

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 353**

51 Int. Cl.:

C07K 14/79 (2006.01)

A61K 38/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2012 PCT/EP2012/051112**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2012 WO12101157**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2012 E 12701866 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2668205**

54 Título: **Péptidos derivados de lactoferrina humana y su uso**

30 Prioridad:

26.01.2011 EP 11152213

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

20.09.2017

73 Titular/es:

**PERGAMUM AB (100.0%)
Karolinska Institutet Science Park (KISP),
Fogdevreten 2
171 65 Solna, SE**

72 Inventor/es:

**MAHLAPUU, MARGIT;
BJÖRN, CAMILLA;
SJÖSTRAND, VERONIKA;
WALSE, BJÖRN y
SVENSSON, BO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 633 353 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

Péptidos derivados de lactoferrina humana y su uso

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevos péptidos y al uso de los mismos, en particular para el tratamiento y/o la prevención de infecciones, inflamaciones, dolor, heridas, cicatrices y/o tumores.

Antecedentes de la técnica

10 La lactoferrina es una glicoproteína de unión a metal monocatenaria con un peso molecular de 77 kDa. Se ha encontrado que el dominio estructural de la lactoferrina responsable de las propiedades bactericidas es un fragmento escindido por pepsina llamado lactoferricina (véanse, p.ej. Bellamy W., *et al.*, "Identification of the bactericidal domain of lactoferrin", Biochim. Biophys. Acta 1121: 130-136, 1992 y Bellamy W., *et al.*, "Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin", J. Appl. Bact. 73: 472-479, 1992).

15 Los receptores de lactoferrina se encuentran en muchos tipos de células, incluyendo monocitos y macrófagos, linfocitos de sangre periférica humana estimulados por lectina, células de borde en cepillo y estirpes celulares tumorales.

Varias publicaciones de patente describen el posible uso de lactoferrina para el tratamiento de infecciones o inflamaciones. En el documento WO 98/06425, p.ej., se divulga que pueden usarse lactoferrina y lactoferricina para el tratamiento y la prevención de infecciones, inflamaciones y tumores.

20 El documento EP 629 347 describe un agente antimicrobiano que contiene (A) hidrolizado de lactoferrina y/o uno o más péptidos antimicrobianos derivados de lactoferrinas y (B) uno o más compuestos seleccionados del grupo consistente en proteína quelante de metal, tocoferol, ciclodextrina, éster de ácido graso de glicerina, alcohol, EDTA o una sal del mismo, ácido ascórbico o una sal del mismo, ácido cítrico o una sal del mismo, ácido polifosfórico o una sal del mismo, quitosano, cisteína y ácido cólico como componentes eficaces de los mismos. Este agente antimicrobiano se destina al tratamiento de productos, y especialmente al tratamiento seguro de, p.ej., alimentos y medicinas. El agente según esta publicación es por tanto un nuevo conservante. En la publicación, se dan varias secuencias peptídicas y algunas de ellas se parecen a los péptidos según la invención, aunque hay varias diferencias importantes descritas más a continuación.

30 El documento US 5.304.633 divulga péptidos antimicrobianos aislados de hidrolizados de lactoferrina humana y bovina. Se divulga específicamente el aislamiento de péptidos correspondientes a los aminoácidos 12 a 47 y 17 a 41 de lactoferrina humana.

El documento JP 7145196 describe la preparación de péptidos antibióticos por hidrólisis de lactoferrina. Se describe específicamente la preparación de un péptido correspondiente a los aminoácidos 17 a 41 de lactoferrina humana.

35 El documento JP 8040925 divulga composiciones farmacéuticas que contienen péptidos derivados de lactoferrina y su uso en el tratamiento de lesiones de córnea, especialmente queratitis. Se divulgan específicamente los péptidos correspondientes a los aminoácidos 17 a 41, 12 a 58 y 19 a 38 de lactoferrina humana.

El documento JP 7274970 describe la producción recombinante de péptidos derivados de lactoferricina antibacteriana, específicamente se divulga un péptido correspondiente a los aminoácidos 18 a 42 de lactoferrina humana.

40 El documento JP 8143468 describe péptidos derivados de lactoferrina y su uso como fármacos antiulcerosos, se divulga específicamente un péptido correspondiente a los aminoácidos 19 a 33 de lactoferrina humana.

El documento WO 00/01730 describe péptidos derivados de lactoferrina humana y su uso para el tratamiento de infecciones e inflamaciones.

El documento EP 1 228 097 describe péptidos derivados del extremo N-terminal inmediato de lactoferrina humana y su uso como agentes microbianos.

45 El documento EP 1151009 describe péptidos que comprenden una secuencia correspondiente a los aminoácidos 35 a 50 de lactoferrina humana que tienen actividad antimicrobiana y/o neutralizante de endotoxina.

El documento WO 2006/047744 describe péptidos inmunomoduladores derivados de la parte N-terminal de lactoferrina humana que comprenden al menos 33 aminoácidos y que están sustituidos en ambos extremos N y C con cuatro aminoácidos cargados positivamente.

50 El documento WO 2009/050279 describe péptidos de lactoferrina mutados y su actividad antimicrobiana.

El documento WO 2009/062898 describe péptidos de lactoferrina sustituidos con arginina y su actividad antimicrobiana y antiinflamatoria.

Compendio de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevos péptidos con actividad antimicrobiana y/o antiinflamatoria mejorada. Los péptidos según la presente invención se diseñan basándose en la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 1 correspondiente a los aminoácidos 13 a 30 de lactoferrina humana madura.

Q-P-E-A-T-K-C-F-Q-W-Q-R-N-M-R-K-V-R (SEQ ID NO:1)

La primera realización de la invención se refiere a péptidos que comprenden al menos la secuencia aminoacídica

X1-X2-W-X4-X5-X6-M-X8-K-V-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17 (SEQ ID NO: 2)

10 en la que

X1 es F, K o R

X2 es Q, W o R

X4 es K o R

X5 es R o K

15 X6 es N, A, V, W o R

X8 es R o K

X11 es R, F o K

X12 es G, S, N, V, L o H

X13 es S, G, T o V

20 X14 es R, L, Y, W o K

X15 es R, K o W

X16 es R, K o W, y

X17 es R, G, Q, V, M, F, W o K,

y variantes equivalentes funcionales de estos péptidos.

25 Los péptidos pueden comprender además preferiblemente los aminoácidos F, W o C en el extremo N-terminal.

Los péptidos pueden comprender además preferiblemente los aminoácidos G, R o L en el extremo C-terminal.

Preferiblemente, los péptidos según la primera realización de la invención comprenden al menos la secuencia aminoacídica

X1-X2-W-K-X5-X6-M-X8-K-V-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17 (SEQ ID NO: 3)

30 en la que

X1 es F, K o R

X2 es Q, o W

X5 es R o K

X6 es N, A, V o W

35 X8 es R o K

X11 es R, F o K

X12 es V, L o N

X13 es S, G, T o V

X14 es R, L, Y, W o K

X15 es R, K o W

X16 es R, K o W, y

X17 es R, F, W o K;

5 y variantes equivalentes funcionales de estos péptidos.

Los péptidos pueden comprender preferiblemente además los aminoácidos F, W o C en el extremo N-terminal.

Los péptidos pueden comprender preferiblemente además los aminoácidos G, R o L en el extremo C-terminal.

Más preferiblemente, los péptidos según la primera realización de la invención se seleccionan de péptidos que comprenden una secuencia aminoacídica seleccionada de las secuencias aminoacídicas

R-Q-W-K-R-R-M-R-K-V-F-H-S-Y-R-R-M-G	(SEQ ID NO: 21)
K-Q-W-K-R-W-M-R-K-V-F-V-S-L-R-R-V-G	(SEQ ID NO: 22)
R-Q-W-K-R-V-M-R-K-V-F-G-S-R-W-W-R-G	(SEQ ID NO: 23)
K-Q-W-K-R-M-M-R-K-V-F-S-V-R-R-W-F-L	(SEQ ID NO: 24)
F-R-Q-W-K-R-W-M-R-K-V-F-H-S-W-R-R-W	(SEQ ID NO: 27)
F-Q-W-K-R-R-M-R-K-V-R-G-S-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 6)
W-F-Q-W-K-R-A-M-R-K-V-R-G-S-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 7)
F-W-W-K-R-A-M-R-K-V-R-G-S-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 8)
F-Q-W-K-R-R-M-R-K-V-R-G-S-K-K-K-K-G	(SEQ ID NO: 19)
F-Q-W-K-R-R-M-R-K-V-R-G-S-L-R-R-W-G	(SEQ ID NO: 20)
F-R-W-K-R-R-M-R-K-V-R-G-S-R-R-R-Q-G	(SEQ ID NO: 25)
F-W-W-K-R-A-M-R-K-V-R-L-S-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 31)
F-W-W-K-R-A-M-R-K-V-R-N-S-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 32)
10 F-W-W-K-K-A-M-K-K-V-K-G-T-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 34)

y variantes equivalentes funcionales de estos péptidos.

