

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 457**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/08** (2006.01)

**C07K 7/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2009 E 09737145 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2344178**

54 Título: **Secuencias peptídicas, su forma ramificada y uso de estas para aplicaciones antimicrobianas**

30 Prioridad:

**05.10.2008 US 102854 P**

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

**03.03.2015**

73 Titular/es:

**UNIVERSITA DEGLI STUDI DI SIENA (100.0%)  
Via Banchi di Sotto, 55  
53100 Siena, IT**

72 Inventor/es:

**BRACCI, LUISA;  
FALCIANI, CHIARA y  
PINI, ALESSANDRO**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 530 457 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

Secuencias peptídicas, su forma ramificada y uso de estas para aplicaciones antimicrobianas

## 5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a la identificación de potentes secuencias peptídicas antimicrobianas que son particularmente resistentes a la actividad de las proteasas y, por consiguiente, muy adecuadas para uso in vivo, particularmente cuando son sintetizadas en la forma MAP tetra-ramificados. Las secuencias de la presente invención (KKIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 1, RRIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 2, KRIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 3, RKIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 4) se derivaron del péptido M6 reportado anteriormente que porta una Gln como primer residuo amino-terminal. La eliminación de la Gln dio una mejora imprevista y sorprendente en la estabilidad del péptido y en la homogeneidad de un lote a otro, y, en consecuencia, permitió un método fiable para la síntesis de péptidos que es particularmente difícil para el péptido M6.

15

## Antecedentes de la técnica

La creciente emergencia de bacterias resistentes a múltiples medicamentos es una preocupación mundial, sobre todo en aquellos países donde los antibióticos se usan ampliamente en las clínicas. Un número de patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, algunos enterococos, *Pseudomonas aeruginosa* y muchas otras bacterias Gram-negativas han desarrollado resistencia contra los antibióticos tradicionales así como también contra aquellos de nueva generación (Wenzel y Edmond 2000). Por lo tanto, desarrollar nuevos antibióticos se ha vuelto cada vez más importante. Esta demanda insta a la comunidad de investigadores y a las compañías farmacéuticas a considerar nuevos agentes antimicrobianos. Los péptidos antimicrobianos son considerados una de las mejores alternativas a los antibióticos tradicionales que generalmente causan la selección de bacterias resistentes (Hancock y Sahl 2006). La mayoría de los péptidos antibacterianos son componentes de la inmunidad innata de los animales, que incluye los seres humanos, plantas y hongos (Zaslöf, 2002). Ellos suelen consistir en 6-50 residuos de aminoácidos y tienen una carga neta positiva. Los péptidos catiónicos interactúan selectivamente con las membranas bacterianas aniónicas y con otras estructuras cargadas negativamente tales como LPS y el DNA. Las membranas eucariotas, en su capa externa, están normalmente menos cargadas negativamente que la de las bacterias, y, a diferencia de la membrana bacteriana, además se estabilizan por moléculas de colesterol. Estas diferencias son la base de la especificidad de los péptidos catiónicos. El mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos catiónicos es, en consecuencia, debido a su unión específica a las membranas bacterianas, lo que provoca la permeación celular y, en algunos casos, la inhibición de las vías metabólicas.

35

Muchos estudios entonces, se destinan a la identificación y caracterización de secuencias peptídicas antimicrobianas mediante el estudio de su mecanismo de acción, su toxicidad para las células eucariotas y su eficacia terapéutica cuando se administran tópicamente o sistémicamente. Desafortunadamente, hasta ahora, dos problemas principales obstaculizaron el desarrollo de fármacos de péptidos antimicrobianos. El primero es que la selectividad de los péptidos antimicrobianos naturales para las bacterias es generalmente demasiado baja y que parecen ser muy tóxicos para las células eucariotas, particularmente eritrocitos, lo que genera un alto nivel de hemólisis. El segundo está relacionado con la vida media generalmente corta de los péptidos in vivo. Estas son las principales razones por las que sólo unos pocos péptidos catiónicos llegaron al mercado en los últimos 10 años (la polimixina y la daptomicina son dos ejemplos de éxito).

45

Hace unos años, los investigadores comenzaron a concentrarse en la identificación de nuevas secuencias peptídicas de origen no natural, seleccionadas en el laboratorio mediante el diseño racional o la selección de bibliotecas combinatorias. El objetivo fue encontrar péptidos con mejores propiedades biológicas en términos de toxicidad general y especificidad para las bacterias y la mejoría de la vida media para el desarrollo de fármacos.

50

En el laboratorio de los inventores, se identificó una secuencia de péptido no natural, que mostró una fuerte actividad antimicrobiana, especialmente contra las bacterias Gram-negativas (Pini y otros, 2005 WO 2006/006195). El péptido, (QKKIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 5, nombrado M6) se obtuvo mediante modificaciones racionales de una secuencia identificada a partir de una biblioteca combinatoria, fue sintetizado en la forma tetra-ramificada MAP donde cuatro secuencias peptídicas idénticas están unidas entre sí por un núcleo de lisina. Esta molécula mostró una alta resistencia a las proteasas y peptidasas, por tanto, supera el problema de la vida media corta (Bracci y otros, 2003; Falciani y otros, 2007). El péptido antimicrobiano ramificado M6 ya se caracterizó por su actividad biológica contra una serie de bacterias, que incluye varios aislados clínicos resistentes a múltiples drogas, por sus interacciones con el DNA, por su toxicidad in vitro contra varias líneas de células eucariotas, así como por su actividad hemolítica, por su inmunogenicidad, por su toxicidad in vivo cuando se inyecta intraperitonealmente o intravenosamente (Pini y otros, 2007).

60

Durante todos los experimentos llevados a cabo para la caracterización de M6 notamos que diferentes síntesis de M6

produjeron péptidos con actividades no homogéneas (disimilitud de lote a lote) (Figura 1A). El análisis de espectrometría de masas reveló que el primer aminoácido de M6, a saber, Gln, se convierte en ácido piroglutámico (Figura 1B). La presencia de los diferentes péptidos que contienen ácido piroglutámico y no Gln cambia de un lote a otro en un porcentaje impredecible. La completa eliminación de este producto secundario es en los hechos imposible, en primer lugar, porque no se descarta fácilmente durante la purificación por HPLC debido al tiempo de retención similar al del producto principal, y en segundo lugar porque cuando está en disolución se produce continuamente a partir del péptido parental. Dado que el análogo piroGlu mostró una actividad antimicrobiana sensiblemente reducida con respecto al análogo de Gln, la actividad global de la mezcla varió de un lote a otro (Figuras 1A).

