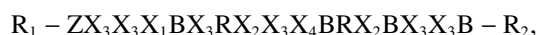
Uno de los péptidos purificados a partir de extracto de timo bovino es la bolisina (documento PCT/EP 01/06518, Sec. ID. n° 5). La bolisina es un fragmento de 17 aminoácidos del proteolípido mitocondrial bovino e inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos en medios de cultivo pobres en sal.

El documento DE 4444753 A1 da a conocer un procedimiento para la producción de un preparado peptídico con efecto antibiótico a partir de leche de vaca. Estos péptidos se pueden obtener bien mediante un tratamiento selectivo de leche certificada o bien por síntesis química de péptidos.

El documento WO 97/35877 da a conocer asimismo péptidos con la secuencia de aminoácidos $H_2N-X_1-R-X_3-X_2-COOH$, en la que X_1 es cero o X_1 y/o X_2 son restos con al menos cinco aminoácidos.

La invención se propone el objetivo de proporcionar péptidos basados en la bolisina que presenten una actividad específica especialmente alta en diferentes condiciones. También es objetivo de la invención proporcionar péptidos que inhiban el crecimiento de microorganismos en ambientes con una concentración salina fisiológica y presenten al mismo tiempo una actividad hemolítica lo más baja posible.

El objetivo se alcanza sorprendentemente proporcionando péptidos con la secuencia



en la que son

R_1 un grupo amino (NH_2), un aminoácido o un péptido con hasta 10 aminoácidos y R_2 $COOH$, $CONH_2$, un aminoácido o un péptido con hasta 10 aminoácidos;

Z un aminoácido aromático (W , Y , F), preferentemente tirosina (Y) o un aminoácido halogenado una o varias veces en el anillo aromático, preferentemente tirosina (Y);

X_1 arginina (R) o un aminoácido aromático (W , Y , F), preferentemente triptófano (W) o un aminoácido halogenado una o varias veces en el anillo aromático, preferentemente triptófano;

X_2 serina (S), un aminoácido básico (R , K), preferentemente arginina (R), o un aminoácido aromático (W , Y , F), preferentemente triptófano (W) o un aminoácido halogenado una o varias veces en el anillo aromático, preferentemente triptófano;

X_3 treonina (T), un aminoácido hidrófobo (I , V , A , L) o arginina (R);

X_4 ácido aspártico (D), prolina (P), un aminoácido básico (K , R), preferentemente arginina (R), o un aminoácido aromático (W , Y , F), preferentemente triptófano (W) o un aminoácido halogenado una o varias veces en el anillo aromático, preferentemente triptófano, y

B un aminoácido básico (K , R).

El objeto de la invención son también derivados y/o fragmentos de los péptidos de acuerdo con la invención con actividad antimicrobiana, en especial los derivados y/o fragmentos amidados, acilados, acetilados, alquilados, sulfatados, fosforilados, halogenados, en especial halogenados en las cadenas laterales aromáticas de aminoácidos, glucosilados, oxidados, modificados por esterificación o formación de lactona y/o ciclados. Los péptidos halogenados preferentemente están halogenados en restos aromáticos de las cadenas laterales de aminoácidos. Los aminoácidos se designan mediante el código de una sola letra.

Los péptidos no comprenden la secuencia de aminoácidos $R_3-YIVYKIRSADKRSKALK-R_4$, en la que R_3 representa un grupo amino (NH_2), un aminoácido o un péptido con hasta 50 aminoácidos y R_4 $COOH$, $CONH_2$, un aminoácido o un péptido con hasta 50 aminoácidos, así como tampoco los derivados amidados, acetilados, sulfatados, fosforilados, glucosilados, oxidados ni los fragmentos con propiedades antimicrobianas derivados de la secuencia de aminoácidos, en particular los fragmentos obtenidos por sustitución conservadora o delección de aminoácidos.

ES 2 320 867 T3

Los péptidos de acuerdo con la invención presentan preferentemente las secuencias

R₁-ZIX₃X₁BX₃RX₂ADBRX₂BALB-R₂ (secuencia ID n°: 2, 4, 8, 12, 13, 15)

5 R₁-ZIX₃X₁BX₃RX₂APBRX₂BALB-R₂ (secuencia ID n°: 11)

R₁-ZIX₃X₁BX₃RX₂ABBRX₂BALB-R₂ (secuencia ID n°: 1, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 18, 21-24, 28, 29, 31, 32, 35, 38, 41, 45, 47, 48, 51)

10 R₁-ZIX₃X₁BX₃RX₂AZBRX₂BALB-R₂ (secuencia ID n°: 14, 16, 17, 19, 20, 25-27, 30, 33, 34, 36, 37, 42-44, 46, 49, 50, 52, 53, 54)

R₁-ZIX₃X₁BX₃RX₂TZBRX₂BALB-R₂ (secuencia ID n°: 55),

15 en las que X₃ es un aminoácido hidrófobo (I, V) o arginina (R) y R₁, R₂, Z, X₁, X₂ y B presentan los significados antes expuestos. En la tabla 1 se exponen los péptidos preferidos de la invención. También son objeto de la invención sus derivados y/o fragmentos con actividad antimicrobiana, en especial los derivados y/o fragmentos amidados, acilados, acetilados, alquilados, sulfatados, fosforilados, halogenados, glucosilados, oxidados, modificados por esterificación o formación de lactona y/o ciclados.

