(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 621 261**

(51) Int. CI.:

G01N 33/84 (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2013 PCT/EP2013/073109**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14072313**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2013 E 13786487 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2917740**

(54) Título: **Péptido que puede emplearse en productos para recubrimiento, promotores de adhesión o adhesivos para superficies oxidadas**

(30) Prioridad:

07.11.2012 DE 102012110664

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2017

(73) Titular/es:

HENKEL AG & CO. KGAA (100.0%)
Henkelstrasse 67
40589 Düsseldorf, DE

(72) Inventor/es:

TADEN, ANDREAS;
VEITH, BIRGIT;
BREVES, ROLAND;
SCHMIDT, IRMGARD;
WEBER, THOMAS;
JOSE, JOACHIM y
REICHENEDER, CLAUDIA

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Péptido que puede emplearse en productos para recubrimiento, promotores de adhesión o adhesivos para superficies oxidadas

La invención se refiere a productos para recubrimiento, promotores de adhesión o adhesivos, para superficies oxidadas, que contienen péptidos, principalmente dodecapéptidos, a un material composite de varias capas o un sustrato recubierto que contiene compuestos que se componen completamente o parcialmente de dodecapéptidos como promotores de adhesión entre al menos dos capas adyacentes del material composite o entre el recubrimiento y el sustrato, así como a dodecapéptidos que pueden emplearse en calidad de productos de recubrimiento, promotores de adhesión o adhesivos para superficies oxidadas.

En el campo del recubrimiento o del barnizado de superficies oxidadas, los métodos conocidos para promover la adhesión incluyen, por ejemplo, compuestos bifuncionales de organosilanos que producen un enlace químico entre la matriz polimérica del barniz y el sustrato inorgánico. Una desventaja de estos promotores de adhesión consiste, entre otras cosas, en que sólo se garantiza una adhesión óptima si en la superficie del sustrato se encuentran grupos de hidróxido con los cuales puede interactuar el silano. En muchos casos se necesita un pre-tratamiento complicado del sustrato para la silanización de superficies. La fabricación de materiales hechos a la medida también es muy complicada y, además, no se conocen materiales hechos a la medida para todos los sustratos.

Las monocapas auto-ensambladas (abreviatura SAMs por Self-Assembled Monolayers) ya han sido investigadas y descritas desde 1940, pero solamente en 1983 se ha comenzado a utilizar industrialmente este procedimiento de organización.

Las monocapas auto-ensambladas tienen teóricamente dos grupos activos diferentes, entre los cuales hay un grupo espaciador, por ejemplo un espaciador alifático. Un grupo de los mismos interactúa con la superficie y el otro grupo extremo interactúa con una propiedad especial o se enlaza con otro compuesto funcional. Las SAMs forman enlaces químicos que pueden resistir el ataque por parte del agua y simultáneamente pueden impedir todas las reacciones electroquímicas en las capas intermedias. La autoorganización de las capas mono-moleculares sobre la superficie sólida ofrece un procedimiento racional para la preparación de una capa intermedia con una composición, estructura y espesor definidos. Los promotores de adhesión que se auto-organizan selectivamente tienen la ventaja de garantizar la adhesión de las capas de barniz y de adhesivo sobre las superficies metálicas por largos tiempos de vida útil, tal como se requiere, por ejemplo, en el sector de los automóviles para un mejoramiento adicional de la protección ante la corrosión. Además, hacen posible una buena adhesión uniforme de una capa de barniz homogénea sobre los materiales composite de trabajo, que se emplean cada vez más, con diferentes superficies tales como los materiales de trabajo compuestos de plástico-metal.

Las monocapas que se auto-organizan se emplean, por ejemplo, en la tecnología de semiconductores para estabilización superficial y funcionalización hecha a la medida de electrodos. Dependiendo de la longitud de las cadenas de alquilo usadas, en este caso se ven afectadas la permeabilidad y la velocidad de transferencia de carga. El campo de aplicación de las monocapas que se auto-organizan es muy amplio. Entre otras, la técnica de la monocapa que se auto-organiza se usa en el microscopio electroquímico de barrido con efecto de túnel, en las investigaciones celulares, en sistemas defensores y en la nanoelectrónica. Sin embargo, la generación de las SAMs descritas en el estado de la técnica es complicada y costosa.

El acoplamiento de un sustrato inorgánico con componentes biológicos para la modificación de las propiedades superficiales es conocido en la biomimética. Los bacteriófagos, seleccionados de una biblioteca de fagos, que presentan péptidos cortos, han sido usados por ejemplo para precipitar y separar materiales inorgánicos (WO2003/078451). Los materiales híbridos compuestos de un sustrato inorgánico y ligandos específicos de péptido también se usan como solución potencial para modificar la superficie del sustrato. La identificación del ligando biológico (habitualmente un péptido) que se adapta al sustrato es una práctica corriente. De esta manera, por ejemplo, se conocen una gran cantidad de dodecapéptidos que se adhieren a las superficies oxidadas (Baneyx et al, CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, 18(4), 2007, páginas 312-317; Sarikaya et al, ANNUAL REV MATER RES, 34, 2004, 373-408; WO2003/078451; WO2009/079053; JP2006/225294; WO2010/000493; Thai et al, BIOTECHNOL BIOENG, 87(2), 2004, 129-137). Sin embargo, la identificación consume tiempo y es costosa y hasta ahora ha sido un obstáculo para una aplicación concreta. El concepto de un ligando bifuncional para enlazar dos componentes inorgánicos ha sido abordado en el estado de la técnica. De manera concreta, el enlace de células o de biomoléculas a un sustrato de polímero, principalmente a polipirrol enriquecido con cloro (PPyCl) oxidado o poli(lactato-co-glicolato) (PLGA), mediante bacteriófagos con propiedades bifuncionales de enlace, ha sido descrita en el documento WO2004/035612, por ejemplo. El otro enlace con otra sustancia, que como un material de recubrimiento, por ejemplo, no es contraparte biológica de enlace del fago usado, no se describe detalladamente y este enlace igualmente tendría que efectuarse selectivamente y requeriría una adaptación exacta del ligando a los otros componentes de enlace.