5

10

15

Con el objetivo de minimizar la disimilitud de un lote a otro, en la perspectiva de una producción del péptido a gran escala para experimentos preclínicos y, posiblemente, para la fabricación industrial, hemos eliminado del M6 el primer residuo de Gln y además reemplazamos las dos primeras Lis con Arg o alternamos los dos primeros residuos con Lis y Arg. Esto produjo las siguientes secuencias 9-mer privadas de la primera Gln presente en la secuencia M6: KKIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 1, nombrada M33; RRIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 2, nombrada M34; KRIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 3, nombrada M35; RKIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 4, nombrada M36. Estas secuencias son el objetivo de la presente solicitud.

Los nuevos péptidos se sometieron a varias caracterizaciones descritas en los ejemplos siguientes.

20

25

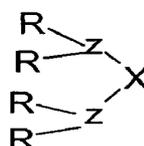
Prácticamente, la eliminación de un único residuo de aminoácido en el extremo del N terminal de la secuencia del péptido M6, y la posible alternancia de Lis y Arg en las dos primeras posiciones, produce una mejor actividad antimicrobiana, y no causa ningún comportamiento diferente en términos de toxicidad secundaria y mecanismo de acción. De hecho, se produce una fuerte mejora en la responsabilidad de la síntesis, haciendo que las secuencias de péptidos M33, M34, M35 y M36 sean mucho más adecuadas para un desarrollo industrial con respecto al M6. Gracias a la mejora en la estabilidad y en la homogeneidad de un lote a otro, las secuencias M33, M34, M35 y M36 son candidatos ideales para el desarrollo de fármacos antimicrobianos.

Descripción de la invención

30

Es un objetivo de la presente invención las secuencias peptídicas KKIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 1, M33, RRIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 2, M34, KRIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 3, M35, RKIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 4, M36, sintetizadas en estructura monomérica o dendrímica, preferentemente en forma de Péptido de Múltiples Antígenos (MAP) que sigue la fórmula general:

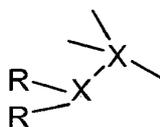
35



40

donde R es un péptido monomérico con una secuencia escogida del grupo de M33, M34, M35 y M36 (todos los R son la misma secuencia en una molécula MAP), X es una molécula trifuncional y Z es una molécula trifuncional como X o el siguiente grupo químico:

45



50

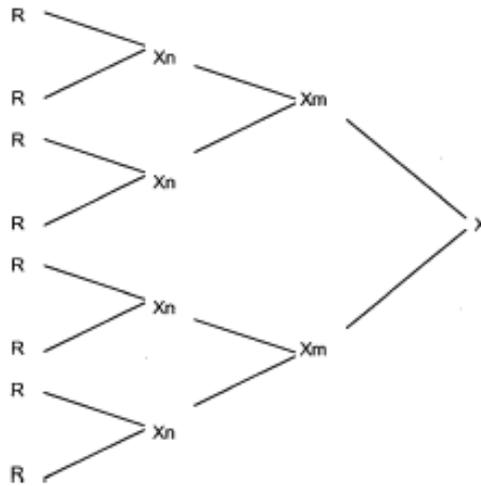
donde R y X se definen anteriormente.

55

Es un objetivo adicional de la invención un péptido antibacteriano que tiene del terminal amino al carboxílico una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo de: KKIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 1, RRIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 2, KRIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 3, RKIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 4. Preferentemente el péptido es de forma lineal. con mayor preferencia el péptido es multimerizado en un esqueleto de poliácilamina, en un esqueleto de unidades de dextrano o un esqueleto de unidades de etilenglicol. Más preferentemente el péptido está en forma de Péptidos de Múltiples Antígenos (MAP), con la siguiente fórmula:

60

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60



en la cual R es el péptido como se reivindica en la reivindicación 1; X es una molécula trifuncional;  $m = 0$  o  $1$ ;  $n = 0$  o  $1$ ; cuando m y n son 0 el péptido es un dímero; cuando  $m=1$  y  $n=0$  el péptido es un tetramero, cuando  $m=1$  y  $n=1$  el péptido es un octámero.

Preferentemente X es una unidad trifuncional. Con mayor preferencia la unidad trifuncional comprende al menos dos grupos aminos funcionales. Aún preferentemente X es lisina, ornitina, norlisina o amino alanina. Todavía preferentemente X es ácido aspártico o ácido glutámico. Con mayor preferencia, X es propilenglicol, ácido succínico, derivado de diisocianatos o diaminas.

Es un objetivo adicional de la invención el péptido como se describió anteriormente para uso médico Preferentemente como un fármaco antibacteriano.

Es un objetivo adicional de la invención una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente aceptable y eficaz del péptido como se describió anteriormente. Preferentemente, la composición está en forma de una solución para inyectar en individuos para uso sistémico, con mayor preferencia en forma de una solución para inyectar como agente desintoxicante para la neutralización LPS, preferentemente incluso en forma de lavado para ojos, enjuague bucal, pomada o solución para uso tópico.

Es un objetivo adicional de la invención una preparación desinfectante y/o detergente con actividad antibacteriana que comprende el péptido de la invención.

Es un objetivo adicional de la invención el uso del péptido de la invención como un conservante para la preparación de productos alimenticios y/o de productos cosméticos y/o de productos homeopáticos.

Es un objetivo de la presente invención el uso de tales péptidos como agentes antimicrobianos para aplicaciones médicas, veterinarias y agronómicas.

Las secuencias de la presente invención son ventajosas con respecto al péptido M6 ya descrito debido a su estabilidad y fuerte homogeneidad lote a lote en términos de la composición molecular y la actividad biológica. La secuencia M6 (QKKIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 5) incluye un aminoácido Gln como el primer residuo N-terminal. Este aminoácido tendió a convertirse espontáneamente en ácido piro-glutámico en una cantidad impredecible. La presencia de ácido piro-glutámico en el lote causó una disminución sensible en la actividad total del péptido en dependencia del porcentaje de ácido piro-glutámico. (Fig. 1A). En los hechos la actividad antimicrobiana de M6 no es consistente a largo plazo y esto afecta negativamente el escalado industrial. La eliminación simple, y sólo aparentemente trivial, de la primera Gln en la secuencia de M6, y, posiblemente, la alternancia de los dos primeros residuos con Lis y Arg, produce nuevas secuencias peptídicas con una muy mejorada estabilidad y homogeneidad de un lote a otro, haciendo fiable la fabricación a gran escala. Esta característica crucial junto con su muy alentadora actividad antimicrobiana hace a los péptidos M33, M34, M35 y M36 candidatos óptimos para el desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos.