20

La invención comprende los péptidos modificados por esterificación o formación de lactona, así como los péptidos de acuerdo con la invención que se hacen reaccionar en un grupo amino libre con polioxialquilenglicol activado o con un conjugado de un polioxialquilenglicol y, por ejemplo, un ácido graso. Se prefieren ácidos grasos con una longitud de cadena de 12 a 18 átomos de carbono y polioxietileno con una longitud de cadena de 2 a 100 como polioxialquilenglicol. Asimismo se prefieren ésteres de polisorbato activados y sus derivados. Los conjugados peptídicos se preparan para mejorar las propiedades farmacológicas de los péptidos.

25

Además de los derivados mencionados, los péptidos también pueden presentar en lugar de los L-aminoácidos naturales los D-aminoácidos correspondientes, así como imino-aminoácidos y aminoácidos raros, tales como hidroxilisina, homoserina y ornitina. La invención comprende asimismo los péptidos retro, inversos y retro-inversos. Con péptidos retro se designan los péptidos de acuerdo con la invención con una secuencia de aminoácidos inversa, los péptidos inversos representan los péptidos de acuerdo con la invención que se componen de D-aminoácidos y los péptidos retro-inversos son aquellos péptidos que presentan una secuencia de aminoácidos inversa formada por D-aminoácidos.

35

También son objeto de la invención péptidos miméticos de los péptidos de acuerdo con la invención. Éstos se caracterizan por la modificación de uno o varios enlaces peptídicos, por ejemplo por un enlace peptídico inverso o un enlace éster.

40

En el caso de los análogos de bolisina de acuerdo con la invención se trata de péptidos catiónicos con un efecto antibiótico. Los análogos de bolisina contienen al menos 9 y como máximo 37 restos de aminoácido, preferentemente no más de 20 restos de aminoácido.

45

Los análogos peptídicos de bolisina de acuerdo con la invención presentan una actividad antimicrobiana claramente aumentada. Los péptidos descritos en esta invención inhiben eficazmente el crecimiento de los gérmenes patógenos también en medios de cultivo que presentan una concentración salina fisiológica, por lo que, al contrario que la bolisina presente en la naturaleza, pueden aprovecharse para numerosas aplicaciones. También los gérmenes patógenos para los seres humanos con resistencia a antibióticos se destruyen ya a concentraciones bajas de los péptidos.

50

Como fragmentos se consideran en especial péptidos acortados por el extremo N- o C-terminal, pero también péptidos en los que se han delecionado aminoácidos aislados, preferentemente no más del 10% de los aminoácidos. Estos fragmentos son objeto de la invención siempre que presenten propiedades antimicrobianas. "Propiedades antimicrobianas del fragmento" significa que el fragmento presenta al menos un 50% de la actividad del péptido original, es decir, que requiere como máximo una doble concentración inhibidora. Como organismos de ensayo se usan o bien *Staphylococcus aureus* o bien *Escherichia coli*, dependiendo de cuál sea el microorganismo frente al que el péptido presenta una mayor actividad. Los microorganismos se caracterizan como sigue:

55

Staphylococcus aureus: cocos Gram positivos, ATCC 25923

60

Escherichia coli: bacilos Gram negativos, ATCC 25922

La invención comprende también ácidos nucleicos que codifican los péptidos de acuerdo con la invención y vectores y plásmidos que contienen tales ácidos nucleicos.

65

El objeto de la invención es también un medicamento que contiene uno o varios péptidos de acuerdo con la invención.

ES 2 320 867 T3

Los péptidos de acuerdo con la invención son adecuados para el tratamiento de afecciones asociadas a colonizaciones microbianas inapropiadas, tales como infecciones, inflamaciones, tumores inducidos por microorganismos, afecciones degenerativas asociadas a microorganismos, diarreas, cólicos, alteraciones de la flora bucal, intestinal y vaginal, caries, sepsis, estados de choque tóxico. La colonización microbiana inapropiada puede deberse, por ejemplo, a bacterias, hongos, levaduras, protistas, virus, micoplasmas, filarias y/o plasmodios. Se pueden usar en el caso de afecciones tanto agudas como crónicas en seres humanos y animales.

Los péptidos de acuerdo con la invención se usan preferentemente en preparaciones farmacéuticas. La preparación farmacéutica contiene uno o varios de los péptidos de acuerdo con la invención, o una sal fisiológicamente tolerable de los péptidos. Las preparaciones farmacéuticas pueden contener coadyuvantes farmacéuticamente habituales que, por ejemplo, contribuyen a la solubilidad, estabilidad o esterilidad del medicamento o aumentan el grado de eficacia de la absorción en el cuerpo. Asimismo pueden estar contenidas sustancias antibióticas adicionales, por ejemplo del grupo de las penicilinas, cefalosporinas, carbacefems, cefamicinas, carbapenems, quinolonas, tetraciclinas, aminoglucósidos, macrólidos, glucopéptidos, cloranfenicoles, gliciliclinas, licosamidas, fluoroquinolonas y antibióticos peptídicos.