Lo más preferiblemente, los péptidos según la primera realización de la invención se seleccionan de los péptidos

R-Q-W-K-R-R-M-R-K-V-F-H-S-Y-R-R-M-G	(SEQ ID NO: 21)
K-Q-W-K-R-W-M-R-K-V-F-V-S-L-R-R-V-G	(SEQ ID NO: 22)
R-Q-W-K-R-V-M-R-K-V-F-G-S-R-W-W-R-G	(SEQ ID NO: 23)
K-Q-W-K-R-M-M-R-K-V-F-S-V-R-R-W-F-L	(SEQ ID NO: 24)
F-R-Q-W-K-R-W-M-R-K-V-F-H-S-W-R-R-W	(SEQ ID NO: 27)
F-Q-W-K-R-R-M-R-K-V-R-G-S-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 6)
W-F-Q-W-K-R-A-M-R-K-V-R-G-S-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 7)
F-W-W-K-R-A-M-R-K-V-R-G-S-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 8)
F-Q-W-K-R-R-M-R-K-V-R-G-S-K-K-K-K-G	(SEQ ID NO: 19)
F-Q-W-K-R-R-M-R-K-V-R-G-S-L-R-R-W-G	(SEQ ID NO: 20)
F-R-W-K-R-R-M-R-K-V-R-G-S-R-R-R-Q-G	(SEQ ID NO: 25)
F-W-W-K-R-A-M-R-K-V-R-L-S-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 31)
F-W-W-K-R-A-M-R-K-V-R-N-S-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 32)
F-W-W-K-K-A-M-K-K-V-K-G-T-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 34)

15 y variantes equivalentes funcionales de estos péptidos.

- Los péptidos según la invención tienen preferiblemente una longitud de 12 a 100 residuos aminoacídicos, tal como preferiblemente una longitud de 12 a 50 residuos aminoacídicos, o una longitud de 12 a 30 residuos aminoacídicos, tal como más preferiblemente una longitud de 12 a aproximadamente 25 residuos aminoacídicos, tal como lo más preferiblemente una longitud de 12 a 20 residuos aminoacídicos, tal como 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 residuos aminoacídicos.
- Los péptidos según la invención comprenden los 20 aminoácidos estándares codificados genéticamente. Pueden comprender también uno o más de los aminoácidos en sus correspondientes estereoisómeros en forma "D", en comparación con la forma natural "L".
- En la descripción, se usan los símbolos de una letra o tres letras para denotar los aminoácidos. Estos símbolos, que son bien conocidos por un especialista en la materia, tienen el siguiente significado: A = Ala = alanina, C = Cys = cisteína, D = Asp = ácido aspártico, E = Glu = ácido glutámico, F = Phe = fenilalanina, G = Gly = glicina, I = Ile = isoleucina, K = Lys = lisina, M = Met = metionina, N = Asn = asparagina, P = Pro = prolina, Q = Gln = glutamina, R = Arg = arginina, S = Ser = serina, T = Thr = treonina, V = Val = valina, W = Trp = triptófano.
- Las letras minúsculas se usan para designar los correspondientes D-aminoácidos.
- Las variantes equivalentes funcionales de los péptidos según la invención pueden incluir inserciones o deleciones de uno o más aminoácidos, tales como 1-5 inserciones o deleciones, 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones o deleciones.
- Las variantes equivalentes funcionales de los péptidos según la invención pueden incluir también sustituciones. Las sustituciones pueden ser conservativas o no conservativas. Las sustituciones conservativas son la sustitución de un aminoácido dentro de la misma clase general (p.ej., un aminoácido ácido, un aminoácido básico, etc.) por otro aminoácido dentro de la misma clase. P.ej., un aminoácido hidrófobo puede sustituirse por otro aminoácido hidrófobo, p.ej. Trp puede sustituirse por Leu. Un aminoácido cargado positivamente puede sustituirse por otro aminoácido cargado positivamente, p.ej. Arg puede sustituirse por Lys, tal como 1-5 sustituciones, 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones.
- La Figura 1 ilustra las diferentes clases de aminoácidos.
- Las variantes equivalentes funcionales de los péptidos según la invención pueden comprender también otros aminoácidos no naturales, siempre que se retenga la propiedad funcional deseada por el polipéptido. Tales aminoácidos no naturales pueden incluir aminoácidos α,α -disustituidos, N-alquilaminoácidos u otras variantes que imiten un aminoácido natural específico.
- P.ej., en las variantes equivalentes funcionales de los péptidos según la invención, la lisina (K/Lys) puede sustituirse preferiblemente por Dap (ácido diaminopropiónico), Dab (ácido 2,4-diaminobutanoico), Orn (ornitina) o Hyl (5-hidroxilisina), la arginina (R/Arg) puede sustituirse preferiblemente por Har (homoarginina), la alanina (A/Ala) puede sustituirse preferiblemente por Aib (ácido α -aminoisobutírico) o Abu (ácido 2-aminobutanoico), la valina (V/Val) puede sustituirse preferiblemente por Nva (norvalina) o Iva (isovalina), la leucina (L/Leu) puede sustituirse preferiblemente por Nle (norleucina) o Cha (3-ciclohexilalanina), la serina (S/Ser) puede sustituirse preferiblemente por Hse (homoserina), la cisteína (C/Cys) puede sustituirse preferiblemente por Hcy (homocisteína), la histidina (H/His) puede sustituirse preferiblemente por Hhs (homohistidina) o 3-MH (3-metilhistidina), la fenilalanina (F/Phe) puede sustituirse preferiblemente por Phg (2-fenilglicina) y la prolina (P/Pro) puede sustituirse preferiblemente por Hyp (4-hidroxiprolina).
- Por consiguiente, las variantes funcionalmente equivalentes de los péptidos son péptidos que tienen más de un 70 % de identidad de secuencia, tal como más de 75 % de identidad de secuencia, preferiblemente más de un 80 % de identidad de secuencia, tal como más de un 85 % de identidad de secuencia, lo más preferiblemente más de un 90 % de identidad de secuencia tal como más de un 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia, en comparación con un péptido seleccionado de los péptidos

R-Q-W-K-R-R-M-R-K-V-F-H-S-Y-R-R-M-G	(SEQ ID NO: 21)
K-Q-W-K-R-W-M-R-K-V-F-V-S-L-R-R-V-G	(SEQ ID NO: 22)
R-Q-W-K-R-V-M-R-K-V-F-G-S-R-W-W-R-G	(SEQ ID NO: 23)
K-Q-W-K-R-M-M-R-K-V-F-S-V-R-R-W-F-L	(SEQ ID NO: 24)
F-R-Q-W-K-R-W-M-R-K-V-F-H-S-W-R-R-W	(SEQ ID NO: 27)
F-Q-W-K-R-R-M-R-K-V-R-G-S-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 6)
W-F-Q-W-K-R-A-M-R-K-V-R-G-S-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 7)
F-W-W-K-R-A-M-R-K-V-R-G-S-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 8)
F-Q-W-K-R-R-M-R-K-V-R-G-S-K-K-K-K-G	(SEQ ID NO: 19)
F-Q-W-K-R-R-M-R-K-V-R-G-S-L-R-R-W-G	(SEQ ID NO: 20)
F-R-W-K-R-R-M-R-K-V-R-G-S-R-R-R-Q-G	(SEQ ID NO: 25)
F-W-W-K-R-A-M-R-K-V-R-L-S-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 31)
F-W-W-K-R-A-M-R-K-V-R-N-S-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 32)
F-W-W-K-K-A-M-K-K-V-K-G-T-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 34)

La identidad porcentual entre dos secuencias aminoacídicas se determina como sigue. En primer lugar, se compara una secuencia aminoacídica, por ejemplo, con la SEQ ID NO:1 usando el programa BLAST 2 Sequences (BI2seq) de la versión independiente de BLASTZ que contiene BLASTN versión 2.0.14 y BLASTP versión 2.0.14. Esta versión independiente de BLASTZ puede obtenerse del sitio web del National Center for Biotechnology Information del gobierno de EE.UU. en ncbi.nlm.nih.gov. Las instrucciones que explican cómo usar el programa BI2seq pueden encontrarse en el fichero léame que acompaña a BLASTZ. BI2seq efectúa una comparación entre dos secuencias aminoacídicas usando el algoritmo BLASTP. Para comparar dos secuencias aminoacídicas, se establecen las opciones de BI2seq como sigue: se establece -i como el fichero que contiene la primera secuencia aminoacídica para comparar (p.ej., C:\seq1.txt); se establece -j como el fichero que contiene la segunda secuencia aminoacídica para comparar (p.ej., C:\seq2.txt); se establece -p como blastp; se establece -o como cualquier nombre de fichero deseado (p.ej., C:\output.txt); y todas las demás opciones de dejan en sus ajustes por defecto. Por ejemplo, puede usarse el siguiente comando para generar un archivo de salida que contiene la comparación entre dos secuencias aminoacídicas: C:\BI2seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastp -o c:\output.txt. Si las dos secuencias comparadas comparten homología, entonces el fichero de salida designado presentará aquellas regiones de homología como secuencias alineadas. Si dos secuencias comparadas no comparten homología, entonces el fichero de salida designado no presentará secuencias alineadas. Una vez alineadas, se determina el número de coincidencias contando el número de posiciones donde se presenta un nucleótido o residuo aminoacídico idéntico en ambas secuencias.