La invención se describirá ahora por medio de ejemplos no limitantes que se refieren a las siguientes figuras:

Figura 1. A, actividad antibacteriana contra células TG1 de *E. coli*. Comparación de los péptidos tetramericados siguientes: síntesis de M6 lote 1 (triángulos), síntesis de M6 lote 2 (cuadrados), síntesis de M6 lote 3 (círculos blancos), que contienen una mezcla de Gln y piroGlu (en porcentajes desconocidos) como primer

aminoácido, piro-M6 (asteriscos), donde el primer aminoácido es 100% piroGlu, y M33 (círculos negros), en los que se detectó el primer Gln. El péptido que contiene 100% de piroGlu dio el peor resultado, lo que confirma que la modificación de Gln en piroGlu disminuyó la actividad antibacteriana. Los péptidos M6 que contienen tanto Gln y piroGlu mostraron actividades antimicrobianas intermedias. La eliminación del primer residuo de la secuencia de M6 mejoró la actividad peptídica como se demostró mediante la curva para el M33. SD derivadas por medio de tres experimentos diferentes. Muchas síntesis diferentes de M33 (y además de M34, M35 y M36, que no se muestran aquí) dieron resultados perfectamente superpuestos sin ningún resultado dudoso. B, Análisis por espectrometría de masas de la mezcla en bruto del péptido tetra-ramificado M6. La masa molecular calculada de M6 fue 5195 Da. Dos picos principales están presentes, uno en 5197 Da que corresponde a M6 no modificado y uno en 5179 Da que corresponde al producto secundario con una piroGlu en primera posición en el lugar de una de las cuatro Gln. C, Análisis por espectrometría de masas del péptido tetra-ramificado M33 después de 24 horas de incubación en el suero. El péptido aparece como un solo pico en la masa molecular esperada (4683 DA).

Figura 2. Porcentaje de hemólisis provocada por el péptido M33 tetra-ramificado incubado 3 o 24 horas con los glóbulos rojos humanos. A la concentración más alta causó solo una actividad hemolítica insignificante.

Figura 3. Inhibición de la liberación de TNF- $\alpha$  por neutralización de LPS. A, Células Raw 264.7 se incubaron con LPS de *P. aeruginosa* 20 ng/ml y M33. Los triángulos indican la incubación con LPS y diferentes concentraciones de M33. Los cuadrados indican la incubación con sólo M33. B, Células Raw 264.7 se incubaron con LPS a partir de *K. pneumoniae* 5 ng/ml y M33. Los triángulos indican la incubación de los macrófagos con LPS y diferentes concentraciones de M33. Los cuadrados indican la incubación de los macrófagos con sólo M33. SD derivadas por medio de tres experimentos diferentes. 100% indica la cantidad máxima de TNF- $\alpha$  producido por macrófagos cuando se incubaron con LPS sin M33. Los otros porcentajes indican la cantidad de TNF- $\alpha$  producido por macrófagos cuando se incubaron con LPS y M33, con respecto al 100%. Los niveles basales de TNF- $\alpha$  fueron insignificantes. MIC de M33 se indica por la flecha.

Figura 4. Actividad antibacteriana in vivo del péptido M33 tetra-ramificado. A, Ratones Balb-c (20 g) se inyectaron intraperitonealmente con una cantidad letal de células TGI de *E. coli* ( $1,5 \times 10^9$  CFU). La línea continua (CTR) indica los ratones que sólo se inyectaron ip con bacterias y sin M33. La línea discontinua indica los ratones inyectados ip con bacterias y una sola inyección de péptido M33 10 mg/Kg 30 minutos más tarde. B, Ratones Balb-c (20 g) se inyectaron intraperitonealmente con una cantidad letal de células de *P. aeruginosa* (ATCC 27853  $1 \times 10^7$  CFU). La línea continua (Ctr) indica los ratones que sólo recibieron bacterias; otros grupos recibieron bacterias y una dosis única de M33 30 minutos más tarde (véase la figura para las dosis de M33). C, Ratones Balb-c (20 g) se inyectaron intraperitonealmente con una cantidad letal de células de *P. aeruginosa* (aislado VR 147 resistente a fármacos múltiples,  $1,5 \times 10^7$  CFU). La línea continua (Ctr) indica los ratones que sólo recibieron las bacterias; la línea discontinua indica los ratones que recibieron las bacterias y una dosis única de M33 25 mg/Kg. D, ratones Balb-c (20 g) se inyectaron por vía intraperitoneal con una cantidad letal de células de *P. aeruginosa* (ATCC 27853  $1 \times 10^7$  CFU). La línea continua (Ctr) indica los ratones que sólo recibieron bacterias; la línea quebrada larga los ratones que recibieron bacterias y dos inyecciones de M33 (5 mg/Kg x 2), 30 minutos y 12 horas después de bacterias; la línea quebrada corta los ratones que recibieron bacterias y tres inyecciones de M33 (5 mg/Kg x 3), 30 minutos, 12 y 24 horas después de las bacterias.  $P < 0.05$ .

Descripción detallada de la invención

#### Síntesis del péptido

El péptido monomérico fue sintetizado como una amida peptídica por un sintetizador automático (MultiSynTech, Witten, Alemania) en una resina Rink Amide MBHA (Nova Biochem) usando la estructura 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) y O-(benzotriazol-1-il) hexafluorofosfato de-N,N,N',N'-tetrametiluronio/activación de la 1,3-diisopropiletilamina. Moléculas de péptidos ramificados (MAP) se sintetizaron en Fmoc<sub>4</sub> Lis<sub>2</sub> resina Lis- $\beta$  Ala Wang. Los grupos protectores de cadena lateral tritilo para Gln, terc-butoxicarbonilo para Lis, 2,2,4,6,7-pentametildihidrobencofurano-5-sulfonilo para Arg, y éter tert-butilo para Ser. Los péptidos después se escinden de la resina y se desprotegen con ácido trifluoroacético que contiene agua y triisopropilsilano (95/2,5/2,5). Los péptidos brutos se purificaron por cromatografía de fase inversa en una columna Vydac C18. La identidad y pureza de los productos finales se confirmaron por espectrometría de masas ETTAN MALDI-TOF (MS) (Amersham Biosciences)

#### Resistencia a proteasas de M33, M34, M35 y M36 tetra-ramificados

Un total de 10  $\mu$ l de una solución 10 mM de péptido se incubó a 37°C con 10  $\mu$ l de suero humano. Las muestras se recogieron después de 24 h de incubación, se precipitaron con 150  $\mu$ l de metanol, y se centrifugaron durante 2 min a 10.000 x g. Después, la solución bruta se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y MS. HPLC se realizó con una columna Vydac C18, y la solución bruta se diluyó cinco veces con ácido trifluoroacético al 0.1% antes de la inyección y se observó a 280 nm.