La forma y composición del medicamento que contiene los péptidos se rige por la vía de administración. Preferentemente se usan preparaciones galénicas y se eligen formas de administración en las que los péptidos llegan al lugar de acción sin ser degradados. Los péptidos se pueden administrar por vía enteral, parenteral, intranasal, oral y por inhalación. Los péptidos se confeccionan preferentemente en un preparado para inyección, bien en forma de solución o bien en forma de liofilizado para la disolución inmediatamente antes del uso. Por ejemplo, los péptidos se pueden inyectar por vía intravenosa, inyectar o implantar por vía intraperitoneal, inyectar o implantar por vía subcutánea, inyectar por vía intradérmica, inyectar o implantar por vía intramuscular, inyectar por vía intratecálica, inhalar (aerosol, nebulización) o administrar tópicamente (por ejemplo cremas, pomadas, colirios, gotas óticas, champús). Los análogos de bolisina se pueden administrar localmente en forma de inyección, gotas, aerosoles, comprimidos, supositorios, cremas, pomadas, geles, etc. Existe la posibilidad de administrarlos en forma de bolo o varias veces a lo largo de un periodo de tiempo.

La dosis que se ha de administrar de los péptidos depende de la indicación y del uso de derivados determinados. Preferentemente, los péptidos de acuerdo con la invención se usan en cantidades de 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal.

El objeto de la invención es también un agente de diagnóstico que contiene los péptidos o ácidos nucleicos de acuerdo con la invención.

Los péptidos de acuerdo con la invención también se pueden usar como aditivos para alimentos. Se pueden usar como coadyuvantes en la producción de alimentos, en especial en alimentos que se producen por fermentación y otros procesos bacterianos. En el caso de los preparados de acuerdo con la patente se trata de conservantes naturales. Otras posibilidades de aplicación de los péptidos de acuerdo con la invención residen en el uso como desinfectantes para todas las situaciones en las que no se deseen microorganismos. Son ejemplos el uso para la desinfección de superficies o como recubrimiento de productos médicos, filtros de aire y artículos accesorios como, por ejemplo, ropa y bisutería. Por productos médicos se entienden todos los coadyuvantes médicos que se usan en el paciente, como, por ejemplo, implantes, prótesis, prótesis endovasculares, tubos, cánulas, catéteres, sistemas vasculares sintéticos, válvulas cardíacas artificiales y agujas. Por productos médicos se entienden asimismo recipientes para el almacenamiento de sangre o de componentes sanguíneos, así como recipientes para el transporte de órganos, etc. También es posible el uso en el tratamiento del agua o como componente de champús y jabones, como aditivos para alimentos, conservantes cosméticos, aditivos para la conservación de medios de cultivo celular, etc. y como agentes fitosanitarios.

Ejemplos de realización

Síntesis química de los análogos de bolisina

La síntesis peptídica de los análogos de bolisina se basa en el procedimiento convencional de la estrategia Fmoc en fase sólida. Para la síntesis automatizada se usó un sintetizador ABI 433 A (Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania). De fase sólida sirvió una resina Fmoc-Lys(boc)-Wang. Durante la síntesis peptídica se controlaron los pasos de acoplamiento individuales para asegurarse de que cada aminoácido se incorporaba con un alto rendimiento. Los péptidos se disociaron de la resina mediante 94% de ácido trifluoroacético (TFA), 3% de etanoditilo y 3% de agua y a continuación se purificaron por cromatografía.

Para la purificación cromatográfica se usó la HPLC de fase inversa (RP). De fase sólida sirvió una columna RP C18 preparativa (PrepPak 500 C18, 47x300 mm), de eluyente acetonitrilo (disolvente A: TFA al 0,07% en agua; disolvente B: acetonitrilo al 80%/TFA al 0,07% en agua). Los péptidos se eluyeron de la fase sólida mediante el procedimiento de gradiente (aumento de 0,5% de disolvente B/min en el eluyente) a una velocidad de flujo de 40 ml/min y se detectaron a una longitud de onda de 215 nm.

Los péptidos sintéticos se analizaron por espectrometría de masas. La pureza de los péptidos se controló mediante electroforesis capilar de zona y HPLC de fase inversa analítica (pureza $\geq 95\%$). La secuencia de aminoácidos de los péptidos se comprobó mediante la degradación automatizada de Edman.

ES 2 320 867 T3

En la tabla 1 se indican las secuencias de aminoácidos de los análogos de bolisina sintetizados de acuerdo con la invención usando el código de una letra.

TABLA 1

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Nombre	Sec. ID nº	Secuencia
BOL-6	1	YIVYKIRSARKRSKALK
BOL-7	2	YIVYKIRSADKRRKALK
BOL-11	3	YIVYKRRSARKRSKALK
BOL-12	4	YIVYKRRSADKRRKALK
BOL-13	5	YIVYKIRSARKRRKALK
BOL-14	6	YIRYKIRSARKRRKALK
BOL-15	7	YIVYKRRSARKRRKALK
BOL-16	8	YIRYKRRSADKRRKALK
BOL-17	9	YIRYKIRSARKRRKALK
BOL-18	10	YIRYKRRSARKRRKALK
BOL-21	11	YIVYKIRSAPKRSKALK
BOL-25	12	YIVWKIRSADKRSKALK
BOL-27	13	YIVYKIRWADKRSKALK
BOL-29	14	YIVYKIRSAWKRSKALK
BOL-30	15	YIVYKIRSADKRWKALK
BOL-44	16	YIVYKIRSAWKRRKALK
BOL-45	17	YIVYKIRSAWKRWKALK
BOL-46	18	YIVYKIRSARKRWKALK
BOL-47	19	YIVYKIRWAWKRSKALK
BOL-48	20	YIVYKIRWAWKRRKALK
BOL-49	21	YIVYKIRWARKRSKALK
BOL-50	22	YIVYKIRWARKRRKALK
Box-51	23	YIVYKIRWARKRWKALK
BOL-52	24	YIVYKIRRARKRRKALK
BOL-53	25	YIVYKIRRAWKRSKALK
BOL-54	26	YIVYKIRRAWKRRKALK
BOL-55	27	YIVYKIRRAWKRWKALK
BOL-56	28	YIVYKIRSAKKRKKALK
BOL-57	29	YIVYKIRSAKKRWKALK
BOL-58	30	YIVYKIRSAWKRKKALK
BOL-59	31	YIVYKIRWAKKRRKKALK
Bo-60	32	YIVYKIRWAKKRWKALK
BOL-61	33	YIVYKIRWAWKRRKKALK
BOL-67	34	YIVYKIRSAWKRWKAL