Se determina la identidad porcentual dividiendo el número de coincidencias entre la longitud de la secuencia expuesta en una secuencia identificada seguido por multiplicar el valor resultante por 100. Por ejemplo, si se compara una secuencia con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1 (la longitud de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1 es de 18) y el número de coincidencias es 16, entonces la secuencia tiene una identidad porcentual de 89 % (concretamente, $16 \div 18 * 100 = 89$) con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1.

Además, las fusiones de los polipéptidos según la invención con otros polipéptidos, p.ej. glutation-S-transferasa, proteína A o marcaje de oligohistidina para simplificar la purificación, o con un epítipo reconocido por un anticuerpo tal como el epítipo de marcaje Myc, están también incluidas en la presente invención.

Se incluyen también en la invención fusiones que incluyen otros rasgos deseables que son útiles, por ejemplo, para detectar o aislar el péptido, o promover la captación celular del péptido. Son ejemplos de tales copartícipes de fusión un resto de biotina, un resto de estreptavidina, un resto radiactivo, un resto fluorescente como un fluoróforo pequeño o un fluoróforo GFP de proteína fluorescente verde, un marcaje inmunogénico, una molécula lipófila o un dominio polipeptídico que es capaz de promover la captación celular del péptido.

Las variantes equivalentes funcionales de los péptidos según la invención pueden comprender también aminoácidos modificados químicamente o derivatizados, por ejemplo por PEGilación, amidación, esterificación, acilación, acetilación y/o alquilación.

Existen diferentes estrategias de enlazamiento para PEG y deberían ser incluidas. Por ejemplo, puede ligarse PEG

con grupos amino N-terminales, o con residuos aminoácidos con grupos amino o hidroxilo reactivos (Lys, His, Ser, Thr y Tyr) directamente o usando ácido γ -aminobutírico como ligadores. También puede acoplarse PEG con grupos carboxilo (Asp, Glu, C-terminal) o sulfhidrilo (Cys).

5 Las variantes equivalentes funcionales de los péptidos según la invención pueden comprender también derivados químicos de los aminoácidos creados por reacción con un lado funcional. Tales moléculas derivatizadas incluyen moléculas en que se han derivatizado grupos amino libres formando clorhidratos de amina, grupos p-toluenosulfonilo, grupos carboxibenzoxi, grupos *tert*-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres pueden derivatizarse formando sales, ésteres metílicos o etílicos u otros tipos de ésteres e hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres pueden derivatizarse formando derivados de O-acilo u O-alquilo.

10 Las variantes equivalentes funcionales de los péptidos según la invención pueden comprender también variantes peptidomiméticas de los péptidos. Un peptidomimético es un compuesto que imita la conformación y rasgos particulares del péptido. Por ejemplo, los peptidomiméticos incluyen péptidos con ligamientos inversos (-CO-NH-). Además, los peptidomiméticos incluyen variantes donde los residuos aminoácidos se ligan por un enlace γ (CH₂NH) que reemplaza al ligamiento amida convencional. Además, los peptidomiméticos incluyen también omega-aminoácidos, donde los grupos amino y carboxilo están separados por unidades de polimetileno de longitud variable.

15 Los péptidos según la invención pueden incluir modificaciones tales como amidación, acilación aminoterminal (p.ej., acetilación o amidación de ácido tioglicólico), carboxilamidación terminal (p.ej., con amoniaco o metilamina) y otras modificaciones terminales en que las regiones N o C-terminales están bloqueadas para ayudar a reducir la sensibilidad a la digestión exoproteolítica. Además, mediante la acetilación del extremo N-terminal y la amidación del
20 C-terminal, los péptidos no estarán cargados en los extremos. Suponiendo que los receptores se unen a las correspondientes secuencias de LF (donde no hay cargas N- y C-terminales), los péptidos bloqueados deberían unirse mejor ya que en este aspecto se parecen a la proteína nativa más que los péptidos no bloqueados.

Los péptidos según la invención pueden estar marcados terminalmente en el extremo C con triptófano para aumentar la potencia, como se describe por Pasupuleti *et al.* Biochim Biophys Acta 2009, 1790: 800-8.

25 Además, si está presente, un residuo de cisteína en los péptidos puede reemplazarse por una acetamidometilcisteína. Además, los péptidos según la invención pueden estar en forma cíclica, obtenida mediante la creación de un puente disulfuro entre dos cisteínas en la secuencia. Además, los péptidos según la invención pueden incluir lactamas formadas.

30 Los péptidos según la invención son adecuados para el tratamiento y/o la prevención de infecciones, inflamaciones, tumores, dolor, heridas y cicatrices. El término "tratamiento" usado en la presente memoria hace referencia a curar, revertir, atenuar, aliviar, minimizar, suprimir o detener los efectos nocivos de un estado patológico, progresión de enfermedad u otra afección anormal, y el término "prevención" usado en la presente memoria hace referencia a minimizar, reducir o suprimir el riesgo de desarrollar un estado patológico o progresión u otras afecciones anormales o nocivas.

35 Las infecciones tratables con los péptidos o productos medicinales/dispositivos médicos según la invención incluyen infecciones causadas por toda clase de patógenos, tales como bacterias, virus, hongos, etc. Los péptidos según la invención pueden usarse para recubrir/tratar diferentes productos medicinales/productos de dispositivos médicos para reducir/prevenir las infecciones relacionadas con el dispositivo.

40 También es posible tratar diferentes tipos de inflamaciones. La inflamación es un fenómeno complejo marcado entre otros por un "enrojecimiento" e hinchamiento anormal tejidos y órganos, dolor y calor en las áreas afectadas, dilatación capilar, infiltración leucocítica, etc. La inflamación está causada principalmente por la exposición a agentes bacterianos y otros dañinos y a lesión física. La inflamación alérgica es un rasgo patofisiológico importante de varias incapacidades o afecciones médicas que incluyen asma alérgica, dermatitis atópica, rinitis alérgica y varias enfermedades alérgicas oculares.

45 Por consiguiente, un aspecto de la presente invención proporciona métodos para el tratamiento y/o la prevención de infecciones, inflamaciones, tumores, dolor, heridas y cicatrices en los que se administra una cantidad eficaz de un péptido de la invención, y variantes equivalentes funcionales del mismo, a un paciente. Dicho péptido puede formularse para administración oral, sistémica, parenteral, local o tópica. Además, dicho péptido puede incluirse en comida o incluirse en un alimento de fórmula para bebés.

50 Además, otro aspecto de la presente invención proporciona péptidos de la invención para uso en el tratamiento y/o la prevención de infecciones, inflamaciones, tumores, dolor, heridas y cicatrices. Dicho péptido puede formularse para administración oral, administración sistémica, administración parenteral, administración local o administración tópica. Además, dicho péptido para usar puede incluirse en comida o incluirse en alimento de fórmula para bebés.

55 Además, otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de los péptidos de la invención para la producción de un producto medicinal/producto de dispositivo médico para el tratamiento y/o la prevención de infecciones, inflamaciones, tumores, dolor, heridas y cicatrices. Dicho producto medicinal puede formularse para administración oral, administración sistémica, administración parenteral, administración local o administración tópica. Además, el

producto medicinal/producto de dispositivo médico puede incluirse en comida o incluirse en un alimento de fórmula para bebés.

- 5 La inflamación tiene muchas formas y está mediada por una variedad de diferentes citocinas y otras señales químicas. Estos mediadores de la inflamación incluyen factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interferón-gamma (IFN- γ) y diversos factores estimulantes de colonias (CSF).

Mediante la inhibición de infecciones y la modulación de la respuesta inflamatoria, los péptidos son adecuados para el tratamiento/prevención de heridas y la formación de cicatrices. Como se afirma anteriormente, los péptidos según la invención son también adecuados para el tratamiento de tumores.

- 10 Los péptidos según la invención pueden usarse como tales o incluirse en un dispositivo médico, producto medicinal o composición farmacéutica. El producto medicinal o composición farmacéutica según la invención puede comprender también sustancias usadas para facilitar la producción de la preparación farmacéutica o la administración de las preparaciones. Tales sustancias son bien conocidas por los especialistas en la materia y pueden ser, por ejemplo, coadyuvantes, portadores y conservantes farmacéuticamente aceptables.

- 15 Por consiguiente, un aspecto de la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un péptido según la invención.

Otro aspecto de la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un péptido según la invención para uso en el tratamiento y/o la prevención de infecciones, inflamaciones, tumores, dolor, heridas y cicatrices.

- 20 Los péptidos según la invención pueden formularse para administración oral, administración sistémica, administración parenteral, administración local o administración tópica.

Los péptidos, productos medicinales, dispositivos médicos y composiciones farmacéuticas según la invención pueden administrarse a un paciente por vía oral, sistémica, parenteral, local o tópica.

- 25 El término "paciente" usado en la presente memoria se refiere a cualquier persona con riesgo de o que padece un estado patológico, progresión de enfermedad u otra afección anormal o nociva.

