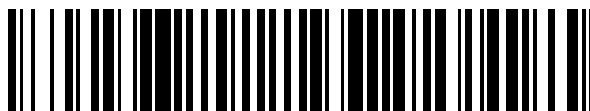


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 515**

51 Int. Cl.:

C07K 14/68 (2006.01)

A61K 38/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2009** **E 09776323 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012** **EP 2379587**

54 Título: **Análogos de melanocortina con actividad antimicrobiana**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2013

73 Titular/es:

**FONDAZIONE IRCCS "CA' GRANDA - OSPEDALE
MAGGIORE POLICLINICO" (100.0%)
Via Francesco Sforza, 28
20122 Milan, IT**

72 Inventor/es:

**CATANIA, ANNA;
BONINO, FERRUCCIO;
GRIECO, PAOLO y
NOVELLINO, ETTORE**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 400 515 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).

DESCRIPCIÓN

Análogos de melanocortina con actividad antimicrobiana

5 **Campo de la invención**

La presente invención encuentra aplicación en los campos terapéuticos. En particular, se refiere a nuevos péptidos de melanocortina sintéticos que tienen una actividad antimicrobiana mejorada.

10 **Antecedentes**

La hormona adrenocorticotropa (ACTH) y la hormona estimulante de melanocitos α , β y γ (α , β y γ -MSH) se denominan generalmente péptidos de melanocortina o melanocortinas por su origen común como derivados postraduccionales de pro-opiomelanocortina (POMC).

15 La α -MSH es un tridecapéptido que ejerce efectos pleiotrópicos en varias rutas fisiológicas incluyendo la modulación de la fiebre y la inflamación, el control del comportamiento de alimentación y de la homeostasis de la energía, el control de funciones autónomas y el aumento en la melanogénesis. Los investigadores exploraron la idea de que la α -MSH podría ejercer, aparte de la actividad antiinflamatoria establecida, también una actividad antiinfecciosa. Por
20 tanto, se encontró que la α -MSH tiene una potente actividad antimicrobiana, especialmente contra *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*.

En particular, *Candida albicans*, pertenece a un grupo de hongos que pueden provocar infecciones graves, es decir candidiasis, que comprende además, por ejemplo, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. Lusitaniae*, *C. stellatoidea*,
25 *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii*. En condiciones fisiológicas, dichos saprófitos ubicuos son huéspedes naturales e inofensivos de la mucosa del organismo sano. Sin embargo, cuando las defensas naturales, representadas principalmente por el sistema inmunológico, están debilitadas debido a estrés, terapias farmacéuticas, como con antibióticos, cortisona, inmunosupresor, agentes citostáticos, anticonceptivos, o incluso radioterapia, intervenciones quirúrgicas que requieren inserción de un catéter o diálisis o infusiones de larga
30 duración, prótesis insertadas, enfermedades tales como diabetes, obesidad o desnutrición, hipertiroidismo, tumores, u otros acontecimientos como quemaduras o traumatismos, especialmente en el lactante o en pacientes ancianos, *Candida* puede convertirse en un agente infeccioso peligroso. En particular, las infecciones pueden implicar a la piel, las vías respiratorias, incluyendo la boca, la garganta y la faringe, el aparato digestivo o incluso pueden provocar infecciones en el aparato genitourinario o infecciones sistémicas en el sistema cardiocirculatorio, provocando
35 posiblemente endocarditis.

El análisis del péptido de la hormona estimulante de melanocitos demostró que la secuencia (6-13) contiene la secuencia central invariable His-Phe-Arg-Trp (6-9), que es común para todos los péptidos de melanocortina y es responsable de la unión a los receptores de melanocortina. Su tripéptido C-terminal Lys-Pro-Val (11-13) se ha
40 identificado como relevante tanto para la activación de receptores como para la actividad antimicrobiana a través del aumento en AMPc. Por el contrario, no se identificó que el extremo N-terminal tenga una influencia sobre la actividad candidacida. Estudios adicionales, tales como, por ejemplo, el barrido de alanina, indican que el residuo de prolina en la posición 12 tiene un papel importante para tal actividad.