ES 2 320 867 T3

TABLA 1 (continuación)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Nombre	Sec. ID nº	Secuencia
BOL-68	35	YIVYKIRSARKRWKAL
BOL-69	36	YIVYKIRSAWKRRK
BOL-70	37	YIVYKIRSAWKRWK
BOL-71	38	YIVYKIRSARKRWK
BOL-72	39	YIVYKIRWARKRRKAL
BOL-73	40	YIVYKIRWARKRRK
BOL-74	41	YIVWKIRSARKRRKALK
BOL-75	42	YIVWKIRSAWKRSKALK
BOL-79	43	YIVRKIRSAWKRWKALK
BOL-80	44	YIVRKIRSAWKRRKALK
BOL-81	45	YIVWKIRSARKRWKALK
BOL-82	46	YIVWKIRSAWKRWKALK
BOL-83	47	YWRKIRSARKRRKALK
BOL-84	48	KYIVYKIRSARKRRKALK
BOL-85	49	KYIVYKIRSAWKRSKALK
BOL-86	50	KYIVYKIRSAWKRRKALK
BOL-87	51	KYIVYKIRWARKRRKALK
BOL-91	52	YIVYKIRFAFKRSKAL
BOL-92	53	YIVYKIRFAFKRRKAL
BOL-93	54	YIVYKIRWAWKRSKAL
BOL-97	55	YIVYKIRWTWKRKSKAL
BOL-103	56	KLAKRRKWAWRIKYVIY

Estudio de la actividad antimicrobiana de los análogos de bolisina

55

Se estudió la adecuación de los análogos de bolisina de la presente invención como agentes terapéuticos antibióticos con la ayuda de diferentes ensayos biológicos. Para ello se estudió la actividad antimicrobiana de los péptidos sintetizados químicamente frente a tres cepas bacterianas Gram positivas y tres Gram negativas, así como frente a una levadura.

60

Se usaron los siguientes microorganismos:

Gram positivos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
 Enterococcus faecalis ATCC 51299 (resistente a
 vancomicina)

65

ES 2 320 867 T3

Streptococcus pneumoniae DSM 11865 (resistente a penicilina)

Gram negativos:	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031
Levadura:	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231

La actividad antibiótica de los análogos de bolisina se estudió con la ayuda de la determinación de la concentración mínima inhibidora. La concentración mínima inhibidora de un análogo designa la concentración peptídica más baja necesaria para inhibir completamente el crecimiento de microorganismos después de un tiempo de incubación de 18 ± 2 h. Este procedimiento permite realizar una afirmación cuantitativa acerca de la potencia antimicrobiana de los péptidos. Estos estudios se llevaron a cabo conforme a las recomendaciones (M7-A3) publicadas por el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, Comité Nacional para Normas de Laboratorios Clínicos) usando el ensayo de dilución en medio líquido, en el que se usaron los péptidos sintetizados químicamente (secuencias peptídicas de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3). Salvo que se indique lo contrario, se usó como medio de ensayo el caldo Mueller Hinton según las recomendaciones del NCCLS. La tabla 2 muestra la actividad antimicrobiana de los análogos peptídicos claramente mejorada en comparación con el péptido original bolisina. Las concentraciones mínimas inhibidoras se indican en [$\mu\text{g/ml}$].

TABLA 2

Microorganismos	1	2	3	4	5	6	7
Bolisina*	>300	>300	>300	>300	>300	>300	nd
Bolisina	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
Bolisina**	25	300	300	6,25	150	150	nd
BOL-6*	37,5	200	150	37,5	(9,375)	37,5	nd
BOL-7*	75	>300	>300	150	(75)	300	nd
BOL-11*	37,5	>300	>300	37,5	(150)	150	nd
BOL-12*	18,75	>300	>300	18,75	(300)	200	nd
BOL-13*	18,75	75	150	18,75	(9,375)	18,75	nd
BOL-14*	50	>300	>300	37,5	(150)	75	nd
BOL-15*	18,75	>300	>300	18,75	(150)	75	nd