*Estabilidad de los péptidos M33, M34, M35 y M36*

5 Una sola colonia de la cepa de *E. coli* c TG1 se cultivó en el medio 2xTY hasta 0.2 OD<sup>600</sup>. 25 µl de péptidos disueltos como se representa en la fig. 1 y 25 µl de *E. coli* derivados del cultivo anterior se incubaron en placas de 96 pocillos durante 75 minutos a 37°C en agitación suave. Como control usamos un pozo incubado con 25 µl de *E. coli* y 25 µl de medio solo (100% de viabilidad). Después de la incubación la solución de cada pocillo se diluyó 1: 1000 y se sembró en una placa de agar 2x TY. Las placas se incubaron durante la noche a 30°C. Las colonias crecidas en las placas se contaron (CFU/ml) el día siguiente

10 Los diferentes lotes de péptido tetra-ramificado M6 (QKKIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 5) proporcionaron resultados disímiles en contra de *E. coli* cuando se analizaron en paralelo en el mismo experimento (M6 lote 1, 2 y 3 de la Fig. 1A). Por lo tanto, el M6 tetra-ramificado se analizó por espectrometría de masas, que reveló dos picos principales, uno correspondiente a la masa molecular regular de M6 y el otro a la masa molecular de un péptido tetra-ramificado que contiene piroGlu como primer residuo (Fig. 1B). Diferentes preparaciones de M6 obtenidos por procedimientos idénticos dieron perfiles de EM con los dos picos siempre en diferentes proporciones, lo que confirma que la conversión de la primera Gln en piroGlu ocurrió en un porcentaje impredecible. La presencia de piroGlu en lugar de Gln afectó la actividad antimicrobiana de M6 como se demuestra por un péptido-tetra-ramificado en el que el primer aminoácido era 100% piroGlu (piro-M6 de la Fig. 1A). Por lo tanto, el péptido M6 no puede considerarse un verdadero candidato para el desarrollo de un nuevo medicamento

20 La eliminación del primer aminoácido de la secuencia del péptido M6 (QKKIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 5), y la posible sustitución de los dos primeros Lys con Arg, o alternando estos dos aminoácidos, produjo 4 nuevas secuencias (KKIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 1, RRIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 2, KRIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 3, RKIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 4) con una actividad altamente estable de péptidos derivados de la síntesis llevada a cabo en diferentes periodos.

30 Particularmente, el péptido nombrado M33: KKIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 1, fue sintetizado en muchos lotes diferentes, todos los cuales dieron el mismo perfil de MS con un único pico correspondiente a la masa molecular del M33 tetra-ramificado. (Fig.1C). Como era de esperar, el M33 tetra-ramificado además fue muy estable a la degradación proteolítica cuando se incubó en suero durante 24 h (Fig. 1C). De hecho, la eliminación del primer residuo de la secuencia de M6 no sólo estabilizó la homogeneidad de un lote a otro sino que además mejoró la actividad antibacteriana del péptido (M33 en la Fig. 1A)

35 Muchas síntesis diferentes de M33, M34, M35 y M36 dieron resultados perfectamente superpuestos sin fluctuaciones en el resultado final.

La estabilidad demostrada anteriormente hace a los péptidos M33, M34, M35 y M36 candidatos muy atractivos para la creación de un nuevo medicamento antibacteriano.

40 *Actividad antibacteriana de los péptidos tetra-ramificados M33, M34, M35 y M36*

45 La concentración inhibitoria mínima (MIC) se determinó mediante un ensayo de microdilución estándar recomendado por el Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS) usando el caldo de cultivo Mueller-Hinton (MH) complementado con cationes (Oxoid Ltd. Basingstoke, Reino Unido) y un inóculo bacteriano de  $5 \times 10^4$  CFU por pocillo, en un volumen final de 100 µl. Los resultados se registraron por inspección visual después de 24 h de incubación a 37°C.

50 Las MIC de M33, M4, M35 y M36 se determinaron frente a cepas de varias especies bacterianas, que incluyen patógenos Gram-negativos y además *Staphylococcus aureus* (Tabla 1). Las MICs en el intervalo micromolar se observaron contra varios Gram-negativos que incluyen *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y la mayoría de las *Enterobacteriaceae*, con excepción de *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* y *Burkholderia cepacia*. La actividad de los péptidos se mantuvo contra cepas de MDR con varios mecanismos de resistencia (tal como beta-lactamasas y carbapenomasas de espectro extendido), que incluyen cepas MDR de *P. aeruginosa* de pacientes CF. El perfil antimicrobiano de M33, M4, M5 y M6 y la potencia fueron similar en general a los de la polimixina B, aunque M33, M34, M35 y M36 preparados también para tener alguna actividad contra *S. aureus* (Tabla 1).

60

ES 2 530 457 T3

Tabla 1 MICs (µM) de M33 en comparación con la polimixina B contra cepas bacterianas representativas de varias especies patogénicas, que incluyen cepas MDR de origen clínico