45 Además, Lys-11 y Pro-12 demostraron ser esenciales para la actividad antimicrobiana, de hecho, su sustitución provoca que la actividad casi se suprima.

Por otro lado, la sustitución en la posición 7 de la secuencia central puede intensificar la potencia de las melanocortinas. Una sustitución en la posición 7, tal como, por ejemplo, la sustitución con D-Nal, aumenta la afinidad
50 de α -MSH por el receptor de melanocortina MC4R. La sustitución en la posición 12 por un aminoácido más lipófilo, como Phe, dio como resultado un aumento notable en la actividad candidacida.

A pesar de todos los péptidos ya sometidos a prueba, todavía existe una necesidad no satisfecha en la técnica anterior de compuestos más activos, que provoquen menos efectos secundarios a los pacientes, resultando así más
55 tolerables, y que también sean más seguros y más fáciles de administrar a los pacientes así como más estables, permitiendo así la preparación industrial.

Sumario de la invención

60 La presente invención se refiere a nuevos compuestos peptídicos que tienen una actividad sorprendente contra *Candida*. Dichos efectos inesperados están relacionados con modificaciones de la estructura de compuestos ya conocidos con la introducción de aminoácidos no naturales.

Objeto de la invención

Por consiguiente, es un primer objeto de la invención proporcionar péptidos de melanocortina sintéticos que tienen la secuencia de aminoácidos correspondiente a la estructura de MSH0704 y MSH0708 como en la página 12.

Como segundo objeto, la presente invención se refiere a dichos péptidos de melanocortina sintéticos como medicamento.

En un tercer objeto, los péptidos de melanocortina de la invención son medicamentos antimicrobianos.

En una realización preferida, los péptidos de melanocortina de la invención tienen actividad candidacida o tienen actividad antimicrobiana contra *S. aureus* o *P. aeruginosa* según la reivindicación 17.

Como una realización preferida adicional, la presente invención se refiere a una preparación farmacéutica.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra aminoácidos no convencionales según la presente invención

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a los péptidos indicados a continuación en la tabla 2

SECUENCIA PEPTÍDICA

Los péptidos de la invención pueden usarse como medicamento.

En particular, según el tercer objeto de la invención, los péptidos dados a conocer mostraron inesperadamente actividad antimicrobiana y, más en particular, actividad candidacida, que es superior a la de los péptidos conocidos a partir de la técnica anterior.

De hecho, se ha encontrado sorprendentemente que los compuestos de la presente invención son muy activos contra *Candida*. Así, se pueden usar de forma útil para el tratamiento de patologías causadas por hongos *Candida*.

Se ha encontrado que los compuestos de la presente invención son particularmente activos contra *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. krusei*.

En particular, contra las cepas de *C. albicans* ATCC 76615, ATCC 24433 o las cepas 995439, 995147, 000954, 991185, 994199, 983201-R1, 011587; contra las cepas de *C. glabrata* 18012, 995667, 995651 y contra las cepas de *C. krusei* 995668, 991388, 004490.

En particular, se muestran los resultados en el ejemplo 2, que muestra que los compuestos MSH0704 y MSH0708 son los más activos.

En particular, tienen la CIM (concentración inhibitoria mínima) más baja y el espectro de actividad más amplio con respecto al número de cepas que pueden destruir.

Por consiguiente, MSH0704 y MSH0708 son los péptidos preferidos de la invención.

Los péptidos de la invención, como un objeto adicional de la invención, también son activos contra microbios. En particular, se han sometido a prueba y resultaron ser particularmente activos contra *Staphylococcus aureus* y contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Como un objeto adicional, la presente invención se refiere a una preparación farmacéutica que comprende uno o más de los péptidos de la invención. En particular, dicha preparación puede encontrar uso como antimicrobiano o, específicamente, como medicamento candidacida.