ES 2 320 867 T3

5	BOL-16*	100	>300	>300	75	(300)	150	nd
	BOL-17*	37,5	200	300	37,5	200	9,375	nd
	BOL-18*	18,75	>300	>300	18,75	300	37,5	nd
	BOL-21*	75	>300	>300	150	(150)	200	nd
10	BOL-25*	150	>300	>300	150	(150)	200	nd
	BOL-27*	75	300	300	75	(150)	150	nd
	BOL-29*	9,375	75	150	9,375	(18,75)	50	nd
15	BOL-30*	100	>300	>300	150	(300)	300	nd
	BOL-44	150	>300	200	200	(75)	75	37,5
	BOL-45	18,75	100	100	12,5	(25)	4,7	18,75
20	BOL-46	300	200	200	200	(100)	150	150
	BOL-47	18,75	25	18,75	18,75	(25)	9,375	18,75
	BOL-48	9,375	12,5	9,375	18,75	200 (6,5)	4,7	9,375
25	BOL-49	75	25	18,75	50	(12,5)	18,75	18,75
	BOL-50	37,5	25	18,75	50	(6,25)	9,375	9,375
30	BOL-51	37,5	25	12,5	50	300 (25)	18,75	(18,75)
	BOL-52	300	200	200	>300	(37,5)	75	(37,5)
	BOL-53	150	200	200	200	(75)	100	(37,5)
35	BOL-54	200	100	75	100	(25)	18,75	18,75
	BOL-55	12,5	50	37,5	12,5	(9,375)	3,125	9,375
	BOL-56	>300	>300	>300	>300	(200)	300	(300)
40	BOL-57	>300	>300	>300	>300	(200)	300	300
	BOL-58	>300	>300	300	>300	(100)	100	(75)
	BOL-59	50	50	50	150	(18,75)	18,75	(9,375)
45	BOL-60	50	25	50	100	(18,75)	18,75	(18,75)
	BOL-61	37,5	25	25	25	300 (75)	18,75	9,375
50	BOL-67	25	100	100	25	(50)	37,5	18,75
	BOL-68	200	200	300	200	(200)	300	200
	BOL-69	300	150	200	150	(200)	300	37,5
55	BOL-70	100	150	150	100	(100)	75	37,5
	BOL-71	200	200	300	300	(200)	300	300
	BOL-72	75	25	18,75	100	(12,5)	18,75	18,75
60	BOL-73	37,5	25	18,75	50	(9,375)	18,75	9,375
	BOL-74	300	150	150	300	(12,5)	18,75	75

65

ES 2 320 867 T3

	BOL-75	150	200	150	75	(37,5)	75	37,5
5	BOL-79	9,375	>300	300	3,125	(4,7)	2,35	4,7
	BOL-80	>300	>300	>300	>300	(18,75)	150	37,5
	BOL-81	300	150	75	300	(18,75)	25	75
10	BOL-82	18,75	75	37,5	18,75	(9,375)	12,5	9,375
	BOL-83	>300	>300	>300	>300	>300	>300	300
	BOL-84	>300	>300	300	>300	(75)	75	37,5
15	BOL-85	>300	300	300	>300	(37,5)	150	75
	BOL-86	75	200	150	150	(18,75)	50	18,75
	BOL-87	9,375	37,5	9,375	18,75	(9,375)	9,375	9,375
20	BOL-91	25	37,5	37,5	25	(150)	18,75	nd
	BOL-92	18,75	18,75	25	18,75	(37,5)	12,5	nd
	BOL-93	25	37,5	25	25	(37,5)	25	nd
25	BOL-97	12,5	18,75	18,75	18,75	(37,5)	18,75	nd
	BOL-103	18,75	37,5	37,5	18,75	(9,4)	18,75	nd
30	*Medio de ensayo: caldo Mueller Hinton semiconcentrado							
	**Medio de ensayo: 3 g/l de caldo de soja tripsinizado (medio de iones débiles)							

Los valores entre paréntesis designan una inhibición del 75% del crecimiento de los microorganismos a la concentración peptídica indicada. En este caso no se pudo alcanzar una inhibición completa del crecimiento. Para la determinación de la concentración mínima inhibidora se usaron los siguientes microorganismos:

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
2. *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (resistente a vancomicina).
3. *Streptococcus pneumoniae* DSM 11865 (resistente a penicilina).
4. *Escherichia coli* ATCC 25922.
5. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.
6. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031.
7. *Candida albicans* ATCC 10231.

Los péptidos de acuerdo con la invención inhiben eficazmente el crecimiento tanto de bacterias Gram positivas y Gram negativas como de levaduras. Se destruyen eficazmente los gérmenes patógenos para los seres humanos, tales como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. De especial importancia es la inhibición muy eficaz del crecimiento de las bacterias con una resistencia a antibióticos preexistente, como, por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae* (resistente a penicilina) y *Enterococcus faecalis* (resistente a vancomicina). La potencia de acción de los análogos de bolisina es bastante mayor que la del péptido original bolisina.

Estudio de la actividad a una mayor concentración salina

También para estos estudios se determinó la concentración mínima inhibidora de los péptidos frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos (microorganismos 1 a 6). Como medio de ensayo se usó caldo tripticasa

ES 2 320 867 T3

soja (3 g/l) con una concentración fisiológica de sal (cloruro sódico 150 mM). La tabla 3 muestra la actividad antimicrobiana de los análogos peptídicos en medio salino, también claramente mejorada respecto al péptido original bolisina.