	Especies y cepas	Cracterísticas relevantes <sup>a</sup>	M33	M34	M35	M36	Polimixina B	
5								
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Cepa de referencia, silvestre	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	
	<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	Cepa de referencia, silvestre	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	
15	<i>P. aeruginosa</i> VR-143/97	FQ <sup>r</sup> AG <sup>r</sup> ESC <sup>r</sup> NEM <sup>r</sup> (MBL/VIM-1)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	
	<i>P. aeruginosa</i> AV65	FQ <sup>r</sup> AG <sup>r</sup> ESC <sup>r</sup> NEM <sup>r</sup> (MBL/IMP-13)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	
20	<i>P. aeruginosa</i> SC-MDr03-06 <sup>b</sup>	FQ <sup>r</sup> AG <sup>r</sup> ESC <sup>r</sup> NEM <sup>r</sup>			3	3	3	1.5
	<i>P. aeruginosa</i> SC-VMr04-05 <sup>b</sup>	FQ <sup>r</sup> AG <sup>r</sup> ESC <sup>r</sup> NEM <sup>r</sup>			3	3	3	1.5
	<i>P. aeruginosa</i> SC-DMr05-04 <sup>b</sup>	FQ <sup>r</sup> AG <sup>r</sup> ESC <sup>r</sup> NEM <sup>r</sup>			1.5	1.5	1.5	1.5
25	<i>P. aeruginosa</i> SC-BGr12-02 <sup>b</sup>	FQ <sup>r</sup> AG <sup>r</sup> ESC <sup>r</sup> NEM <sup>r</sup>			1.5	1.5	1.5	1.5
	<i>P. aeruginosa</i> EF-OBG6-1 <sup>b</sup>	FQ <sup>r</sup> AG <sup>r</sup> ESC <sup>r</sup> NEM <sup>r</sup> (MBL/IMP-13)			0.7	1.5	1.5	0.7
	<i>P. aeruginosa</i> SC-MDm03-02 <sup>b,c</sup>	FQ <sup>r</sup> AG <sup>r</sup> ESC <sup>r</sup> NEM <sup>r</sup>			3	3	3	1.5
30	<i>P. aeruginosa</i> SC-GMm03-05 <sup>b,c</sup>	FQ <sup>r</sup> AG <sup>r</sup> ESC <sup>r</sup> NEM <sup>r</sup>			1.5	1.5	1.5	1.5
	<i>P. aeruginosa</i> SC-CNm03-07 <sup>b,c</sup>	FQ <sup>r</sup> AG <sup>r</sup> ESC <sup>r</sup> NEM <sup>r</sup>			0.3	1.5	1.5	0.3
35	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13833	Cepa de referencia, silvestre			1.5	1.5	3	1.5
	<i>K. pneumoniae</i> 7086042	FQ <sup>r</sup> AG <sup>r</sup> ESC <sup>r</sup> NEM <sup>r</sup> (MBL/VIM-1)			3	3	3	1.5
	<i>K. pneumoniae</i> C8-27	FQ <sup>r</sup> AG <sup>r</sup> ESC <sup>r</sup> ETP <sup>r</sup> (ESBL/CTX-M-15)			1.5	1.5	1.5	0.7
40	<i>K. pneumoniae</i> FIPP-1	FQ <sup>r</sup> AG <sup>r</sup> ESC <sup>r</sup> NEM <sup>r</sup> (MBL/KPC-3)			3	3	3	1.5
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Cepa de referencia, silvestre			1.5	1.5	1.5	0.7
45	<i>E. coli</i> WO3BG0025	FQ <sup>r</sup> AG <sup>r</sup> ESC <sup>r</sup> (ESBL/CTX-M-15)			0.7	1.5	1.5	0.7
	<i>E. coli</i> WO3AN0048							
50	<i>Proteus mirabilis</i> WO3VA1017	FQ <sup>r</sup> ESC <sup>r</sup> (AmpC/CMY-16)			>24	>24	>24	>96
	<i>Enterobacter aerogenes</i> Wo3BG0067	AGr ESCr (ESBL/SHV-5)			1.5	1.5	1.5	0.7
55	<i>Enterobacter cloacae</i> wO3AN0041	ESCr(ESBL/SHV-12)			1.5	3	1.5	0.7
	<i>Acinetobacter baumannii</i> RUH 134	Cepa de referencia, Clon europeo II			1.5	1.5	1.5	1.5
60	<i>A. baumannii</i> RUH 875	Cepa de referencia, Clon europeo I			3	3	3	1.5
	<i>A. baumannii</i> MR157	FQr AGr ESCrNEMr(OXA/OXA-58)			3	3	3	1.5

	<i>Burkholderia cepacia</i> ORB-99 <sup>b</sup>	silvestre	>24	>24	>24	>24	>96
	<i>Serratia marcescens</i> wO3BG0003	FQr AGr ESCr(ESBL/SHV-12)	>24	>24	>24	>24	>96
5	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Cepa de referencia, PENr	6	6	6	6	96
	<i>S. aureus</i> 3851	MR VANi	6	6	6	6	96

<sup>a</sup> Las cepas probadas incluyeron ya sea cepas de referencia (indicado) o aislados clínicos (en su mayoría muestran un fenotipo MDR); rasgos de resistencia relevantes y mecanismos de resistencia se indican:  $\text{FQ}^r$ , resistentes a las fluoroquinolonas;  $\text{AG}^r$ , resistente a los aminoglucósidos (gentamicina, amikacina, y/o la tobramicina);  $\text{ESC}^r$ , resistentes a las cefalosporinas de amplio espectro;  $\text{NEM}^r$ , resistencia a los carbapenémicos (imipenem y/o meropenem),  $\text{ERT}^r$  resistencia a ertapenem;  $\text{COL}^{\text{NS}}$ , no susceptible a la colistina; BLEE,  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro; MBL, metalo- $\beta$ -lactamasas; OXA, oxacilinas; MR resistente a la meticilina;  $\text{VAN}^i$ , vancomicina-intermedia

<sup>b</sup>Aislados Clínicos de pacientes con fibrosis quística

<sup>c</sup>Fenotipo Mucoide

Los péptidos descritos en la presente invención aparecieron particularmente selectivos para las bacterias Gram negativas, probablemente debido a que se unen fuertemente a LPS, que están constitutivamente presentes sólo en las bacterias Gram negativas. El perfil anfipático, y el gran exceso de cargas positivas de los péptidos, sugiere además que podrían interactuar con las membranas bacterianas y entrar en las células por uno de los mecanismos de acción descritos para péptidos antimicrobianos con estructura similar.

#### Actividad hemolítica de los péptidos tetra-ramificados M33, M34, M35 y M36

La hemólisis de los eritrocitos humanos frescos se determinó usando el método de Parpart, resumido de la siguiente manera. Se construyó una curva de calibración mediante la suspensión de eritrocitos humanos frescos en tampón de fosfato (pH 7.4, fosfato de sodio 110 mM) con diferentes concentraciones de NaCl y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a  $500 \times g$  durante 5 minutos, y la liberación de hemoglobina se controló midiendo la absorbancia de los sobrenadantes a 540 nm. La absorbancia obtenida con NaCl al 0.1% correspondió al 100% de lisis y la obtenida con NaCl al 1%, al 0% de lisis. Péptidos disueltos en PBS se añadieron a la solución de eritrocitos humanos a varias concentraciones. La suspensión resultante se incubó por separado a 37°C durante 2 h y 24 h. La liberación de hemoglobina se controló midiendo la absorbancia del sobrenadante a 540 nm después de la centrifugación y el porcentaje de hemólisis se calculó usando la curva de calibración

Una característica muy importante es que, contrariamente a la mayoría de los péptidos antimicrobianos descritos hasta ahora, los péptidos M33, M34, M35 y M36 muestran un grado de hemólisis prácticamente despreciable (Fig. 2), lo que sugiere su posible uso además a través de las administraciones sistémicas.

#### Neutralización de Lipopolisacárido (LPS)

Se conoce que en las infecciones bacterianas Gram-negativas, la liberación de LPS está implicada en la fisiopatología de la sepsis y el shock séptico. Los péptidos antimicrobianos que además neutralizan eficazmente el LPS son de considerable importancia en la lucha contra la sepsis.