Por lo tanto, existe una necesidad grande de proporcionar nuevos compuestos que sean adecuados para usar sobre superficies oxidadas, que eviten las desventajas mencionadas del estado de la técnica.

De modo sorprendente se ha encontrado que determinados dodecapéptidos pueden emplearse ventajosamente como productos de recubrimiento, promotores de adhesión o adhesivos para superficies oxidadas.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es un dodecapéptido con la secuencia de aminoácidos listada como péptido 7 en la tabla 2.

Otro objeto de la presente invención son ácidos nucleicos que codifican el péptido de la invención, principalmente la secuencia de ácido nucleico listada en la tabla 3.

En el contexto de la presente invención puede entenderse por un péptido a un polímero estructurado linealmente en gran medida, compuesto de los aminoácidos naturales, el cual es más pequeño que una proteína natural. En la presente solicitud, los 19 aminoácidos L, proteinogénicos, que existen naturalmente, son denominados con el código de 1 y 3 letras que es utilizado internacionalmente.

El dodecapéptido de la invención puede prepararse únicamente mediante procedimientos conocidos en la síntesis de péptidos, por ejemplo por medio de síntesis en fase sólida de acuerdo con Merrifield.

Sin embargo, se prefiere preparar el péptido de la invención por medio de procedimientos recombinantes que se basan en que los genes para los péptidos de interés se introducen en un organismo hospedero adecuado para la producción y a partir de éste se transcriben y se traducen. La introducción de los genes en cuestión se efectúa de manera adecuada por medio de vectores, principalmente vectores de expresión; pero también por medio de aquellos que provocan que el gen de interés en el organismo hospedero pueda insertarse en un elemento genético ya presente, tal como el cromosoma u otros vectores. La unidad funcional de gen y promotor y de otros elementos genéticos eventuales se denomina casete de expresión de acuerdo con la invención. Sin embargo, para esto el casete de expresión no tiene que estar presente necesariamente como una unidad física.

De manera particularmente preferida, el péptido de la invención puede prepararse como un multímero y disociarse a continuación en los péptidos funcionales. Los multímeros muy particularmente preferidos tienen 2 a 10 dodecapéptidos que están separados entre sí respectivamente por espaciadores de 0 a 4 aminoácidos de longitud. Estos espaciadores pueden estar compuestos de los aminoácidos Gly, Ala y Ser.

Un especialista conoce en la actualidad métodos como, por ejemplo, la síntesis química o la reacción en cadena de polimerasa (PCR) en unión con métodos estándar de biología molecular y/o de química de proteínas, por medio de secuencias conocidas de ADN y/o de aminoácidos para preparar los ácidos nucleicos correspondientes, incluso hasta los genes completos. Los métodos de este tipo se conocen, por ejemplo, del "Lexikon der Biochemie", editorial Spektrum Akademischer Verlag, Berlín, 1999, volumen 1, páginas 267-271 y volumen 2, páginas 227-229.

La presente invención también comprende derivados del péptido de la invención. En el contexto de la presente solicitud, por derivados se entienden aquellos péptidos cuya cadena pura de aminoácidos ha sido modificada químicamente. Tales derivaciones pueden efectuarse biológicamente, a manera de ejemplo, en conexión con la biosíntesis por parte del organismo hospedero. Para este propósito pueden emplearse métodos de biología molecular. Pero también pueden realizarse químicamente, por ejemplo mediante la conversión química de una cadena lateral de un aminoácido o mediante enlace covalente de otro compuesto al péptido. Un compuesto de este tipo también puede ser, por ejemplo, otros péptidos o proteínas que se enlazan a los péptidos de la invención, por ejemplo, por medio de compuestos químicos bifuncionales. Asimismo, por derivación puede entenderse el enlace covalente a un soporte macromolecular.

En el contexto de la presente invención, por vectores se entienden elementos que se componen de ácidos nucleicos los cuales contienen un gen de interés como zona distintiva de ácido nucleico. Los vectores permiten establecer este gen como un elemento genético estable que se replica independientemente del resto del genoma en una especie o una línea celular por varias generaciones o divisiones celulares. Principalmente al usar en bacterias, los vectores son plásmidos especiales, es decir elementos genéticos circulares. En la ingeniería genética, por una parte se distingue entre tales vectores que sirven para el almacenamiento y, por lo tanto, en cierta medida también para el trabajo de ingeniería genética, los denominados vectores de clonación, y por otra parte aquellos que cumplen la función de realizar el gen de interés en la célula hospedera; es decir, hacen posible la expresión del péptido en cuestión. Estos vectores se denominan vectores de expresión.