TABLA 3

Microorganismos	1	2	3	4	6
Bolisina	>300	>300	>300	>300	>300
BOL-44	200	(300)	>300	150	>300
BOL-45	37,5	200	200	75	4,7
BOL-46	>300	>300	>300	>300	>300
BOL-47	18,75	50	37,5	25	9,375
BOL-48	18,75	18,75	25	9,375	9,375 b
BOL-49	75	75	100	50	75
BOL-50	37,5	50	50	37,5	37,5
BOL-51	75	37,5	37,5	37,5	25
BOL-52	>300	>300	>300	>300	(300)
BOL-53	300	>300	>300	200	>300
BOL-54	300	300	300	200	(200)
BOL-55	18,75	150	150 b	12,5	4,7
BOL-56	>300	>300	>300	>300	>300
BOL-57	>300	>300	>300	>300	>300
BOL-58	>300	>300	>300	>300	>300
BOL-59	75	200	200	100	150
BOL-60	100	75	75	75	50
BOL-61	18,75	25	37,5	75	6,25
BOL-67	37,5	150	150	75	9,375

ES 2 320 867 T3

	BOL-68	>300	>300	>300	>300	>300
5	BOL-69	300	>300	>300	150	>300
	BOL-70	150	200	300	100	100
	BOL-71	>300	(300)	>300	>300	>300
10	BOL-72	75	50	50	75	75
	BOL-73	37,5	37,5	75 b	50	150
	BOL-74	>300	300	>300	>300	75
15	BOL-75	300	300 b	300	200	300
	BOL-79	4,7	>300	>300	4,7	<=1,56
	BOL-80	>300	>300	>300	>300	>300
20	BOL-81	(300)	200	(75)	>300	50
	BOL-82	18,75	75	75	9,375	6,25
	BOL-83	>300	>300	>300	>300	>300
25	BOL-84	>300	>300	>300	>300	300
	BOL-85	>300	>300	>300	>300	>300
30	BOL-86	(300)	>300	(300)	>300	200
	BOL-87	37,5	37,5	37,5	25	37,5

35 Los valores entre paréntesis designan una inhibición del 75% del crecimiento de los microorganismos a la concentración peptídica indicada. En este caso no se pudo alcanzar una inhibición completa del crecimiento.

40 *Estudio de la actividad citotóxica de los análogos de bolisina*

Se seleccionaron los análogos de bolisina con una buena actividad antimicrobiana frente a al menos una de las siete cepas de microorganismos ensayadas ($CMI \leq 37,5 \mu\text{g/ml}$) para comprobar su actividad citotóxica.

45 La capacidad de los péptidos antimicrobianos para adherirse a las membranas plasmáticas y para permeabilizarlas se considera en muchos casos el mecanismo de acción de estas sustancias. Resulta deseable que sean dañadas selectivamente las membranas bacterianas, debiendo permanecer inalteradas las células del huésped. Como modelo sencillo para estudiar el efecto citotóxico que ejerce un péptido sobre las células eucariotas se usa el ensayo de hemólisis, en el que se analiza la actividad lítica y, por lo tanto, tóxica de los péptidos frente a los glóbulos rojos (eritrocitos). El procedimiento para la determinación de la actividad hemolítica de los péptidos se realizó conforme a Helmerhorst y col. (Helmerhorst y col., 1999, FEBS Lett. 449: 105-110).

55 Los eritrocitos se aislaron de la sangre completa citrada de un probando sano por centrifugación ($1.500 \times g$, 20°C , 10 min) y se diluyeron 200 veces con medio de ensayo. Los péptidos se dispusieron a diferentes concentraciones en una placa de microvaloración de 96 pocillos con fondo en forma de V y se incubaron durante 1 h a 37°C con la suspensión de eritrocitos diluida. Los eritrocitos se separaron por centrifugación siguiente ($1.000 \times g$ durante 5 min). Los sobrenadantes teñidos a causa de la hemoglobina liberada se transfirieron a una placa de microvaloración de 96 pocillos con fondo plano y se determinó su absorción a una longitud de onda de $\lambda = 450 \text{ nm}$ mediante un lector de placas de microvaloración. Como valor de referencia para una hemólisis del 100% sirvió la incubación con una solución al 1% del detergente Tween-20. Como control negativo sirvieron eritrocitos incubados sólo con medio de ensayo.

60 La actividad hemolítica de los análogos de bolisina se indicó respecto a la hemólisis total con Tween-20 y se calculó según la fórmula siguiente:

$$65 \text{ Hemólisis [\%]} = \frac{A_{450 \text{ nm}} (\text{péptido}) - A_{450 \text{ nm}} (\text{control negativo})}{A_{450 \text{ nm}} (\text{Tween} - 20 \text{ 1\%}) - A_{450 \text{ nm}} (\text{control negativo})} * 100$$

ES 2 320 867 T3

Como medio de ensayo sirvió medio TSB con glucosa 287 mM. La concentración isotónica de glucosa debe prevenir la hemólisis inespecífica en el ambiente hipotónico (protección osmótica).

5 Resulta deseable que los péptidos de acuerdo con la invención sólo muestren propiedades líticas moderadas frente a eritrocitos o carezcan de ellas. Propiedades líticas moderadas significa una lisis inferior al 30% de los eritrocitos cuando se aplican concentraciones peptídicas eficaces contra microorganismos.