Además, la preparación farmacéutica de la invención puede incluir uno o más otros principios activos, que o bien son candidacidas, mostrando por tanto posiblemente un efecto sinérgico, o bien no lo son. En particular, pueden estar incluidos: antimicrobianos, tales como antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antiparasitarios, etc. o específicamente otros agentes candidacidas conocidos, tales como, por ejemplo, clotrimazol, nistatina, fluconazol, ketoconazol o, en caso de infecciones más graves, anfotericina B, caspofungina o voriconazol.

Pueden establecerse dosificaciones y regímenes de dosificación según la clase de patología y forma farmacéutica seleccionada.

Más en particular, la preparación de la invención puede formularse en una forma farmacéutica de administración adecuada para administración oral, incluyendo bucal o sublingual; rectal; nasal; tópica, incluyendo bucal, sublingual o transdérmica; vaginal; o parenteral, incluyendo por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica.

- 5 En particular, para la administración oral, pueden prepararse en forma de cápsulas duras o blandas, comprimidos, polvos o gránulos; disoluciones, jarabes o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas o batidos comestibles; o emulsiones o bien de aceite en agua o bien de agua en aceite; para la administración tópica, pueden prepararse como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, disoluciones, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles o aceites; para la administración nasal pueden prepararse pulverizaciones o gotas; para la administración vaginal pueden prepararse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización; para la administración parenteral pueden prepararse, disoluciones o suspensiones inyectables estériles acuosas y no acuosas.

- 15 Las formas farmacéuticas dadas a conocer anteriormente pueden comprender, además del uno o más péptidos de la invención y según el tipo de formulación, otros aditivos o excipientes convencionales en la técnica, tales como, por ejemplo, diluyente, disolventes, agentes de relleno, cargas, modificador de la reología, estabilizadores, aglutinantes, lubricantes, disgregante, conservantes, agentes de ajuste del pH, tampones, antioxidante, agentes quelantes, plastificante, polímeros, emulsionantes, edulcorantes, agentes aromatizantes, etc., solos o en combinación de los mismos.

20

Ejemplo 1

Ensayos de actividad inhibitoria

- 25 Se adquirieron dos aislados de *Candida albicans* de la ATCC (n.^{os} 24433 y 76615). Se obtuvieron los demás aislados de levaduras de la colección de la Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milán. La colección incluía *C. albicans* (7 aislados), *C. glabrata* (3 aislados) y *C. krusei* (3 aislados). Se realizaron pruebas de susceptibilidad antifúngica usando el método de microdilución en caldo según las directrices del NCCLS M27-A (Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínico. 1997, Método de referencia para las pruebas de susceptibilidad antifúngica de levaduras por dilución en caldo y el documento M27-A del NCCLS de norma aprobada. Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínico, Wayne, Pa.). Se retiraron los organismos de la disolución madre en glicerol congelada (suspensiones estériles en glicerol al 10% almacenadas a -70°C), se subcultivaron sobre placas de dextrosa-Sabouraud, y se incubaron a 35°C. Tras 48 h de incubación, se inspeccionaron las placas para determinar la pureza. Para preparar levadura en fase de crecimiento estacionaria, se tomó una colonia de la placa de agar y se transfirió a 5 ml de caldo Sabouraud-dextrosa y se incubó durante 48 h a 35°C. Se centrifugaron las células a 1.000 x g durante 10 min. y se lavó el sedimento dos veces con agua destilada. Se contaron las células y se suspendieron en medio RPMI 1640 tamponado a pH 7,0 con tampón ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS) 0,165 mol·l⁻¹ (Sigma) para obtener el inóculo de prueba doble (de 1 x 10³ a 5 x 10³ UFC/ml). Cada pocillo de las placas de 96 pocillos en forma de U recibió 100 µl de cada péptido antifúngico en concentraciones de desde 10⁻⁴ hasta 7,8 x 10⁻⁷ M y 100 µl del inóculo doble hasta una concentración final de levadura de 0,5 x 10⁻² a 5 x 10⁻² células ml⁻¹.