El ácido nucleico que codifica para un péptido según la invención, principalmente un dodecapéptido o un multímero de un péptido de este tipo, es clonado de manera adecuada en un vector. La dimensión molecular-biológica de la invención consiste, por lo tanto, en vectores con los genes para los péptidos correspondientes. Estos pueden incluir, por ejemplo, aquellos que se derivan de plásmidos bacterianos, de virus o de bacteriófagos, o de modo preponderante vectores o plásmidos sintéticos con elementos de la más diferente procedencia. Con los otros elementos genéticos respectivamente presentes, los vectores son capaces de establecerse en las células hospederas en cuestión, por varias generaciones como unidades estables. En el sentido de la invención, es irrelevante si se establecen de modo extracromosómico como unidades propias o se integran a un cromosoma. Cuál

de los numerosos temas conocidos del estado de la técnica se elige, depende del caso particular. Por ejemplo, el número de copias que puede lograrse, los sistemas disponibles, entre éstos ante todo las resistencias a antibióticos, o la capacidad de cultivo de las células hospederas capaces de alojar los vectores pueden ser factores decisivos.

Los vectores forman productos de partida adecuados para investigaciones en biología molecular y en bioquímica del gen en cuestión o del péptido asociado y para desarrollos de acuerdo con la invención, y por último para la amplificación y producción de péptidos según la invención. Éstos representan otras formas de realización de la presente invención.

Formas preferidas de realización de la presente invención son vectores de clonación. Además del almacenamiento, la amplificación biológica o la selección del gen de interés, éstos son adecuados para la caracterización del gen en cuestión, por ejemplo por medio de la elaboración de un mapa de restricción o de la secuenciación. Por eso, los vectores de clonación también son formas preferidas de realización de la presente invención, porque representan una forma transportable y almacenable del ADN reivindicado. También son puntos de partida preferidos para técnicas de biología molecular que no están unidas con células, como la reacción en cadena de polimerasa, por ejemplo.

Los vectores de expresión son químicamente similares a los vectores de clonación, pero se diferencian en aquellas secuencias parciales que permiten que los vectores de expresión se repliquen en el organismo hospedero, optimizado para la producción de péptidos y que expresen el gen contenido allí. Las formas preferidas de realización son vectores de expresión que llevan elementos genéticos necesarios para la expresión. La expresión se ve influenciada, por ejemplo, por promotores que regulan la transcripción del gen. De esta manera, la expresión puede efectuarse por medio del promotor natural que se localiza originalmente antes de este gen, pero también después de la función genética, tanto mediante un promotor de la célula hospedera, suministrado en el vector de expresión, como también mediante un promotor modificado u otro completamente diferente, de otro organismo.

Formas preferidas de realización son aquellos vectores de expresión que son regulables mediante modificaciones de las condiciones de cultivo o la modificación de compuestos determinados, como por ejemplo la densidad celular o factores especiales.

Formas de realización de la presente invención también pueden ser sistemas de expresión libres de células, en los cuales puede hacerse en seguimiento y vitro a la biosíntesis de péptido. Sistemas de expresión de este tipo están igualmente establecidos en el estado de la técnica.

La síntesis in vivo de un péptido de la invención, es decir por medio de células vivientes, requiere la transferencia del gen asociado a una célula hospedera, a su denominada transformación. Como células hospederas son adecuadas teóricamente todos los organismos, es decir procariotas, eucariotas o cianófitas. Se prefieren aquellas células hospederas que permiten manejarse genéticamente de modo fácil, lo cual concierne por ejemplo a la transformación con el vector de expresión y a su establecimiento estable, por ejemplo bacterias u hongos unicelulares. Además, las células hospederas preferidas se distinguen por una buena capacidad de manejo microbiológico o biotecnológico. Esto se refiere, por ejemplo, a una capacidad de cultivo fácil, altas tasas de crecimiento, bajos requisitos para los medios de fermentación y buenas tasas de producción y de secreción para péptidos ajenos. Con frecuencia, por la abundancia de sistemas diferentes, disponibles según el estado de la técnica, los sistemas de expresión óptimos tienen que determinarse experimentalmente para el caso particular. Cada péptido de la invención puede obtenerse de esta manera a partir de una gran cantidad de organismos hospederos.

Son formas preferidas de realización aquellas células hospederas que debido a elementos genéticos de regulación que están disponibles, por ejemplo, en el vector de expresión, pero también están presentes en estas células desde el principio, son regulables en su actividad. A manera de ejemplo, mediante adición controlada de compuestos químicos que sirven como activadores, mediante modificación de las condiciones de cultivo o al lograr una densidad celular determinada, éstas pueden inducirse para la expresión. Esto permite una producción muy económica de los péptidos de interés.

Las células hospederas preferidas son células procariotas o bacterianas. Por lo regular, las bacterias se distinguen, frente a las eucariotas, por tiempos más breves de generación y exigencias menores a las condiciones de cultivo. De esta manera pueden establecerse procedimientos favorables en costes para la obtención de péptidos de la invención. En el caso de bacterias gram-negativas, como por ejemplo *E. coli*, se secreta una gran cantidad de péptidos al espacio periplasmático, es decir al compartimiento entre las dos membranas que envuelven las células. Esto puede ser ventajoso para aplicaciones especiales. Las bacterias gram-positivas, como por ejemplo los bacilos o los actinomicetos y otros representantes de los actinomicetales, por lo contrario no poseen membrana exterior, de modo que los péptidos secretados se entregan inmediatamente al medio nutriente que rodea las células, a partir del cual, según otra realización preferida, los péptidos de la invención expresados pueden purificarse directamente.

Una variante de este principio experimental son los sistemas de expresión en los cuales genes adicionales, por ejemplo aquellos que están disponibles en otros vectores, influyen la producción de péptidos de la invención. Estos

pueden ser productos genéticos modificados o aquellos que deben purificarse conjuntamente con el péptido de la invención.