10 La figura 1 muestra que los análogos de bolisina no causan una hemólisis digna de mención a concentraciones eficaces contra microorganismos (< 5%). También a concentraciones elevadas (500 µg/ml) se observa sólo una actividad lítica moderada (< 30%). Como comparación se ha representado la actividad hemolítica del péptido antimicrobiano MBI-28 (GOUGH y col., 1996, Infect. Immun. 64(12): 4922-7).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

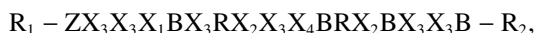
65

ES 2 320 867 T3

REIVINDICACIONES

1. Péptidos con actividad antimicrobiana con la secuencia de aminoácidos

5



en la que son

10

R_1 un grupo amino (NH_2), un aminoácido o un péptido con hasta 10 aminoácidos y R_2 $COOH$, $CONH_2$, un aminoácido o un péptido con hasta 10 aminoácidos;

Z un aminoácido aromático (W, Y, F), preferentemente tirosina (Y);

15

X_1 arginina (R) o un aminoácido aromático (W, Y, F), preferentemente triptófano (W);

X_2 serina (S), un aminoácido básico (R, K), preferentemente arginina (R), o un aminoácido aromático (W, Y, F), preferentemente triptófano (W);

20

X_3 treonina (T), un aminoácido hidrófobo (I, V, A, L) o arginina (R);

X_4 ácido aspártico (D), prolina (P), un aminoácido básico (K, R), preferentemente arginina (R), o un aminoácido aromático (W, Y, F), preferentemente triptófano (W), y

25

B un aminoácido básico (K, R),

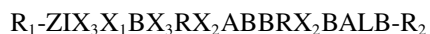
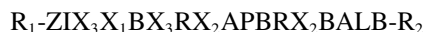
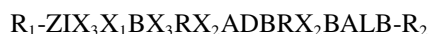
así como sus derivados y/o fragmentos con actividad antimicrobiana, en especial los derivados y/o fragmentos amidados, acilados, acetilados, alquilados, sulfatados, fosforilados, halogenados, en especial halogenados en las cadenas laterales aromáticas de aminoácidos, glucosilados, oxidados, modificados por esterificación o formación de lactona y/o ciclados, no comprendiendo los péptidos la secuencia de aminoácidos R_3 -YIVYKIRSADKRSKALK- R_4 , en la que R_3 representa un grupo amino (NH_2), un aminoácido o un péptido con hasta 50 aminoácidos y R_4 $COOH$, $CONH_2$, un aminoácido o un péptido con hasta 50 aminoácidos, así como tampoco los derivados amidados, acetilados, sulfatados, fosforilados, glucosilados, oxidados ni los fragmentos con propiedades antimicrobianas derivados de la secuencia de aminoácidos, en particular los fragmentos obtenidos por sustitución conservadora o delección de aminoácidos.

30

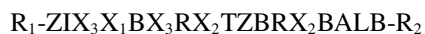
35

2. Péptidos según la reivindicación 1, con una de las secuencias

40



45



50

en las que X_3 es un aminoácido hidrófobo (I, V) o arginina (R) y R_1 , R_2 , Z, X_1 , X_2 y B presentan los significados indicados en la reivindicación 1, así como sus derivados y/o fragmentos con actividad antimicrobiana, en especial los derivados y/o fragmentos amidados, acilados, acetilados, alquilados, sulfatados, fosforilados, halogenados, en especial halogenados en las cadenas laterales aromáticas de aminoácidos, glucosilados, oxidados, modificados por esterificación o formación de lactona y/o ciclados.

55

3. Péptidos según la reivindicación 1 y/o 2, con una de las secuencias de aminoácidos

60

Sec ID nº	Secuencia
1	YIVYKIRSARKRSKALK
2	YIVYKIRSADKRRKALK
3	YIVYKRRSARKRSKALK

65

ES 2 320 867 T3

(Continuación)

	Sec ID nº	Secuencia
	4	YIVYKRRSADKRRKALK
5	5	YIVYKIRSARKRRKALK
	6	YIRYKIRSARKRRKALK
	7	YIVYKRRSARKRRKALK
	8	YIRYKRRSADKRRKALK
10	9	YIRYKIRSARKRRKALK
	10	YIRYKRRSARKRRKALK
	11	YIVYKIRSAPKRSKALK
	12	YIWWKIRSADKRSKALK
	13	YIVYKIRWADKRSKALK
15	14	YIVYKIRSAWKRSKALK
	15	YIVYKIRSADKRWKALK
	16	YIVYKIRSAWKRRKALK
	17	YIVYKIRSAWKRWKALK
20	18	YIVYKIRSARKRWKALK
	19	YIVYKIRWAWKRSKALK
	20	YIVYKIRWAWKRRKALK
	21	YIVYKIRWARKRSKALK
	22	YIVYKIRWARKRRKALK
25	23	YIVYKIRWARKRWKALK
	24	YIVYKIRRAKRRKALK
	25	YIVYKIRRAWKRSKALK
	26	YIVYKIRRAWKRRKALK
30	27	YIVYKIRRAWKRWKALK
	28	YIVYKIRSAKKRKKALK
	29	YIVYKIRSAKKRWKALK
	30	YIVYKIRSAWKRKKALK
35	31	YIVYKIRWAKKPKKALK
	32	YIVYKIRWAKRWKALK
	33	YIVYKIRWAWKRRKALK
	34	YIVYKIRSAWKRWKALK
	35	YIVYKIRSARKRWKALK
40	36	YIVYKIRSAWKRRK
	37	YIVYKIRSAWKRWK
	38	YIVYKIRSARKRWK
	39	YIVYKIRWARKRRKALK
	40	YIVYKIRWARKRRK
45	41	YIWWKIRSARKRRKALK
	42	YIWWKIRSAWKRSKALK
	43	YIVRKIRSAWKRWKALK
	44	YIVRKIRSAWKRRKALK
50	45	YIWWKIRSARKRWKALK
	46	YIWWKIRSAWKRWKALK
	47	YIVRKIRSARKRRKALK
	48	KYIVYKIRSARKRRKALK
	49	KYIVYKIRSAWKRSKALK
55	50	KYIVYKIRSAWKRRKALK
	51	KYIVYKIRWARKRRKALK
	52	YIVYKIRFAFKRSKALK
	53	YIVYKIRFAFKRRKALK
60	54	YIVYKIRWAWKRSKALK
	55	YIVYKIRWTWKRSKALK
	56	KLAKRRKWAWRIKYVIY