Inicialmente, el M33 tetra-ramificado se analizó en una prueba de *Limulus* de lisado de amebocito (E-Toxato), lo que demuestra su capacidad para neutralizar la gelificación de la muestra debido a LPS (no se muestra). Entonces se examinó para determinar su capacidad para inhibir la secreción de TNF- $\alpha$  inducida por LPS por los macrófagos Raw 264.7. El M33 resultó capaz de bloquear la secreción de TNF- $\alpha$  en una manera dependiente de la dosis cuando los macrófagos fueron estimulados con LPS a partir de *P.aeruginosa* serotipo 10 ATCC27316 (Fig. 3A), y *K. pneumoniae* ATCC15380 (Fig. 3B) con una EC50 de  $4e-8$  M y  $2.6e-7$  M, respectivamente. Cabe destacar que, a una concentración correspondiente a MIC (entre 1.5 y 3  $\mu\text{M}$  para *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*), M33 disminuyó la producción de TNF- $\alpha$  en más de 90% cuando los macrófagos se estimularon con LPS de *P. aeruginosa* y en más de 80% cuando se estimularon con LPS de *K. pneumoniae*. El M33 sólo estimuló una cantidad cuantificable de TNF- $\alpha$  cuando se incubaron con los macrófagos a tres veces la concentración de MIC.

#### Actividad antibacteriana in vivo

El péptido M33 tetra-ramificado se analizó para determinar su actividad antibacteriana en ratones infectados con cantidades letales de bacterias. Se usaron dos especies bacterianas diferentes, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. El menor número de bacterias causantes del 100% de infección letal (LD100) después de la inyección intraperitoneal (ip) fue de  $1.5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1.5 \times 10^7$  para *E. coli* TG1, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y la cepa clínica

MDR *P. aeruginosa* VR143/97, respectivamente. La DL100 bacteriana mató a los ratones en 20-24 horas. Ratones Balb-c se infectaron con la DL100 de bacterias y se trataron 30 minutos más tarde con el péptido por administración ip.

Después de la infección con *E. coli* TG1, el M33 protegió al 100% de los animales de los signos de sepsis y muerte (sobrevivencia de siete días) cuando se administró en una sola dosis a una concentración de 10 mg/Kg (Fig.4A). Después de que los ratones fueron retados con *P. aeruginosa* ATCC 27853, el M33 administrado en una sola dosis a las concentraciones de 25 mg/kg y 12,5 mg/Kg protegió al 75% y 25% de los animales, mientras que a 6.5 mg/Kg no los protegió de la muerte, aunque la muerte se retrasó en comparación con los controles no tratados (Fig.4B). Por último, *P. aeruginosa* VR-143/97, una cepa MDR susceptible sólo a la polimixina B (19) y representativa de un clon actualmente en difusión en Italia (Cornaglia y otros, 2000), se usó para retar ratones. El M33 administrado en una sola dosis a las concentraciones de 25 mg/Kg protegió 100% de los animales (Fig. 4C). A continuación, M33 se analizó para determinar su actividad cuando se administra en dosis múltiples después de la infección con *P. aeruginosa* ATCC 27853. Cuando los ratones se trataron con dos dosis de 5 mg/Kg de M33 cada doce horas (30 min y 12 h después de la infección) la muerte se retrasó. Cuando los ratones se trataron con tres dosis de 5 mg Kg M33 cada doce horas (30 min, 12 h y 24 h después de la infección) se obtuvo plena protección contra los signos de sepsis y el 100% sobrevivió más de siete días después de la infección (Fig. 4D).

El M33 no produjo signos de toxicidad aparente en los animales tratados ip con una dosis del péptido de 100 mg/Kg (no mostrado), 4 veces la dosis informada en este artículo.

la actividad antimicrobiana de M33 in vivo se evaluó además por recuento de bacterias en sangre, líquido peritoneal, bazo e hígado en diferentes momentos después de la infección con la DL100 de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y el tratamiento con una dosis única de M33 a 25 mg/Kg. 18 h después de la infección, la sangre estaba aparentemente libre de las bacterias y los recuentos de bacterias en el líquido peritoneal, el bazo y el hígado fueron significativamente menores que en los controles. Después de 40 horas, todos los sitios del cuerpo muestreados estaban aparentemente libres de bacterias (Tabla 2).

Tabla 2 eficacia de M33 para reducir la carga bacteriana de *P. aeruginosa* en un modelo de sepsis de ratón

Grupos de animales (5 ratones/grupo)	Recuento bacteriano (media ± SD) en:			
	Sangre (CFU/ml)	Peritoneo (CFU/ml)	Bazo (CFU/órgano)	Hígado (CFU/órgano)
Grupos Control <sup>a</sup>	$7.6 \times 10^3 \pm 1.6 \times 10^3$	$3.6 \times 10^6 \pm 1.9 \times 10^6$	$3.5 \times 10^6 \pm 5.1 \times 10^6$	$1.2 \times 10^7 \pm 1.4 \times 10^7$
Grupo M33 18 horas <sup>b</sup>	$<1 \times 10^2$	$1.4 \times 10^4 \pm 3.1 \times 10^4$	$2.4 \times 10^4 \pm 5.3 \times 10^4$	$3 \times 10^5 \pm 6.7 \times 10^5$
Grupo M33 40 horas <sup>c</sup>	$<1 \times 10^2$	$<1 \times 10^2$	$<1 \times 10^2$	$<1 \times 10^2$

<sup>a</sup>Animales moribundos (sacrificados 18h después de la infección) inyectados ip con *P. aeruginosa*  $1 \times 10^7$ CFU/ratón  
<sup>b</sup>Animales inyectados ip con *P. aeruginosa*  $1 \times 10^7$ CFU/ratón, tratados con M33 (25 mg/Kg) y sacrificados 18h después de la infección  
<sup>c</sup>Animales inyectados ip con *P. aeruginosa*  $1 \times 10^7$ CFU/ratón, tratados con M33 (25 mg/Kg) y sacrificados 40h después de la infección

## Bibliografía

- Bracci L, y otros, 2003, J Biol Chem, 278: 46590-5  
 Cornaglia G, y otros, 2000, Clin Infect Dis, 31: 1119-25  
 Falciani C, y otros, 2007, Chem Biol Drug Des, 69: 216-21  
 Hancock RE y Sahl HG, 2006, Nat Biotechnol 24: 1551-7  
 Pini A, y otros, 2005, Antimicrob Agents Chemother, 49: 2665-72  
 Pini A, y otros, 2007, J Pept Sci, 13: 393-9  
 Wenzel RP y Edmond MB, 2000, N Engl J Med 343:1961-3  
 Zasloff M. 2002, Nature, 415:389-95