Debido a la extensa experiencia que se tiene por ejemplo respecto de los métodos de biología molecular y de la capacidad de cultivo con bacterias coliformes, estos son formas preferidas de realización de la presente invención. De modo particularmente preferido son aquellos de la especie *Escherichia coli*, principalmente cepas no patógenas, adecuadas para la producción biotecnológica.

Representantes apropiados de estas especies son los derivados de K12 y las cepas B de *Escherichia coli*. Las cepas que pueden derivarse de estas de acuerdo con métodos genéticos y/o de biología molecular conocidos per se, y que de esta manera pueden considerarse sus derivados, tienen la más grande importancia para trabajos genéticos y microbiológicos y se emplean preferiblemente para el desarrollo de procedimientos según la invención. Tales derivados pueden modificarse, por ejemplo, mediante mutagénesis de supresión o de inserción respecto de sus requerimientos para las condiciones de cultivo; pueden tener otros o adicionales marcadores de selección o pueden expresar otros o adicionales péptidos. Principalmente puede tratarse de aquellos derivados que expresan otros péptidos económicamente interesantes, adicionalmente al péptido preparado de acuerdo con la invención.

También se prefieren aquellos microorganismos que se caracterizan porque han sido obtenidos después de la transformación con uno de los vectores antes descritos. En este caso puede tratarse, por ejemplo, de vectores de clonación que han sido introducidos en una cepa cualquiera de bacterias para el almacenamiento y/o la modificación. Dichos pasos son comúnmente difundidos en el almacenamiento y en la evolución de los elementos genéticos en cuestión. Puesto que a partir de estos microorganismos, los elementos genéticos en cuestión pueden transferirse directamente a bacterias gram-negativas adecuadas para la expresión, los productos de transformación antes descritos también son realizaciones del objeto de la invención en cuestión.

Las células eucariotas también pueden ser adecuadas para la producción de péptidos de la invención. Ejemplos de esto son hongos como los actinomicetos o levaduras como *Saccharomyces* o *Kluyveromyces*. Esto puede ser entonces particularmente ventajoso, a manera de ejemplo, si los péptidos en conexión con su síntesis deben experimentar modificaciones específicas que hacen posible sistemas de este tipo. Esto incluye, por ejemplo, el enlace de compuestos con bajo peso molecular común anclas de membrana u oligosacáridos.

Las células hospederas del procedimiento de la invención son cultivadas y fermentadas de una manera conocida per se, por ejemplo en sistemas discontinuos o continuos. En el primer caso se inocula un medio nutriente adecuado con las cepas bacterianas recombinantes y del medio se cosecha el producto después de un lapso a determinar experimentalmente. Las fermentaciones continuas se caracterizan por lograr un estado de equilibrio en el cual las células mueren parcialmente después de un lapso comparativamente largo, pero también vuelven a crecer y es posible retirar simultáneamente el producto del medio.

Los procedimientos de fermentación son bien conocidos per se del estado de la técnica y representan el propio paso de producción a gran escala industrial; seguido de un método de purificación adecuado.

Todos los procedimientos de fermentación que se basan en uno de los procedimientos antes expuestos para la preparación de los péptidos recombinantes representan de manera correspondiente formas preferidas de realización de este objeto de la invención.

A este respecto, las condiciones óptimas respectivas para los procedimientos de preparación empleados, para las células hospederas y/o los péptidos a prepararse tienen que determinarse experimentalmente por medio de las condiciones de cultivo previamente optimizadas de las cepas en cuestión de acuerdo con el conocimiento del especialista, por ejemplo respecto del volumen de fermentación, la composición del medio, el suministro de oxígeno o la velocidad de agitación.

Los procedimientos de fermentación, que se caracterizan porque la fermentación se realiza por medio de una estrategia de alimentación, también se toman en consideración. A este respecto, los componentes del medio, que se consumen por el cultivo continuo, se reponen por alimentación; también se habla de una estrategia de reposición por alimentación. De esta manera puede lograrse un incremento significativo tanto en la densidad celular como en la biomasa seca y/o ante todo de la actividad del péptido de interés.

De manera análoga, la fermentación también puede diseñarse de tal manera que se filtren los productos metabólicos no deseados o se neutralicen adicionando un regulador de pH o contra-iones apropiados respectivamente.

El péptido preparado puede cosecharse posteriormente del medio de fermentación. Este procedimiento de fermentación es preferido frente a la preparación de producto a partir de la masa seca aunque requiere el suministro de marcadores de secreción y de sistemas de transporte.

Sin secreción, en ciertas circunstancias se requiere la purificación del péptido de la masa celular, incluso se conocen diferentes procedimientos para esto, tales como precipitación, por ejemplo, mediante sulfato de amonio o etanol, o

purificación cromatográfica, cuando se requiere hasta la homogeneidad. Sin embargo, la mayoría de los procedimientos industriales descritos debe manejarse con una preparación enriquecida, estabilizada.

Todos los elementos ya descritos antes pueden combinarse en un procedimiento con el fin de preparar los péptidos de la invención. En este caso, para cada péptido de la invención es concebible una gran cantidad de posibilidades de combinación de los pasos procedimentales. El procedimiento óptimo tiene que determinarse experimentalmente para cada caso individual concreto.

Otros objetos de la presente invención se refieren a los ácidos nucleicos que codifican el péptido de la invención y a los vectores de clonación y a los vectores de expresión que contienen un ácido nucleico que codifica el péptido de la invención.