- Se incubaron las placas a 35°C y se observaron para determinar el crecimiento a las 48 h. Se determinó la CIM90, es decir el punto final de las concentraciones inhibitorias mínimas, como una reducción del 90% en la turbidez medida usando un espectrofotómetro (Titertek multiscan a una longitud de onda de 690 nm).

45

Ejemplo 2

Actividad inhibitoria

50

Se notifican los resultados de los ensayos realizados según el ejemplo 1 anterior en la tabla 3 a continuación, mostrando la CIM 90 a las 48 h, indicada como concentración en µg/ml, para los compuestos peptídicos de la invención.

- 55 Tabla 3

Cepa de <i>Candida</i>	Péptido	
	MSH0704	MSH0708
<i>C. albicans</i>		
ATCC 76615	61	31
ATCC 24433	31	31
995439	31	31
995147	31	31
000954	61	31
991185	61	31
994199	31	31

983201-R1	61	61
011587	31	61
C. glabrata		
18012	122	123
995667	122	123
995651	122	123
C. krusei		
995668	61	61
991388	31	61
004490	31	31

Los datos anteriores demuestran que los compuestos más activos son MSH0704 y MSH0708.

Ejemplo 3

5

Actividad antibacteriana

En un desarrollo adicional de esta invención se determinó la actividad antibacteriana de los péptidos MSH 704 y 708.

- 10 Se hicieron crecer las cepas bacterianas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 en agua con peptona Bacto al 2% (Difco 1807-17-4) hasta que el crecimiento fue exponencial. Se usó una técnica de microdilución convencional con un inóculo de 2×10^6 UFC/ml. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los péptidos en agua con peptona Bacto al 1% tras incubación durante la noche a 37°C. El intervalo de concentración usado para los péptidos fue de 10^{-4} a $7,8 \times 10^{-7}$ M. Se encontraron valores de CIM de 31 µg/ml para *S. aureus* y 61 µg/ml para *P. aeruginosa* tanto para MSH 704 como para 708.

Lista de secuencias

- 20 Advertencia: se proporcionan todas las secuencias que no corresponden a MSH0704 y MSH0708 sólo para fines de ilustración.

<110> Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena

<120> Nuevas melanocortinas con actividad antimicrobiana

25

<130> E0071494

<160> 16

- 30 <170> Patent In versión 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

- 35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Inhibidor de melanocortina antimicrobiano

- 40 <220>

<221> MOD_RES

<222> (2).. (2)

<223> Ala es 3-(2-naftil)-D-alanina

- 45 <400> 1

His Ala Arg Trp Gly Gly Lys Phe Val

1

5

<210> 2

<211> 8

- 50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de melanocortina antimicrobiano

5
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Ala es 3-(2-naftil)-D-alanina

10
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa es ácido 1-amino-ciclopentanocarboxílico

15
<400> 5
His Ala Arg Trp Xaa Lys Phe Val

1 **5**
<210> 6
<211> 8
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de melanocortina antimicrobiano

25
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Ala es 3-(2-naftil)-D-alanina

30
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Xaa es ácido 1-amino-ciclopropanocarboxílico

35
<400> 6
His Ala Arg Trp Xaa Lys Phe Val

1 **5**
<210> 7
<211> 8
40 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de melanocortina antimicrobiano

45
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Ala es 3-(2-naftil)-D-alanina

50
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Gly es alfa-t-butilglicina

55
<400> 7
His Ala Arg Trp Gly Lys Phe Val

1 **5**

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido de melanocortina antimicrobiano
 <220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Ala es 3-(2-naftil)-D-alanina
 <220>
 15 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es ácido 2-aminoindano-2-carboxílico
 <400> 8
His Ala Arg Trp Xaa Lys Phe Val
 20 **1** **5**
 <210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Péptido de melanocortina antimicrobiano
 <220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (2) .. (2)
 <223> Ala es 3-(2-naftil)-D-alanina
 <220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es ácido 1-amino-ciclobutanocarboxílico
 <400> 9
His Ala Arg Trp Xaa Lys Phe Val
 40 **1** **5**
 <210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Péptido de melanocortina antimicrobiano
 <220>
 50 <221> MOD RES
 <222> (2).. (2)
 <223> Ala es 3-(2-naftil)-D-alanina
 <220>
 55 <221> MOD RES
 <222> (5).. (5)
 <223> Xaa es ácido 2-aminociclopentanocarboxílico
 <400> 10