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Università degli Studi di Siena BRACCI, Luisa PINI, Alessandro FALCIANI, Chiara  
 <120> Secuencias peptídicas, su forma ramificada y uso de estas para aplicaciones antimicrobianas  
 <130> PCT107479

10 <150> US61/102,854  
 <151> 2008-10-05  
 <160> 5

15 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 9  
 <212> PRT

20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

25 <400> 1  
 Lys Lys Ile Arg Val Arg Leu Ser Ala  
 1 5

30 <210> 2  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 2  
 Arg Arg Ile Arg Val Arg Leu Ser Ala  
 1 5

40 <210> 3  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 3  
 Lys Arg Ile Arg Val Arg Leu Ser Ala  
 1 5

55 <210> 4  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 4

Arg Lys Ile Arg Val Arg Leu Ser Ala  
1 5

5

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Péptido sintético

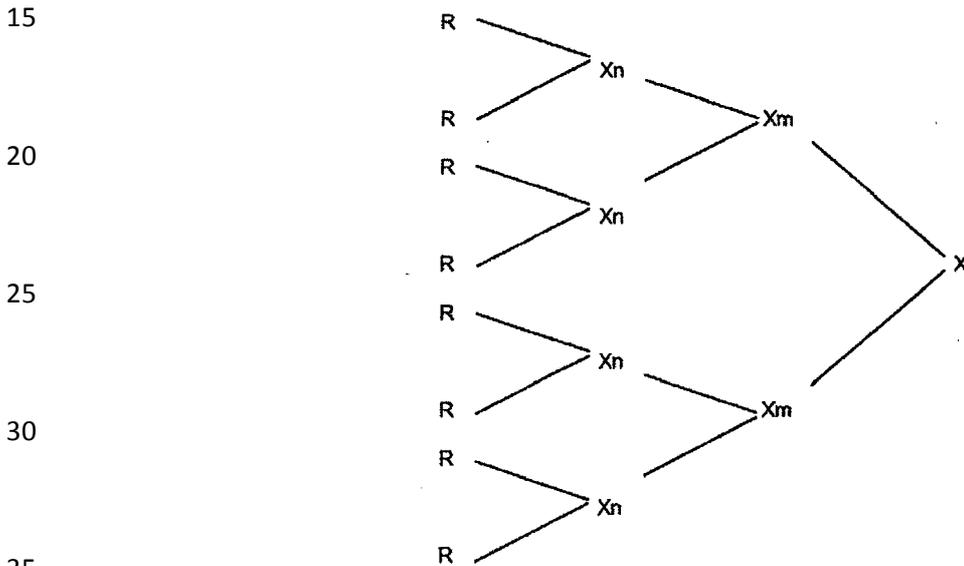
<400> 5

15

Gln Lys Lys Ile Arg Val Arg Leu Ser Ala  
1 5 10

Reivindicaciones

1. Un péptido antibacteriano que tiene del terminal amino al carboxílico una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de: KKIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 1, RRIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 2, KRIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 3, RKIRVRLSA, sec. con núm. de ident. 4.
2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 que es de forma lineal.
3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 2, multimerizado en un esqueleto de poliacrilamina, en un esqueleto de unidades de dextrano o un esqueleto de unidades de etilenglicol.
4. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que está en forma de Péptidos de Múltiples Antígenos (MAP), con la siguiente fórmula:



en la cual R es el péptido como se reivindica en la reivindicación 1; X es una molécula trifuncional; m = 0 o 1; n = 0 o 1; cuando m y n son 0 el péptido es un dímero; cuando m=1 y n=0 el péptido es un tetrámero, cuando m=1 y n=1 el péptido es un octámero.

5. El péptido MAP de acuerdo con la reivindicación 4, en donde X es una unidad trifuncional.
6. El péptido MAP de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la unidad trifuncional comprende al menos dos grupos amino funcionales.
7. El péptido MAP de acuerdo con la reivindicación 6, en donde X es lisina, ornitina, norlisina o amino alanina.
8. El péptido MAP de acuerdo con la reivindicación 4, en donde X es ácido aspártico o ácido glutámico.
9. El péptido MAP de acuerdo con la reivindicación 4, en donde X es propilenglicol, ácido succínico, derivado de diisocianatos o diaminas.
10. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso médico.
11. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes como un fármaco antibacteriano.
12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente aceptable y eficaz del péptido de acuerdo con la reivindicación 10 u 11.
13. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en forma de una solución para inyectar en individuos para uso sistémico.

14. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en forma de una solución para inyectar como agente desintoxicante para la neutralización de LPS.
- 5 15. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en forma de un lavado para los ojos, enjuague bucal, pomada o solución para uso tópico.
- 10 16. Una preparación desinfectante y/o detergente con actividad antibacteriana que comprende el péptido de acuerdo con la reivindicación 1 a 11.
17. Uso del péptido de acuerdo con la reivindicación 1 a 11 como un conservante para la preparación de productos alimenticios y/o de productos cosméticos y/o de productos homeopáticos.