La administración sistémica es adecuada, p.ej., para el tratamiento de infección del tracto urinario, colitis y tumores. La administración sistémica puede emprenderse por vía oral, nasal, pulmonar, bucofaringea, intravenosa, intraarterial, intracavitaria, intramuscular, subcutánea, transdérmica, supositorios (incluyendo rectal) u otras vías conocidas por los especialistas en la materia.

- 30 La administración local es adecuada, p.ej., para el tratamiento de infecciones e inflamaciones de la piel y estructuras de la piel, infecciones respiratorias, todas las infecciones e inflamaciones en membranas mucosas, etc. La administración local puede emprenderse por vía tópica, epicutánea, oral, nasal, vaginal, oftálmica, ótica, pulmonar o bucofaringea. Para el tratamiento de infecciones o inflamaciones locales, los péptidos o productos medicinales o dispositivos médicos según la invención pueden incluirse, p.ej., en un gel, una crema, una pomada, solución o pasta,
35 un polvo/solución de inhalación, una solución/suspensión/pomada ótica u oftálmica.

En el método según la invención, se administra a un paciente una cantidad eficaz de un péptido según la invención. El término "cantidad eficaz" usado en la presente memoria se refiere a una cantidad suficiente para tratar o prevenir un estado patológico, progresión de enfermedad u otras afecciones anormales o nocivas.

- 40 Los péptidos o productos medicinales o dispositivos médicos y métodos según la invención son particularmente bien adecuados para el tratamiento y/o la prevención de infección del tracto urinario y colitis, infecciones e inflamación de la piel y estructuras de la piel, infecciones e inflamación del oído externo, canal auricular, oído interno y ojo y sistema respiratorio, heridas crónicas y agudas, pero también son tratables varias otras enfermedades inflamatorias e infecciosas según la presente invención, tales como enfermedades intestinales inflamatorias, artritis reumatoide, artrosis, afecciones causadas por el virus VIH-1, afecciones causadas por el virus CMV y afecciones causadas por hongos, p.ej., especies de *Candida* tales como *Candida albicans* and *Candida krusei*, *Aspergillus* y *Cryptococcus neoformans*. Este listado no es en modo alguno limitante del alcance de la invención.

- 45 Los péptidos, productos medicinales, dispositivos médicos y métodos según la invención son también bien adecuados para el cuidado médico preventivo al reducir el riesgo de desarrollo de enfermedades inflamatorias o infecciosas en pacientes con un riesgo aumentado de atracción de tales complicaciones.

- 50 Los péptidos de la presente invención son adecuados para terapias antiinflamatorias e inmunomoduladoras, ejemplificadas pero no limitadas por:

1) Generalmente, tratamiento y/o prevención de inflamación y/o una afección médica resultante de la inflamación, y específicamente,

- 2a) Intestino; enfermedad de Crohn, colitis, colitis ulcerosa,
- 2b) articulaciones; artritis reumatoide, artritis, artrosis, trastornos localizados en los músculos, incluyendo espasmo muscular, desgarramiento muscular, lesión muscular, esguince muscular, torcedura muscular,
- 2c) dermatología; psoriasis, eccema (eczema), dermatitis, acné,
- 5 2d) corazón; pericarditis, endocarditis, insuficiencia cardíaca,
- 2e) dolor (especificado adicionalmente en 2f a continuación),
- 2f) sistema nervioso; enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, síndrome del túnel carpiano, hernia de disco, rizopatía cervical, parálisis de Bell, lesión de médula espinal aguda, compresión de médula espinal, estenosis medular, neuralgia postherpética, encefalitis vírica, meningitis vírica, enfermedad de Menieres, polio y complicaciones después de polio, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polineuropatía, neuralgia trigeminal, trastornos epilépticos crónicos,
- 10 2g) órganos sensoriales; glaucoma,
- 2h) superficies mucosas (inflamación como resultado de quimio/radioterapia),
- 2i) alergia,
- 15 2j) enfermedades autoinmunitarias.
- Los péptidos de la invención son además adecuados para la prevención y/o el tratamiento de heridas y/o cicatrices en relación con afecciones y procedimientos ejemplificados, pero sin limitación, por:
- 3a) procedimientos quirúrgicos en diversos tejidos tales como piel, músculos, tendones, tejido nervioso, vasos sanguíneos, y en diferentes localizaciones del cuerpo tales como ojos, oídos, cuerdas vocales, manos, médula espinal, cavidad intraabdominal, cavidad intratorácica, cavidad intracraneal, cavidad oral, procedimientos ginecológicos, endometriosis, fimosis,
- 20 3b) acné,
- 3c) cicatrices hipertróficas y queloides,
- 3d) pleuritis,
- 25 3e) diálisis peritoneal,
- 3f) heridas agudas y crónicas.
- Los péptidos de la invención se cree además que tienen efectos antiangiogénicos y son por lo tanto adecuados para el tratamiento y/o la prevención de:
- 4a) cáncer,
- 30 4b) artritis reumatoide.
- Los péptidos de la invención tienen efectos antiinfecciosos, y son adecuados para la prevención y/o el tratamiento de:
- 5a) efectos antibacterianos:
- 35 tracto respiratorio superior e inferior (tonsilitis, sinusitis, neumonía, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, etc.),
- infecciones del ojo (p.ej., conjuntivitis),
- infecciones del tracto urinario,
- enfermedades de transmisión sexual (incluyendo el recubrimiento antimicrobiano de condones),
- tracto genital (incluyendo vaginosis, vaginitis, cervicitis, endometritis, PID),
- 40 infecciones del tracto gastrointestinal (infecciones sistémicas iniciadas en el GI),
- infecciones del sistema nervioso central,
- infecciones de la piel y estructuras de la piel tales como lesiones traumáticas infectadas secundariamente,

incluyendo infecciones de sitio quirúrgico, celulitis o abscesos, dermatosis infectadas secundariamente, impétigo y ántrax o forunculosis (incluyendo bacterias grampositivas y gramnegativas y estafilococos, por ejemplo MRSA, estreptococos, nosocomiales, heridas, quemaduras), músculo, articulaciones (p.ej., artritis séptica), sistema óseo y hematopoyético,

- 5 infecciones relacionadas con la boca, ojo, oído interno y externo y canal auricular, incluyendo parodontitis y gingivitis

5b) Efectos antivíricos:

tracto respiratorio superior e inferior,
enfermedades de transmisión sexual,

- 10 infecciones del tracto gastrointestinal (infecciones sistémicas iniciadas en el GI),
infecciones del sistema nervioso central,

5c) Efectos antifúngicos:

tracto respiratorio superior e inferior (tales como aftas, candidiasis mucocutánea)
tracto genitourinario (tales como candidiasis vulvovaginal, balanitis)

- 15 infecciones del tracto gastrointestinal (infecciones sistémicas iniciadas en el GI)
infecciones del sistema nervioso central

infecciones de la piel y estructuras de la piel (tales como candidiasis mucocutánea), dermatosis y eczema.

- 20 Lo más preferiblemente, los péptidos de la presente invención se usan para el tratamiento, la profilaxis y/o la prevención de impétigo, heridas por quemaduras, abrasiones infectadas, laceraciones infectadas, excoriaciones, erisipelas, celulitis, abscesos, forúnculos, ántrax, heridas suturadas, infecciones de sitio quirúrgico, dermatosis infectadas secundariamente; dermatitis atópica, psoriasis y dermatitis de contacto alérgica, mordeduras animales e infección relacionada con catéter.

Los péptidos, productos medicinales y métodos según la invención pueden usarse solos, en combinación entre sí o en combinación con terapia convencional.

- 25 Según la presente invención, también es posible incluir los péptidos, en una cantidad eficaz, en cualquier clase de comida o bebida destinada a reducir infecciones y/o inflamaciones en pacientes con un riesgo aumentado de tales afecciones debido a una enfermedad subyacente, un bajo peso de nacimiento o un tratamiento médico. Por ejemplo, es posible incluir los péptidos, en una cantidad eficaz, en un alimento de fórmula para bebés destinado a inhibir los efectos dañinos de bacterias, tal como la pérdida de peso causada por la inflamación inducida por bacterias, virus u hongos en bebés. Cuando los péptidos según la invención se van a usar en comida, p.ej. con fines nutricionales, se prefiere especialmente usar péptidos de origen natural.

Puesto que los péptidos según la invención tienen efectos antimicrobianos, pueden usarse también como conservantes en diferentes comidas y productos medicinales tales como geles, cremas, pomadas, pastas, soluciones, emulsiones, etc.

- 35 La invención se describirá ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos pretenden solo ilustrar la invención y no debería considerarse en modo alguno que limitan el alcance de la invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. Representación de las diferentes clases de aminoácidos, que muestran similitud en términos de hidrofobia, tamaño y carga.

- 40 Figura 2. Vista superior de la hélice correspondiente a una parte del péptido de SEQ ID NO:1, a saber
KCFQWQRNMRKVR

Figura 3. Gráfico de dispersión que muestra el agrupamiento de los péptidos. Los péptidos se representan según sus propiedades fisicoquímicas. Los péptidos con actividad inhibitoria de TNF- α (a una concentración de péptido de 40 μ M) pueden encontrarse en dos agrupamientos: agrupamientos A y B.