65 así como sus derivados y/o fragmentos con actividad antimicrobiana, en especial los derivados y/o fragmentos amidados, acilados, acetilados, alquilados, sulfatados, fosforilados, halogenados, en especial halogenados en las cadenas laterales aromáticas de aminoácidos, glucosilados, oxidados, modificados por esterificación o formación de lactona y/o ciclados.

ES 2 320 867 T3

4. Péptidos según una de las reivindicaciones 1 a 3, en los que uno o varios aminoácidos están sustituidos por los D-aminoácidos correspondientes, y péptidos retro, inversos o retro-inversos de los péptidos según una de las reivindicaciones 1 a 3.

5 5. Péptidos miméticos de los péptidos según una de las reivindicaciones 1 a 4, que se **caracterizan** por uno o varios enlaces peptídicos modificados, en especial por enlace peptídico inverso o enlace éster.

6. Conjugados de péptidos según al menos una de las reivindicaciones 1 a 5 con polímeros, preferentemente con polisorbato.

10

7. Ácidos nucleicos que codifican los péptidos según una de las reivindicaciones 1 a 4.

8. Vectores y plásmidos que contienen los ácidos nucleicos según la reivindicación 7.

15

9. Medicamento que contiene al menos uno de los péptidos según las reivindicaciones 1 a 6, ácidos nucleicos según la reivindicación 7 o vectores o plásmidos según la reivindicación 8.

10. Medicamento según la reivindicación 9, que contiene al menos un principio activo antibiótico adicional.

20

11. Medicamento según la reivindicación 10, en el que el principio activo antibiótico corresponde al grupo de las penicilinas, cefalosporinas, carbacefems, cefamicinas, carbapenems, quinolonas, tetraciclinas, aminoglucósidos, macrólidos, glucopéptidos, cloranfenicoles, gliciliclinas, licosamidas, fluoroquinolonas y antibióticos peptídicos.

25

12. Medicamento según la reivindicación 9 ó 10, que contiene al menos un principio activo antiviral, antiparasitario y/o antifúngico.

13. Medicamento según al menos una de las reivindicaciones 9 a 12 en una forma adecuada para la administración, como infusión, pomada, comprimido, aerosol o cápsula de liberación lenta.

30

14. Agente de diagnóstico que contiene al menos uno de los péptidos según las reivindicaciones 1 a 6, ácidos nucleicos según la reivindicación 7 o vectores o plásmidos según la reivindicación 8.

15. Alimento que contiene los péptidos según al menos una de las reivindicaciones 1 a 6.

35

16. Procedimiento para la inhibición del crecimiento de microorganismos, en el que los microorganismos se ponen en contacto con una cantidad eficaz contra microorganismos de uno o varios de los péptidos según las reivindicaciones 1 a 6.

40

17. Procedimiento para la preparación de los péptidos según una de las reivindicaciones 1 a 6 por expresión en microorganismos procariotas o eucariotas o por síntesis química.

45

18. Uso de los péptidos según al menos una de las reivindicaciones 1 a 6 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de afecciones causadas por microorganismos, de afecciones del organismo humano y animal, en especial con implicación del tracto gastrointestinal, de las vías respiratorias y del tracto urogenital, del integumento y sus glándulas anexas, para el tratamiento de afecciones crónicas, para el tratamiento de afecciones asociadas a colonizaciones microbianas inapropiadas causadas por bacterias, hongos, levaduras, protistas, virus, micoplasmas, filarias y/o plasmodios, de infecciones, inflamaciones, tumores inducidos por microorganismos, afecciones degenerativas asociadas a microorganismos, diarreas, cólicos, alteraciones de la flora bucal, intestinal y vaginal, sepsis y/o caries provocados por colonizaciones microbianas inapropiadas.

50

19. Uso de los péptidos según al menos una de las reivindicaciones 1 a 6 como conservante para alimentos, piensos y cosméticos, como conservante para evitar contaminaciones microbianas de medios y artículos de uso corriente para el cultivo celular, como desinfectante, para la prevención de colonizaciones microbianas de productos médicos, para la prevención de colonizaciones microbianas de artículos accesorios, en especial de ropa y bisutería, como coadyuvante en procesos de fermentación industriales, en especial en la elaboración de cerveza y en la producción de yogur.

55

60

65

Figura 1: Actividad hemolítica de los análogos de bolisina