También son objetos de la presente invención células procariotas o eucariotas que han sido transformadas con un ácido nucleico que codifica el péptido de la invención.

El dodecapéptido de la invención puede emplearse de manera ventajosa en productos de recubrimiento, barnices y pinturas, promotores de adhesión o adhesivos para superficies oxidadas. Otros objetos de la presente invención son, por lo tanto, productos de recubrimiento, barnices y pinturas, promotores de adhesión y adhesivos para superficies oxidadas que contienen el dodecapéptido de la invención, o que se componen de éste.

Otro objeto de la presente invención es, además, un material composite de varias capas o un sustrato recubierto, que contienen compuestos que están estructurados total o parcialmente del dodecapéptido en calidad de promotor de adhesión entre al menos dos capas adyacentes del material composite, o entre el recubrimiento y el sustrato.

Los materiales composite de varias capas se emplean para los más diversos propósitos, por ejemplo como productos de empaque (principalmente láminas de material composite) o artículos auto-adhesivos (material compositor de varias capas de al menos soporte y capa de adhesivo). Los materiales composite de varias capas según la invención contienen al menos dos, de preferencia dos a cinco capas, en cuyo caso las capas individuales pueden tener un espesor de, por ejemplo, 0,01 a 5 mm.

Las capas individuales tienen superficies oxidadas y contienen preferiblemente metal u óxidos de metal. Las capas son principalmente láminas metálicas o láminas poliméricas metalizadas.

Entre al menos dos capas adyacentes del material composite de varias capas, el péptido antes mencionado se usa como promotor de adhesión. Preferiblemente, al menos una de las capas adyacentes es una capa hecha de un polímero natural o sintético metalizado. Como polímeros se consideran principalmente policondensados tales como poliésteres, poliaductos tales como poliuretanos, poliamidas, policarbonatos o poli(éteres de fenileno) o poli(sulfuros de fenileno) o polímeros que pueden obtenerse mediante polimerización por radicales libres o polimerización iónica de compuestos etilénicamente insaturados (denominados abreviadamente polímeros radicales). Polímeros radicales de este tipo se componen preferiblemente en al menos 60% en peso, de modo particularmente preferido en al menos 80% en peso, de los denominados monómeros principales, seleccionados de (met)acrilatos de alquilo de C1 a C20, ésteres de vinilo de ácidos carboxílicos que contienen hasta 20 átomos de C, nitrilos etilénicamente insaturados, haluros de vinilo, éteres de vinilo de alcoholes que contienen 1 a 10 átomos de C, hidrocarburos A linfáticos con 2 a 8 átomos de C y uno o dos enlaces dobles, principalmente etileno y propileno.

La cantidad necesaria para la promoción de adhesión generalmente es de 0,01 a 1000 mg (miligramos/m^2 (metro cuadrado), principalmente de 0,01 a 100 mg/m^2 y de manera particularmente preferida de 0,1 a 10 mg/m^2. El dodecapéptido de la invención puede aplicarse a una de las capas adyacentes, como alternativa el péptido también puede aplicarse a ambas capas.

El péptido se presenta preferiblemente como una solución acuosa; el contenido de péptido de la solución es preferiblemente de 0,01 a 5 partes en peso de por 100 partes en peso de agua. Para los usos de acuerdo con la invención en productos de recubrimiento, promotores de adhesión o adhesivos para superficies oxidadas, la solución se diluye preferiblemente, aún más, a una concentración de 1 a 10000 µg/ml de agua, principalmente 10 a 1000 µg/ml de agua.

Después de la aplicación, por lo tanto, primero puede efectuarse un secado para retirar el agua. Después pueden unirse las dos capas adyacentes mediante métodos habituales, un ejemplo mediante laminación.

Los sustratos se recubren para los más diversos propósitos. Principalmente pueden mencionarse recubrimientos decorativos o recubrimientos protectores (en resumen, barnizados) o también recubrimientos de adhesivos, en cuyo caso el adhesivo puede aplicarse como tal sobre el sustrato o pegarse, por ejemplo, en forma de un artículo autoadhesivo (etiqueta o cinta adhesiva). El sustrato o la superficie del sustrato pueden estar compuestos de un material cualquiera. El recubrimiento con la superficie del recubrimiento por el lado del sustrato igualmente puede estar compuesto de un material cualquiera. De preferencia, la superficie del sustrato o el recubrimiento, la superficie

por el lado del sustrato del recubrimiento, se componen de metal, digitalmente de acero, o de polímeros naturales o sintéticos metalizados.

Como polímeros se consideran principalmente policondensados tales como poliésteres, poliaductos como poliuretanos, poliamidas, policarbonatos o poli(éteres de fenileno) o poli (sulfuros de fenileno) o polímeros que pueden obtenerse mediante polimerización por radicales libres o polimerización iónica de compuestos etilénicamente insaturados (denominados brevemente polímeros radicales). Para la estructura de los polímeros radicales contenido de monómeros principales se aplica lo dicho anteriormente.

La cantidad del péptido que es necesaria para la promoción de adhesión corresponde a la cantidad indicada antes. El péptido puede aplicarse sobre la superficie de sustrato, sobre la superficie del lado del sustrato del recubrimiento o sobre ambas. El péptido se presenta preferiblemente como una solución acuosa; el contenido de la solución es tal como se indicó antes. Después de aplicar, por lo tanto, primero puede efectuarse un secado para retirar el agua.