- 45 Figura 4. Efecto de dosis y respuesta del péptido 265 (A) sobre la colonización bacteriana de heridas de extirpación infectadas en ratas. Las heridas infectadas con MRSA (CCUG 41879) y tratadas con el correspondiente péptido en H₂O, a concentraciones de 0,1, 0,5 y 2 mg/ml, demuestran una reducción significativa de los recuentos bacterianos

en forma de respuesta a la dosis. Los resultados se presentan como supervivencia bacteriana relativa (%) en comparación con el grupo de control \pm EEM (n=15 heridas). Se estimó la significación estadística por la prueba de t de Student. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5 Figura 5. Efecto de dosis y respuesta del péptido 265 (A) sobre la colonización bacteriana de heridas infectadas en piel de cerdo. Las heridas infectadas con *S. aureus* en PBS/suero (50/50) y tratadas con el correspondiente péptido en H₂O, a concentraciones de 0,1, 0,5 y 2 mg/ml demuestran una reducción significativa de los recuentos bacterianos en forma de respuesta a la dosis. Los resultados se presentan como supervivencia bacteriana relativa (%) en comparación con el grupo de control \pm EEM (n= 10 heridas). Se estimó la significación estadística por la prueba de t de Student. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

10 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1. Cribado peptídico 1

Se diseñaron y ensayaron los péptidos derivados de lactoferrina mostrados en la Tabla 1. Se identificaron los péptidos activos.

15 Se diseñaron nuevas variantes peptídicas basándose en la actividad antiinflamatoria y antimicrobiana medida de péptidos que tienen secuencias similares a la SEQ ID NO:1. Además, se tuvieron en cuenta las consideraciones estructurales de las correspondientes secuencias de estos péptidos. En la práctica, esto significaba mantener y potenciar la helicidad de los péptidos. Se diseñaron nuevas variantes de péptidos aumentando la carga positiva y las regiones hidrófobas de los péptidos. Por tanto, se aumentó el carácter anfipático de los péptidos. (Figura. 2).
 20 Basándose en los nuevos diseños, se ordenaron los nuevos péptidos como una colección PEPscreen (Sigma) y se ensayaron tanto la actividad antiinflamatoria como antimicrobiana.

Tabla 1. Lista de péptidos ensayados en el cribado 1

Péptido	Secuencia	SEQ ID NO:
Péptido 116	FQWQRNMRKVRSRRRRG	SEQ ID NO: 4
Péptido 126	FQWQRKMRKVRSRRRRG	SEQ ID NO: 5
Péptido 127	FQWKRRMRKVRSRRRRG	SEQ ID NO: 6
Péptido 130	WFQWKRAMRKVRSRRRRG	SEQ ID NO: 7
Péptido 132	FWWWKRAMRKVRSRRRRG	SEQ ID NO: 8
Péptido 150	FQWQRNMRKVRSRRRRG	SEQ ID NO: 9
Péptido 152	FQWQRNMRKVRSRRRRG	SEQ ID NO: 10
Péptido 153	FQWQRNMRKVRSRRRRG	SEQ ID NO: 11
Péptido 154	FQWQRNMRKVRSRRRRG	SEQ ID NO: 12
Péptido 155	CFQWKRAMRKVRSRRRRG	SEQ ID NO: 13
Péptido 156	EATKCFQWQRNMRKVRSRRRRG	SEQ ID NO: 14
Péptido 157	CFQWQRNMRKVRSRRRRG	SEQ ID NO: 15
Péptido 159	CFQWKRAMRKVRSRRRRG	SEQ ID NO: 16

Se midió la actividad antiinflamatoria como la inhibición de la producción en TNF- α en células THP-1 estimuladas por LPS

25 Se mantuvo la estirpe celular THP-1 (TIB-202; ATCC, Manassas, VA, EE.UU.) correspondiente a monocitos humanos en RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (FBS; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), piruvato de sodio 1 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y HEPES 20 mM (PAA, Laboratories GmbH, Pasching, Austria).

30 Se ajustó la densidad celular a 10⁶ células/ml y se añadieron 100 μ l de la suspensión por pocillo a placas de cultivo celular de 96 pocillos (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). Se trataron las células con PMA 10 ng/ml (12-miristato 13-acetato de forbol; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) durante 48 horas para diferenciar los monocitos en células

5 similares a macrófagos. Después de ello, se estimularon las células mediante la adición de lipopolisacárido 0,1 ng/ml (LPS; serotipo de *E. coli* O55:B5; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) al medio especificado anteriormente excepto por contener FBS termoinactivado al 5 %. 30 minutos después de la adición de LPS, se añadieron los péptidos (40 μ M) por triplicado. Después de 6 horas de incubación a +37 °C, 5 % de CO₂ y en atmósfera húmeda, se recogieron los sobrenadantes celulares, se centrifugaron y se mantuvieron congelados a -20 °C hasta analizar el contenido de TNF- α por ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.). Los resultados se presentan como secreción relativa media (%), fijando el nivel de TNF- α estimulado sin péptido en 100 % y fijando la secreción basal en 0 % (Tabla 2).

Tabla 2. Efectos antiinflamatorios de los péptidos ensayados en el cribado 1

SEQ ID NO	Péptido	TNF- α a péptido 40 μ M
SEQ ID NO 13	155	5 %
SEQ ID NO 7	130	6 %
SEQ ID NO 6	127	9 %
SEQ ID NO 8	132	18 %
SEQ ID NO 16	159	60 %
SEQ ID NO 4	116	83 %
SEQ ID NO 5	126	107 %
SEQ ID NO 10	152	110 %
SEQ ID NO 14	156	124 %
SEQ ID NO 9	150	134 %
SEQ ID NO 15	157	153 %
SEQ ID NO 11	153	159 %
SEQ ID NO 12	154	162 %

10 Se midió la actividad antimicrobiana como el efecto bactericida sobre *S. aureus* usando la concentración microbicida mínima, MMC₉₉, ensayo)

15 Se transfirieron *S. aureus* (n° 1800; CCUG, Gotemburgo, Suecia) cultivadas en placas de agar sanguíneo [agar Columbia (Oxoid, Basingstoke, RU) suplementado con sangre de caballo desfibrinada al 5 % (National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Suecia)] a caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI al 3,7 %; Difco, BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) y se incubaron en un agitador a 250 rpm +37° C durante una noche. Se diluyó después de ello el cultivo 1:10 con caldo BHI reciente y se incubó durante 2 horas adicionales para alcanzar el crecimiento en fase logarítmica. Se sedimentaron las bacterias y se suspendieron en medio BHI al 1 % (caldo BHI diluido 100 veces en agua ultrapura) hasta una concentración de 10⁷ bacterias/ml estimada midiendo la densidad óptica a 600 nm. Se diluyeron en serie los péptidos en etapas de dos veces desde 160 μ M hasta 1,25 μ M en medio BHI al 1 %. Se incubaron después de ello los péptidos (100 μ l) con bacterias (5 μ l a 10⁷ bact./ml) durante 2 horas a +37 °C. Se pusieron gotas (5 μ l) de la suspensión en placas de agar sanguíneo. Se incubaron las placas de agar sanguíneo durante una noche a 37 °C. Se registraron los valores de MMC₉₉, concretamente la concentración de péptido mínima necesaria para conseguir un 99 % de reducción de las bacterias viables (Tabla 3). Se confirmó la concentración de la suspensión bacteriana usada en el ensayo por los recuentos viables en placas de agar sanguíneo.

25 **Tabla 3. Efectos antibacterianos de los péptidos ensayados en el cribado 1**

SEQ ID NO	Péptido	MMC ₉₉ μ M en medio BHI al 1 %
SEQ ID NO 6	127	5
SEQ ID NO 7	130	5
SEQ ID NO 8	132	5

SEQ ID NO	Péptido	MMC ₉₉ µM en medio BHI al 1 %
SEQ ID NO 4	116	10
SEQ ID NO 5	126	10
SEQ ID NO 9	150	10
SEQ ID NO 10	152	10
SEQ ID NO 11	153	10
SEQ ID NO 12	154	10
SEQ ID NO 13	155	10
SEQ ID NO 14	156	20
SEQ ID NO 15	157	20
SEQ ID NO 16	159	20

Ejemplo 2. Cribado peptídico 2

Se sometieron las actividades de TNF- α de los péptidos de esta primera ronda de cribado a análisis multivariante usando el software PropHECY™ (Saromics, Lund, Suecia). Se computaron un gran número de descriptores para cada péptido. Se correlacionaron entonces las actividades de TNF- α con estos descriptores. Se crearon modelos de regresión separados para la clase peptídica. Además, se crearon también modelos globales que consideraban la clase peptídica. El análisis del modelo de regresión sugería varias variables que contribuían a una actividad de TNF- α mejorada. Se sugirieron nuevos péptidos para la segunda ronda de cribado por la clase peptídica, basados principalmente en la modulación de carga, anfipatía e hidrofobia. Basándose en los nuevos diseños, se ordenaron aproximadamente 80 péptidos como una colección PEPscreen (Sigma) y se ensayaron tanto la actividad antiinflamatoria como antimicrobiana.