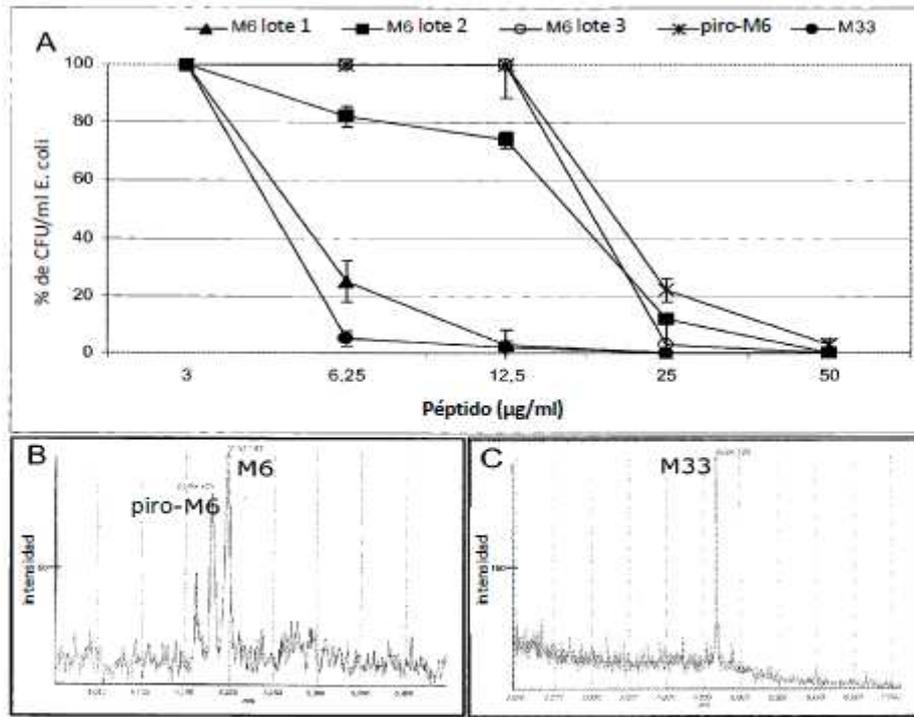


Fig. 1

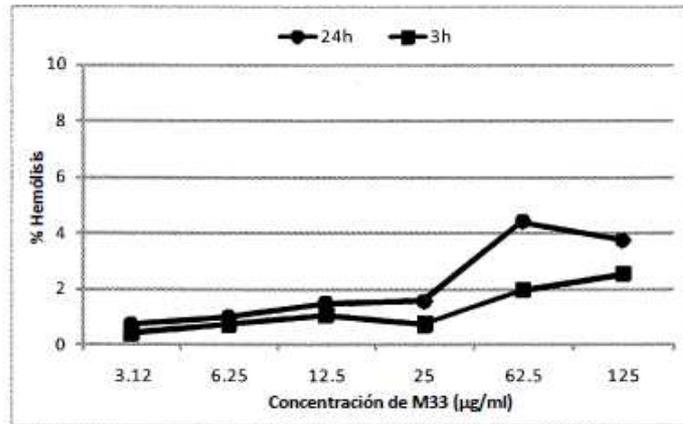


Fig. 2

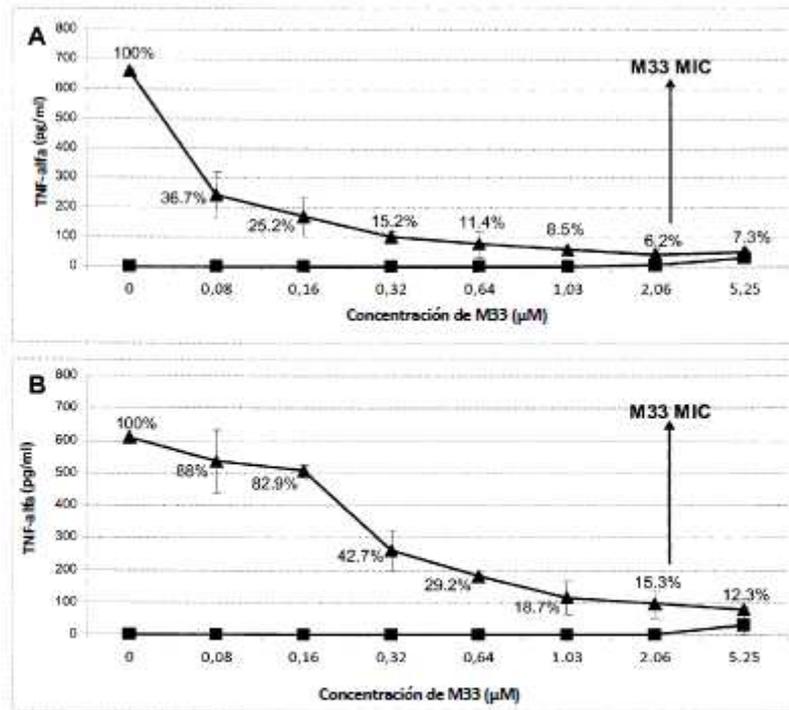


Fig. 3

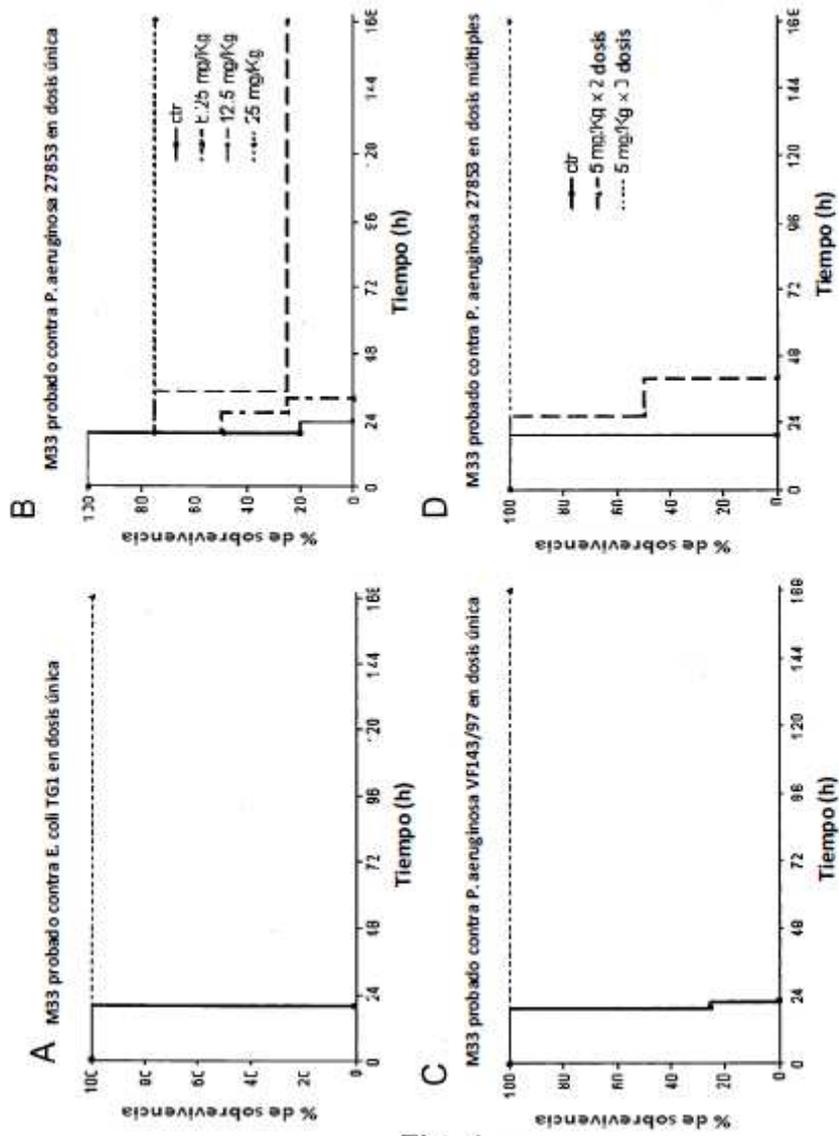


Fig. 4