El recubrimiento puede aplicarse sobre el sustrato de acuerdo con métodos habituales; las láminas o los materiales composite de varias capas pueden plastificarse, por ejemplo. El recubrimiento puede prepararse principalmente aplicando una dispersión de polímero, una solución de polímero o un polímero libre de solvente sobre la superficie del lado del sustrato provista con el promotor de adhesión y a continuación creando una película y/o curando térmica o fotoquímicamente. Principalmente, el polímero se presenta para esto en forma de una dispersión o solución acuosa; de modo particularmente preferido se trata de una dispersión acuosa de un polímero en emulsión, de preferencia un polímero radical descrito antes. Después de aplicar el polímero se efectúa luego, dado el caso, un secado.

Los materiales composite de varias capas y los sustratos recubiertos según la invención tienen una resistencia ostensiblemente elevada. El recubrimiento se adhiere usando el péptido como promotor de adhesión de manera más fuertes sobre el sustrato y las capas individuales del material composite de varias capas se adhieren mejor unas a otras.

En una forma de realización secularmente preferida de la invención, el sustrato es un metal. En teoría, puede ser un metal cualquiera. Los ejemplos comprenden hierro, acero, zinc, estaño, aluminio, cobre o aleaciones de estos metales entre sí, así como con otros metales. Principalmente puede ser acero, acero recubierto con zinc, con aleaciones de zinc, con aluminio o aleaciones de aluminio o puede ser aluminio o aleaciones de aluminio. De modo particularmente preferido son zinc o aleaciones de zinc o sustratos con estos, tales como, por ejemplo, acero galvanizado.

Aleaciones de Zn o de Al son conocidas por el especialista. Según el propósito de aplicación deseado, el especialista selecciona el tipo y la cantidad de componentes de la aleación. Componentes típicos de aleaciones de zinc comprenden principalmente Al, Pb, Si, Mg, Sn, Cu o Cd. Componentes típicos de las aleaciones de aluminio comprenden principalmente Mg, Mn, Si, Zn, Cr, Zr, Cu o Ti. También puede tratarse de aleaciones de Al/Zn, en las cuales Al y Zn se encuentran presentes en aproximadamente la misma cantidad. Acero recubierto con aleaciones de este tipo se encuentra comercialmente disponible.

Los metales pueden estar presentes en cualquier forma, pero preferiblemente son láminas metálicas, cintas metálicas o chapas metálicas. El metal también puede ser un material composite con una superficie metálica. Por ejemplo puede ser un material composite hecho de una lámina polimérica y de un metal.

Las superficies oxidadas, preferiblemente metálicas se recubren con el péptido de la invención en calidad de promotor de adhesión. Esto puede efectuarse con una solución acuosa del péptido. Las particularidades del recubrimiento se mencionaron ya previamente.

El recubrimiento puede ser principalmente barnices o sistemas de barniz típicos para el recubrimiento de superficies metálicas. Puede tratarse de barnices que curan térmicamente, fotoquímicamente o según otros mecanismos.

Barnices típicos para el recubrimiento de superficies metálicas comprenden al menos un aglutinante así como componentes capaces de reticularse. Los componentes reticulables pueden ser agentes de reticulación que se emplean adicionalmente a un aglutinante o pueden ser grupos reticulables que se unen con el aglutinante. Obviamente el aglutinante también puede tener grupos reticulables y emplearse adicionalmente como agentes de reticulación. En este caso también son concebibles diferentes posibilidades de combinación. A manera de ejemplo, los aglutinantes y agentes de reticulación pueden emplearse separados unos de otros. El aglutinante comprende entonces grupos funcionales reactivos que pueden reaccionar con grupos funcionales reactivos complementarios en los agentes de reticulación. Como alternativa, puede tratarse de aglutinantes auto-reticulantes, que comprenden grupos funcionales reactivos, los cuales pueden participar en reacciones de reticulación con grupos de su tipo ("consigo mismos") o con grupos funcionales reactivos complementarios en el mismo polímero. También es posible que sólo los agentes de reticulación reaccionen entre sí.

Ejemplos de aglutinantes adecuados comprenden (co)polímeros de (met)acrilato, poli(ésteres de vinilo) parcialmente saponificados, poliésteres, resinas alquídicas, polilactonas, policarbonatos, poliéteres, productos de adición de resina epóxica-amina, poliurea, poliamidas, poliimidas o poliuretanos. Obviamente también pueden emplearse mezclas de diferentes polímeros, siempre que no surjan efectos no deseados por la mezcla. Los componentes que van a reticularse pueden presentar grupos que se reticulan térmicamente o grupos que se reticulan fotoquímicamente. Los agentes de reticulación térmica adecuados son, por ejemplo, agentes de reticulación a base de epóxidos, de melamina o de isocianatos bloqueados. Agentes de reticulación adecuados para la reticulación fotoquímica son principalmente compuestos con varios grupos etilénicamente insaturados, principalmente acrilatos di- o polifuncionales.

La adhesión del barniz sobre el sustrato se mejora ventajosamente por el péptido de la invención. Además, en los ensayos de protección frente a la corrosión, también se logra una estabilidad mejorada frente a la infiltración de la capa de barniz.

Otro objeto de la presente invención es, por lo tanto, el uso del péptido de la invención como componentes de productos de recubrimiento, barnices y pinturas, promotores de adhesión o adhesivos para superficies oxidadas, así como de materiales composite de varias capas o sustratos recubiertos.

El siguiente ejemplo explica la invención sin limitarla al mismo:

Ejemplo 1: Cuantificación de péptidos sobre superficies (de acero)

Con el método descrito a continuación se ilustra cómo puede realizarse una cuantificación de péptidos adheridos a superficies (de acero).