His Ala Arg Trp Xaa Lys Phe Val

1 5
 <210> 11
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de melanocortina antimicrobiano
 10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Ala es 3-(2-naftil)-D-alanina
 15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es ácido 1-amino-ciclohexanocarboxílico

20 <400> 11
His Ala Arg Trp Xaa Lys Phe Val

1 5
 <210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de melanocortina antimicrobiano
 30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2) .. (2)
 <223> Ala es 3-(2-naftil)-D-alanina

35 <400> 12
His Ala Arg Trp Phe Lys Phe Val

1 5
 <210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de melanocortina antimicrobiano

45 <400> 13
Phe Phe His His Phe Arg Trp Gly Lys Phe Val

1 5 10
 <210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de melanocortina antimicrobiano

<400> 14

Phe Phe His His Ala Arg Trp Gly Lys Phe Val

1

5

10

<210> 15

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de melanocortina antimicrobiano

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Ala es 3-(2-naftil)-D-alanina

15

<400> 15

Phe Phe His His Phe Arg Gly Lys Pro Val

1

5

10

<210> 16

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de melanocortina antimicrobiano

25

<400> 16

Phe Phe His His Phe Arg Gly Lys Pro Val

1

5

10

REIVINDICACIONES

1. Péptidos que tienen la siguiente fórmula:

5 H-His-D(2)-Nal-Arg-Trp-Cha-Lys-Phe-Val-NH₂

H-His-D(2)-Nal-Arg-Trp-Aic-Lys-Phe-Val-NH₂

en la que Cha es ciclohexil-alanina y Aic es ácido 2-aminoindano-2-carboxílico.

10

2. Péptidos según la reivindicación 1, como medicamento.

3. Péptidos según la reivindicación 2, como medicamento antimicrobiano.

15 4. Péptidos según la reivindicación 2 ó 3, como medicamento candidacida.

5. Péptidos según las reivindicaciones 2 a 4, como medicamento contra *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida krusei*.

20 6. Péptidos según las reivindicaciones 2 a 3, como medicamento contra *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa*.

7. Preparación farmacéutica que comprende uno o más de los péptidos según la reivindicación 1.

25 8. Preparación farmacéutica según la reivindicación 7, que comprende además uno o más principios activos seleccionados del grupo que comprende agentes antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antiparasitarios.

9. Preparación farmacéutica según la reivindicación 8, en la que dichos agentes antifúngicos se seleccionan del grupo que comprende clotrimazol, nistatina, fluconazol, ketoconazol, anfotericina B, caspofungina, voriconazol.

30

10. Preparación farmacéutica según las reivindicaciones 8 a 9, que comprende además excipientes y aditivos seleccionados del grupo que comprende diluyente, disolventes, agentes de relleno, cargas, modificadores de la reología, estabilizadores, aglutinantes, lubricantes, disgregante, conservantes, agentes de ajuste del pH, tampones, antioxidante, agentes quelantes, plastificante, polímeros, emulsionantes, edulcorantes, agentes aromatizantes; solos o en combinación de los mismos.

35

11. Preparación farmacéutica según las reivindicaciones 7 a 10, para administración oral, rectal, nasal, tópica, vaginal o parenteral.

40 12. Preparación farmacéutica según las reivindicaciones 7 a 11, en forma de cápsulas duras o blandas, comprimidos, polvos o gránulos, disoluciones, jarabes o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos, espumas o batidos comestibles, emulsiones líquidas de aceite en agua o de agua en aceite, pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, disoluciones, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles o aceites, pulverizaciones o gotas, pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas; disoluciones o suspensiones inyectables estériles acuosas o no

45

FIG 1