Tabla 4. Lista de péptidos ensayados en el cribado 2

Péptido 224	FQWQRNMRKVRGSRRRRG	SEQ ID NO: 17
Péptido 256	FQWQRNMRKVRGSRRRRG	SEQ ID NO: 18
Péptido 257	FQWKRRMRKVRGSKKKKG	SEQ ID NO: 19
Péptido 258	FQWKRRMRKVRGSLRRWG	SEQ ID NO: 20
Péptido 259	RQWKRRMRKVFHSYRRMG	SEQ ID NO: 21
Péptido 260	KQWKRWMRKVFVSLRRVG	SEQ ID NO: 22
Péptido 261	RQWKRVMRKVFGRWWRG	SEQ ID NO: 23
Péptido 262	KQWKRRMRKVFSVRRWFL	SEQ ID NO: 24
Péptido 263	FRWKRRMRKVRGSRRRQG	SEQ ID NO: 25
Péptido 264	FQWKRRMRKVRSGRRRGR	SEQ ID NO: 26
Péptido 265	FRQWKRWMRKVFHSWRRW	SEQ ID NO: 27
Péptido 266	FQWKRRKRMRGSRVRRRG	SEQ ID NO: 28
Péptido 268	GRRRRSGRVKRMRRKQWF	SEQ ID NO: 29
Péptido 269	GRRRRSFQWKRRMRKVR	SEQ ID NO: 30
Péptido 270	FWWKRAMRKVRLSRRRRG	SEQ ID NO: 31

Péptido 271	FWWKRAMRKVRNSRRRRG	SEQ ID NO: 32
Péptido 272	VYYKRTARKARGSRRRRG	SEQ ID NO: 33
Péptido 273	FWWKKAMKKVKGTRRRRG	SEQ ID NO: 34
Péptido 276	CFLWRRNMRKVRGSRRRRG	SEQ ID NO: 35
Péptido 282	FQWQRNMRKVRGSRRRRG	SEQ ID NO: 36

Se midió la actividad antiinflamatoria como inhibición de la producción de TNF- α en células THP-1 estimuladas por LPS

5 Se mantuvo la estirpe celular THP-1 (TIB-202; ATCC, Manassas, VA, EE.UU.) correspondiente a monocitos humanos, en RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (FBS; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), piruvato de sodio 1 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y HEPES 20 mM (PAA, Laboratories GmbH, Pasching, Austria).

10 Se ajustó la densidad celular a 10^6 células/ml y se añadieron 100 μ l de la suspensión por pocillo a placas de cultivo celular de 96 pocillos (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). Se trataron las células con PMA 10 ng/ml (12-miristato 13-acetato de forbol; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) durante 48 horas para diferenciar los monocitos en células similares a macrófagos. Después de ello, se estimularon las células mediante la adición de lipopolisacárido 0,1 ng/ml (LPS; serotipo de *E. coli* O55:B5; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) al medio especificado anteriormente excepto por contener FBS termoinactivado al 5 %. 30 minutos después de la adición de LPS, se añadieron péptidos (40 μ M, 10 μ M y 4 μ M) por triplicado. Después de 6 horas de incubación, se recogieron los sobrenadantes celulares, se centrifugaron y se mantuvieron congelados a -20 °C hasta analizar el contenido de TNF- α por ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.). Se presentan los resultados como secreción relativa media (%), fijándose el nivel de TNF- α estimulado sin péptido en 100 % y fijándose la secreción basal en 0 % (Tabla 5).

Tabla 5. Efectos antiinflamatorios de los péptidos ensayados en el cribado 2

SEQ ID NO	Péptido	TNF- α a péptido 40 μ M	TNF- α a péptido 10 μ M	TNF- α a péptido 4 μ M
SEQ ID NO 17	224	113,4 %	nd	nd
SEQ ID NO 18	256	100,5 %	nd	nd
SEQ ID NO 19	257	62,8 %	109,1 %	114,5 %
SEQ ID NO 20	258	39,8 %	115,4 %	110,4 %
SEQ ID NO 21	259	33,0 %	108,5 %	108,4 %
SEQ ID NO 22	260	5,9 %	74,0 %	99,3 %
SEQ ID NO 23	261	24,5 %	56,2 %	86,0 %
SEQ ID NO 24	262	12,1 %	45,3 %	79,6 %
SEQ ID NO 25	263	61,4 %	100,1 %	93,6 %
SEQ ID NO 26	264	87,2 %	nd	nd
SEQ ID NO 27	265	13,8 %	31,1 %	87,0 %
SEQ ID NO 28	266	101,1 %	nd	nd
SEQ ID NO 29	268	74,4 %	129,7 %	114,5 %
SEQ ID NO 30	269	66,2 %	113,8 %	115,7 %
SEQ ID NO 31	270	23,1 %	71,5 %	96,2 %
SEQ ID NO 32	271	24,5 %	74,4 %	101,7 %
SEQ ID NO 33	272	102,8 %	nd	nd

SEQ ID NO	Péptido	TNF- α a péptido 40 μ M	TNF- α a péptido 10 μ M	TNF- α a péptido 4 μ M
SEQ ID NO 34	273	52,7 %	78,6 %	86,2 %
SEQ ID NO 35	276	38,8 %	135,3 %	111,0 %
SEQ ID NO 36	282	114,8 %	nd	nd

nd= no realizado

Se midió la actividad antimicrobiana como el efecto bactericida sobre *S. aureus* usando la concentración microbicida mínima, MMC₉₉, ensayo)

5 Se transfirieron *S. aureus* (n° 1800; CCUG, Gotemburgo, Suecia) cultivadas en placas de agar sanguíneo [agar Columbia (Oxoid, Basingstoke, RU) suplementado con sangre de caballo defibrinada al 5 % (National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Suecia)] a caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI al 3,7 %; Difco, BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) y se incubaron en un agitador a 250 rpm +37° C durante una noche. Se diluyó después de ello el cultivo 1:10 con caldo BHI reciente y se incubó durante 2 horas adicionales para alcanzar el crecimiento en fase logarítmica. Se sedimentaron las bacterias y se suspendieron en medio BHI al 1 % (caldo BHI diluido 100 veces en agua ultrapura) hasta una concentración de 10⁷ bacterias/ml estimada midiendo la densidad óptica a 600 nm.

10 Se diluyeron en serie los péptidos en etapas de dos veces desde 400 μ M hasta 0,78 μ M en medio BHI al 1 % o bien en fluido de herida simulado termoinactivado al 50 % [SWF, que contiene 1 parte de peptona al 0,1 % (Oxoid, Basingstoke, RU) en solución salina y 1 parte de suero fetal bovino, diluido 2 veces en agua ultrapura].

15 Se incubaron después de ello los péptidos (100 μ l) con bacterias (5 μ l a 10⁷ bact./ml) durante 2 horas a +37 °C. Se pusieron gotas (5 μ l) de la suspensión en placas de agar sanguíneo. Se incubaron las placas de agar sanguíneo durante una noche a 37 °C. Se registraron los valores de MMC₉₉, concretamente la concentración de péptido mínima necesaria para conseguir un 99 % de reducción de las bacterias viables (Tabla 6). Se confirmó la concentración de la suspensión bacteriana usada en el ensayo por los recuentos viables en placas de agar sanguíneo.

Tabla 6. Efectos antibacterianos de los péptidos ensayados en el cribado 2

SEQ ID NO	Péptido	MMC ₉₉ μ M en medio BHI al 1 %	MMC ₉₉ μ M en SWF al 50 %
SEQ ID NO 17	224	12,5	400
SEQ ID NO 18	256	12,5	200
SEQ ID NO 19	257	6,25	200
SEQ ID NO 20	258	6,25	12,5
SEQ ID NO 21	259	6,25	25
SEQ ID NO 22	260	6,25	25
SEQ ID NO 23	261	12,5	12,5
SEQ ID NO 24	262	6,25	6,25
SEQ ID NO 25	263	6,25	100
SEQ ID NO 27	265	6,25	12,5
SEQ ID NO 29	268	6,25	200
SEQ ID NO 30	269	6,25	200
SEQ ID NO 31	270	6,25	12,5
SEQ ID NO 32	271	6,25	6,25
SEQ ID NO 34	273	6,25	12,5
SEQ ID NO 35	276	6,25	12,5
SEQ ID NO 36	282	12,5	200

20 nd= no realizado

Los péptidos

El molde para los péptidos es un péptido sustituido con arginina. Los péptidos discutidos a continuación son de longitudes similares y el gráfico de dispersión de la Figura 3 muestra dos agrupamientos de péptidos con actividades de TNF- α pronunciadas a 40 μ M. El péptido molde era casi inactivo a la misma concentración, pero es activo a mayores concentraciones.