Mediante evaluación visual, por lo tanto, es posible generar un resultado objetivamente medible respecto de las propiedades de adhesión. Este procedimiento debe entenderse a manera de ejemplo; otros procedimientos de detección química pueden ser adecuados de manera análoga (por ejemplo reacción con ninhidrina).

Con el método descrito pueden discriminar se los péptidos mencionados en la tabla 3 y puede hacerse una distinción entre péptidos buenos (P6, P7) moderados (P13, P15) y malos y los que no se enlazan (10, 17) tal como puede deducirse del gráfico mostrado en la figura 1.

Aplicación de los péptidos:

2x 10 µl de solución de péptido (2 mg/ml disueltos en 1xPBS pH 7,4 de Gibco) se aplican sobre una laminilla de acero HDG (redonda, diámetro 2,3 cm). Los primeros 10 µl se secan en aproximadamente 15', los segundos 10 µl se aplican gota a gota a continuación sobre el mismo sitio y se secan durante 30'. El secado se realiza 30°C en un horno de hibridación HB-1000 de UVP en presencia de 200 ml de agua.

Lavado:

Las laminillas se ponen para lavar en un plato de cristalización (diámetro 19cm) con 1 litro de 1xPBS pH 7,4 y se agita levemente durante 10' a temperatura ambiente (60 rpm, Certomat U de B. Braun). A continuación se secan las laminillas a 30°C.

Tintura:

Las laminillas se transfieren a un plato de 6-pozos. Por medio de una pipeta se aplican 150 µl de solución de tintura Coomassie sobre la laminilla. Después de 30 segundos cuidadosamente (en el borde) se adicionan 6ml de regulador de pH 1xPBS pH 7,4 para enjuagar la solución de tintura. Después, la laminilla se transfiere a 2x 6 ml de 1xPBS pH 7,4, con el fin de eliminar la solución residual de tintura. A continuación, la laminilla se seca brevemente a 30 °C. (Solución de tintura de Coomassie: 2 g de Coomassie brilliant blue R-250, 0,5 g de Coomassie brilliant blue G-250, 50 ml de metanol, 425 ml de etanol, 100 ml de ácido acético glacial y agua destilada hasta 1000 ml).

Desprendimiento:

Por medio de una pipeta se aplican 20 µl de solución de DMSO/CH_3COOH (v/v 9/1) sobre el sitio tinturado. Se deja que la solución de extracción actúe durante 5' a temperatura ambiente; a continuación el líquido es succionado, hacia arriba y hacia abajo, por medio de la pipeta, hasta que la mancha se elimina completamente de la laminilla. El sobrenadante se transfiere a un recipiente de reacción.

Medición:

La medición de la intensidad de color se efectúa en un espectrofotómetro Nanodrop 1000. (Program UV VIS). Para este propósito se aplica una muestra de 2 µl y se mide a 602 nm.

Tablas y figuras:

Tabla 1:

Posición:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Péptido K1 (no es según la invención)	X	K	R	R	P	G	X	X	V	E	X	X
Péptido K2 (no es según la invención)	H	N	T	I	R	I	L	T	I	K	L	X
Péptido K3 (no es según la invención)	R	H	S	S	T	L	R	Y	R	P	H	P
Péptido 8 (no es según la invención)	R	S	I	V	T	F	S	L	R	Q	N	R
Péptido 9 (no es según la invención)	Q	R	N	L	I	K	S	T	C	R	K	I
X: todo tipo de aminoácido												

Tabla 2:

Péptido	Secuencia de AA												Ensayo de adhesión HDG-acero inoxidable
Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Evaluación cuantitativa Evaluación Coomassie (absorción 602nm)
6 (no es según la invención)	S	R	A	R	L	F	V	V	T	Y	H	K	0,728
7	H	M	I	S	T	M	N	A	A	S	R	R	0,549
13 (no es según la invención)	R	N	T	I	R	I	R	T	I	K	H	P	0,348
15 (no es según la invención)	R	H	S	S	T	L	R	Y	R	P	L	P	0,369
10 (no es según la invención)	R	Q	L	Q	R	L	M	K	S	V	N	S	0,229
17 (no es según la invención)	Q	Q	S	R	H	I	L	N	R	K	K	P	0,186

Tabla 3:

Secuencias de nucleótidos que codifican péptidos según la invención	
Péptido	Secuencia
Péptido 6 (no es según la invención)	tccagggcacgactatttgtagtcacatatcacaaa
Péptido 7	cacatgatatctacaatgaacgcggcgagccggcga
Péptido 8 (no es según la invención)	agaagcatagtaacctttagtttaagacaaaatcgc
Péptido 9 (no es según la invención)	caacgtaatttgattaaatcgacgtgccggaaaatc
Péptido 10 (no es según la invención)	cgccagctccagaggctgatgaaatcagtaaattcg
Péptido 13 (no es según la invención)	cgcaacactattcgtatacggactataaaacatccg
Péptido 15 (no es según la invención)	cgacacagtagtactctgaggtataggccacttccg
Péptido 17 (no es según la invención)	caacaaagtcgtcatatactgaatagaaaaaaaccg