Tabla 7: Los péptidos

Posición:	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Molde:	x	F	Q	W	Q	R	N	M	R	K	V	R	G	S	R	R	R	R	G
AGRUPAMIENTO A																			
259:		R			K		R					F	H		Y				M
260:		K			K		W					F	V		L				V
261:		R			K		V					F	G			W	W		
262:		K			K		M					F	S	V			W	F	L
265:		F	R		K		W					F	H		W			W	-
AGRUPAMIENTO B																			
127:					K		R												
130:		W			K		A												
132:			W		K		A												
257:					K		R							K	K	K	K		
258:					K		R							L				W	
263:			R		K		R											Q	
264:					K		R					S	G					G	R
270:		W			K		A					L							
271:		W			K		A					N							
273:		W			K	K	A		K			K		T					

Los residuos en negrita indican los tipos de aminoácido que contribuyen positivamente a la actividad. La secuencia de molde es parcialmente (pos. 1-12) de lactoferrina humana madura y corresponde a las posiciones aminoacídicas 20-31. Las posiciones 13-18 corresponden a la secuencia inversa en posición 1-5 en lactoferrina humana madura.

La Tabla 7 muestra el gran número de mutaciones tanto en el agrupamiento A como B. Se ve claramente que los dos grupos de péptidos tanto se superponen como se complementan entre sí con respecto a las mutaciones posicionales. Los péptidos activos del agrupamiento A tienen todos aminoácidos cargados, R o K, en posición 1 y 4 y un aminoácido hidrófobo, F, en posición 11. Se encuentran en posición 6 tanto los aminoácidos hidrófobos V, M y W como el aminoácido cargado R. Las posiciones 14, 16 y 17 tienen todas aminoácidos no cargados hidrófobos, F, M, V o W, que son diferentes del molde que tiene R en las mismas posiciones. El agrupamiento B muestra que Q en posición 2 puede reemplazarse por cualquier residuo hidrófobo W, L o aminoácido cargado R.

Las modificaciones realizadas en el agrupamiento A y el agrupamiento B son complementarias entre sí en algunas de las posiciones. Por tanto, la posición -1 puede tener un aminoácido hidrófobo C, F o W, añadido o uno polar, S. El aminoácido en posición 12, que es G para el péptido de molde, puede intercambiarse por una serie de residuos diferentes, tanto polares como hidrófobos, ejemplificados con H, V, S, N, L. La situación es similar en la posición 13, donde S del molde puede intercambiarse por V, G y T. Los péptidos activos pueden tener tanto aminoácidos hidrófobos como cargados en posiciones 14, 15, 16, 17 y 18. En posición 17, se encuentran también péptidos activos con G y Q.

Finalmente, en principio todos los péptidos activos pertenecientes al agrupamiento A y B exhiben altos efectos antimicrobianos incluso a concentraciones salinas cercanas a la fisiológica.

Ejemplo 3. Efecto antimicrobiano *in vitro*

Se analizaron los efectos antimicrobianos del péptido 265 (SEQ ID NO: 27) por el ensayo de MMC₉₉ (concentración microbicida mínima) contra *S. aureus* (CCUG 1800), MRSA (CCUG 41879), *P. aeruginosa* (ATCC 15442), *E. coli* (CCUG 31246), *S. pyogenes* (CCUG 4207), *P. acnes* (CCUG 1794T), *S. epidermidis* (ATCC12228), *K. pneumoniae* (ATCC 13883), *A. baumannii* (ATCC 19606) y *C. albicans* (ATCC 64549). Se adquirieron los péptidos en Biopeptide Company (San Diego, CA, EE.UU.) y Bachem AG (Bubendorf, Suiza) y los resultados se presentan en la Tabla 8A y 8B respectivamente.

5 Se diluyó en serie el péptido en dos medios de ensayo diferentes, medio BHI al 1 % (medio de infusión de cerebro y corazón) o fluido de herida simulado (SWF) termoinactivado al 50 %, y después de ello se incubó con los microorganismos durante 2 horas. Se pusieron gotas de la suspensión en placas de agar sanguíneo. Se registraron los valores de MMC₉₉, concretamente la concentración peptídica mínima necesaria para conseguir un 99 % de reducción de los microorganismos viables. Como se presenta en la Tabla 8, el péptido tiene la capacidad de destruir microorganismos que aparecen frecuentemente en infecciones.

Tabla 8A. Efecto antimicrobiano *in vitro* medido como MMC₉₉ (µg/ml)

	Péptido 265 (SEQ ID NO 27)	
	BHI al 1 %	SWF al 50 %
<i>S. aureus</i>	4	8
MRSA	6	50
<i>P. aeruginosa</i>	4	134
<i>E. coli</i>	5	67
<i>P. acnes</i>	<3	50
<i>S. pyogenes</i>	<3	25

Tabla 8B. Efecto antimicrobiano *in vitro* medido como MMC₉₉ (µg/ml)

	Péptido 265 (SEQ ID NO 27)	
	BHI al 1 %	SWF al 50 %
<i>S. epidermidis</i>	<2	6
<i>K. pneumoniae</i>	3	25
<i>A. baumannii</i>	<2	12
<i>C. albicans</i>	6	100

10

Ejemplo 4. Efecto antimicrobiano *in vivo* en el modelo de herida por extirpación en ratas

15 Se investigaron los efectos antimicrobianos *in vivo* del péptido 265 (SEQ ID NO: 27) en un modelo de herida por extirpación en ratas. Se inocularon las heridas con *S. aureus* resistente a metilina (MRSA) durante 2 horas, seguido de una sola administración de péptido o control (H₂O) durante 2 horas antes de la terminación y recolección de las bacterias. El péptido mostraba un pronunciado efecto antimicrobiano (Figura 4).

Ejemplo 5. Efecto antimicrobiano *in vivo* en heridas infectadas en cerdo

20 Se investigaron los efectos antimicrobianos del péptido 265 (SEQ ID NO: 27) en un modelo *ex vivo* en piel de cerdo. Se inocularon las heridas con *S. aureus* en presencia de PBS/suero 50/50. 2 horas después de la inoculación, se trataron las heridas con una sola administración del péptido o placebo (H₂O). 4 horas después del tratamiento, se recolectaron las bacterias y se determinaron los recuentos viables de cada herida. Los resultados confirman los hallazgos en rata que indican que el péptido es un agente antiinfeccioso altamente eficaz cuando se aplica localmente (Figura 5).

REIVINDICACIONES

1. Un péptido seleccionado de cualquiera de los péptidos

R-Q-W-K-R-R-M-R-K-V-F-H-S-Y-R-R-M-G	(SEQ ID NO: 21);
K-Q-W-K-R-W-M-R-K-V-F-V-S-L-R-R-V-G	(SEQ ID NO: 22);
R-Q-W-K-R-V-M-R-K-V-F-G-S-R-W-W-R-G	(SEQ ID NO: 23);
K-Q-W-K-R-M-M-R-K-V-F-S-V-R-R-W-F-L	(SEQ ID NO: 24);
F-R-Q-W-K-R-W-M-R-K-V-F-H-S-W-R-R-W	(SEQ ID NO: 27);
F-Q-W-K-R-R-M-R-K-V-R-G-S-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 6);
W-F-Q-W-K-R-A-M-R-K-V-R-G-S-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 7);
F-W-W-K-R-A-M-R-K-V-R-G-S-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 8);
F-Q-W-K-R-R-M-R-K-V-R-G-S-K-K-K-K-G	(SEQ ID NO: 19);
F-Q-W-K-R-R-M-R-K-V-R-G-S-L-R-R-W-G	(SEQ ID NO: 20);
F-R-W-K-R-R-M-R-K-V-R-G-S-R-R-R-Q-G	(SEQ ID NO: 25);
F-W-W-K-R-A-M-R-K-V-R-L-S-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 31);
F-W-W-K-R-A-M-R-K-V-R-N-S-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 32); y
F-W-W-K-K-A-M-K-K-V-K-G-T-R-R-R-R-G	(SEQ ID NO: 34).
- 5 2. Un péptido según la reivindicación 1, siendo dicho péptido F-R-Q-W-K-R-W-M-R-K-V-F-H-S-W-R-R-W (SEQ ID NO: 27).
3. Un péptido según la reivindicación 1 o 2, en el que un COOH libre en el extremo carboxiterminal se ha transformado en CONH₂.
- 10 4. Un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que un grupo NH₂ libre del extremo aminoterminal se ha transformado en el grupo amida CH₃CONH.
5. Un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para uso como medicamento.
6. Un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para uso en el tratamiento y/o la prevención de infecciones, inflamaciones, tumores, dolor, heridas y cicatrices.
- 15 7. Un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para uso en el tratamiento, la profilaxis y/o la prevención de impétigo, heridas por quemaduras, abrasiones infectadas, laceraciones infectadas, excoiaciones, erisipelas, celulitis, abscesos, forúnculos, ántrax, heridas suturadas, infecciones de sitio quirúrgico, dermatosis infectadas secundariamente; dermatitis atópica, psoriasis y dermatitis de contacto alérgica, mordeduras animales e infección relacionada con catéter.
- 20 8. Uso de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de infecciones, inflamaciones, tumores, dolor, heridas y cicatrices.
9. Una composición farmacéutica que comprende un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