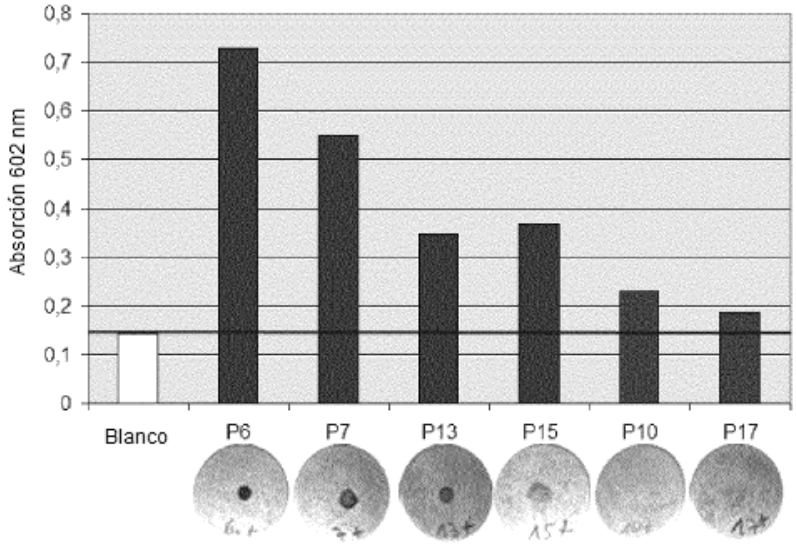

Figura 1:

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Henkel AG & Co. KGaA,

<120> Péptidos que pueden emplearse en productos de recubrimiento, promotores de adhesión o adhesivos para superficies oxidadas

<130> HenkAdP-01

<141> 2012-11-07

<160> 19

<170> SeqWin99, versión 1.02

<210> 1

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

<221> Ácido nucleico que codifica péptidos 6

<400> 1

tccagggcac gactatttgt agtcacatat cacaaa
36

<210> 2

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

<221> Ácido nucleico que codifica péptido 7

<400> 2

cacatgatat ctacaatgaa cgcggcgagc cggcga
36

<210> 3

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

<221> Ácido nucleico que codifica péptido 8

<400> 3

agaagcatag taacctttag tttaagacaa aatcgc
36

<210> 4

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

<221> Ácido nucleico que codifica péptido 9

<400> 4

caacgtaatt tgattaaatc gacgtgccgg aaaatc
36

<210> 5

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

<221> Ácido nucleico que codifica péptido 10

<400> 5

cgccagctcc agaggctgat gaaatcagta aattcg 36

<210> 6

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

<221> Ácido nucleico que codifica péptido 13

<400> 6

cgcaacacta ttcgtatacg gactataaaa catccg 36

<210> 7

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

<221> Ácido nucleico que codifica péptido 15

<400> 7

cgacacagta gtactctgag gtataggcca cttccg 36

<210> 8

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

<221> Ácido nucleico que codifica péptido 17

<400> 8

caacaaagtc gtcatatact gaatagaaaa aaaccg
36

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

<221> Péptido 6

<400> 9

Ser Arg Ala Arg Leu Phe Val Val Thr Tyr His Lys
1 5 10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

<221> Péptido 7

<400> 10

His Met Ile Ser Thr Met Asn Ala Ala Ser Arg Arg
1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

<221> Péptido 8

<400> 11

Arg Ser Ile Val Thr Phe Ser Leu Arg Gln Asn Arg
1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

<221> Péptido 9

<400> 12

Gln Arg Asn Leu Ile Lys Ser Thr Cys Arg Lys Ile
1 5 10

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

<221> Péptido 10

<400> 13

Arg Gln Leu Gln Arg Leu Met Lys Ser Val Asn Ser
1 5 10

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

<221> Péptido 13

<400> 14

Arg Asn Thr Ile Arg Ile Arg Thr Ile Lys His Pro
1 5 10

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

<221> Péptido 15

<400> 15

Arg His Ser Ser Thr Leu Arg Tyr Arg Pro Leu Pro
1 5 10

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

<221> Péptido 17

<400> 16

Gln Gln Ser Arg His Ile Leu Asn Arg Lys Lys Pro
1 5 10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

<221> Péptido K1

<400> 17

Xaa Lys Arg Arg Pro Gly Xaa Xaa Val Glu Xaa Xaa
1 5 10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

<221> Péptido K2

<400> 18

His Asn Thr Ile Arg Ile Leu Thr Ile Lys Leu Xaa
1 5 10

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

<221> Péptido K3

<400> 19

Arg His Ser Ser Thr Leu Arg Tyr Arg Pro His Pro
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Dodecapéptido, caracterizado porque el dodecapéptido presenta la secuencia de aminoácidos HMISTMNAASRR (SEQ ID NO:10).

2. Ácido nucleico que codifica el péptido de acuerdo con la reivindicación 1, principalmente uno que corresponda a la secuencia de ácido nucleico según SEQ ID NO:2.

3. Vectores, principalmente vectores de clonación y vectores de expresión que contienen el ácido nucleico, de la reivindicación 2, que codifica un dodecapéptido.

4. Células procariotas o eucariotas que han sido transformadas con el ácido nucleico de la reivindicación 2 que codifica un dodecapéptido.

5. Producto de recubrimiento, barnices y pinturas, promotores de adhesión o adhesivos para superficies oxidadas que contienen el péptido de la reivindicación 1.

6. Material composite de varias capas o sustrato recubierto que contiene compuestos que están basados completamente o parcialmente en el péptido de la reivindicación 1 como promotor de adhesión entre al menos dos capas adyacentes del material composite o entre el recubrimiento y el sustrato.

7. Uso del péptido de la reivindicación 1 como componente de productos de recubrimiento, barnices y pinturas, promotores de adhesión o adhesivos para superficies oxidadas, así como de materiales composite o de sustratos recubiertos.