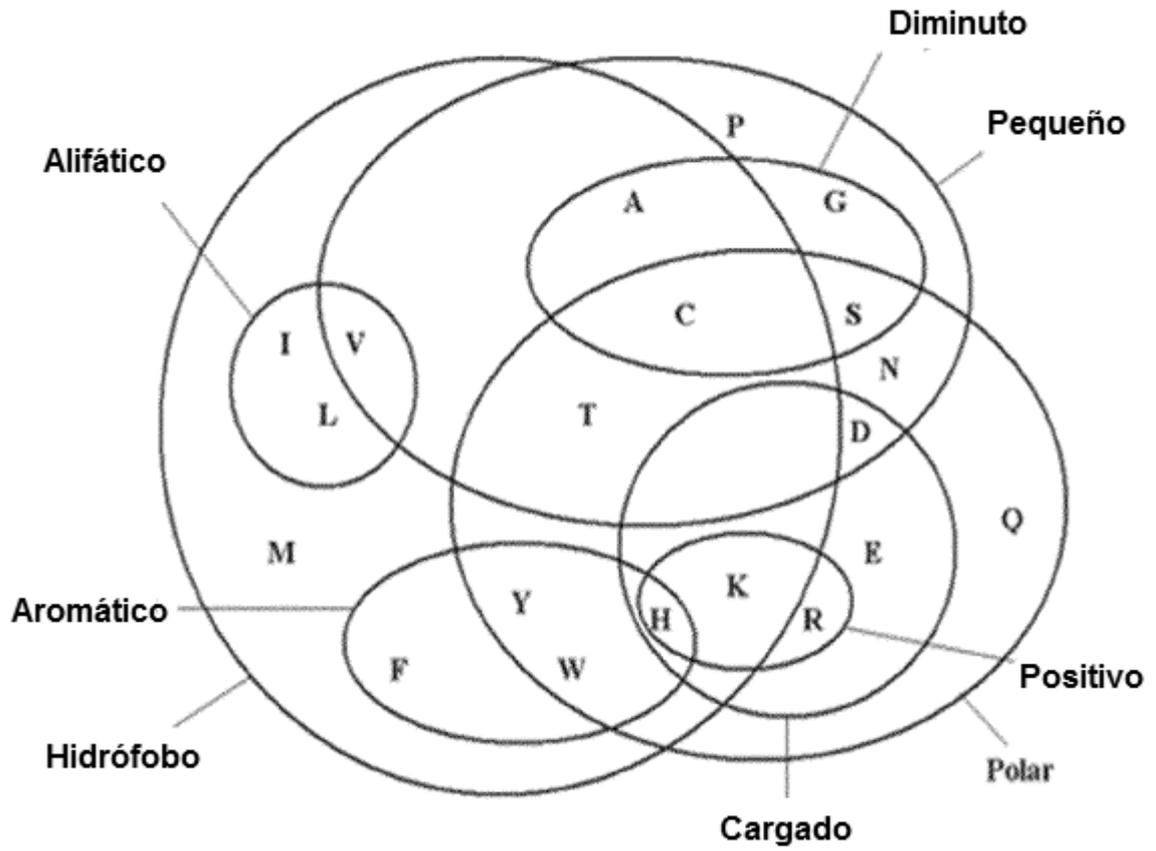


Figura 1

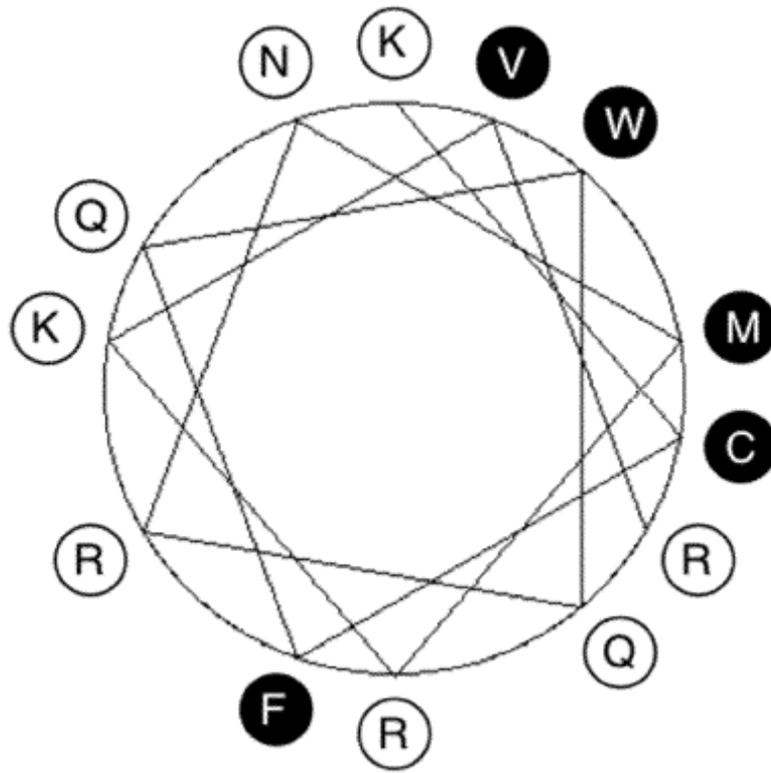


Figura 2

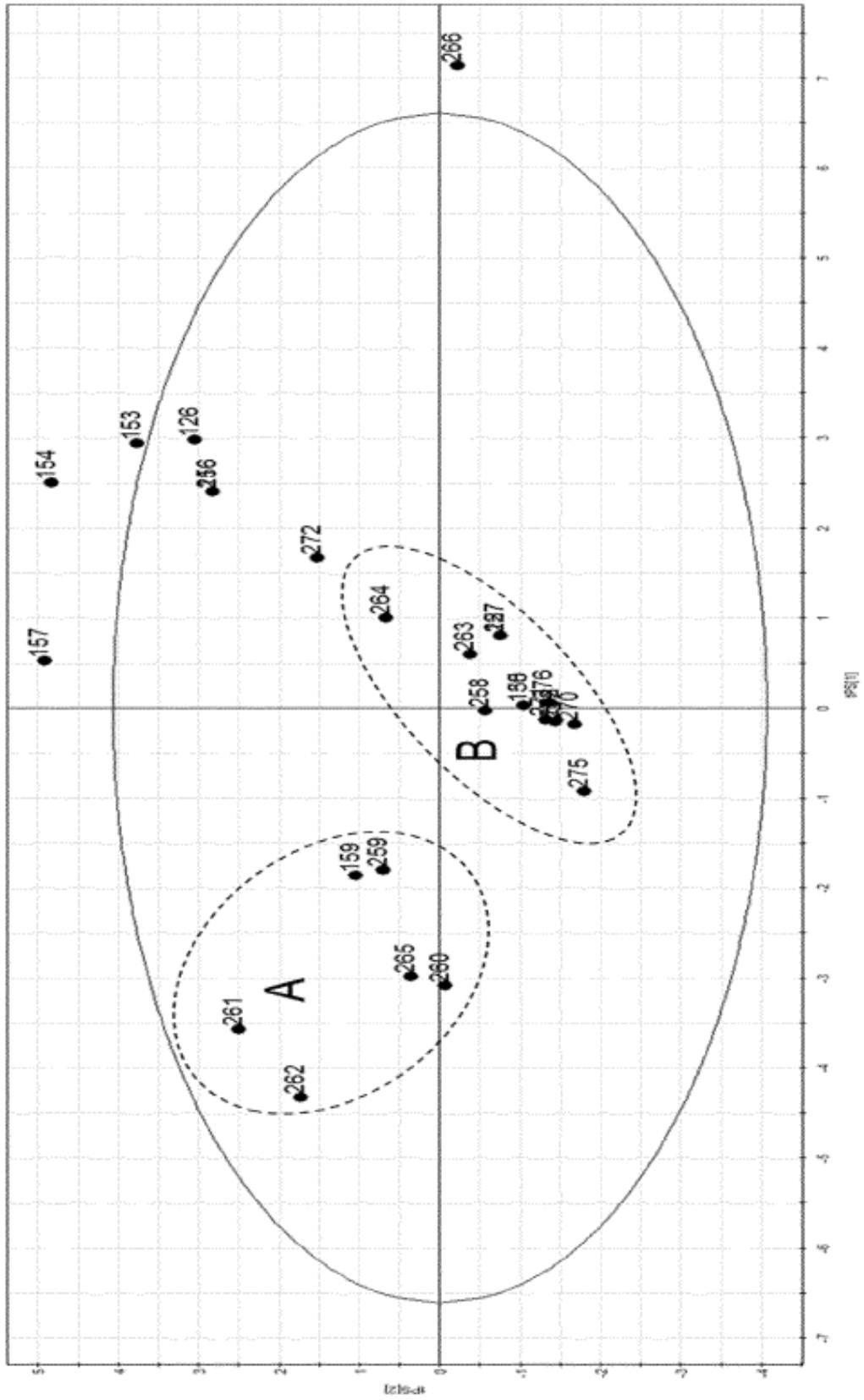


Figura 3

A

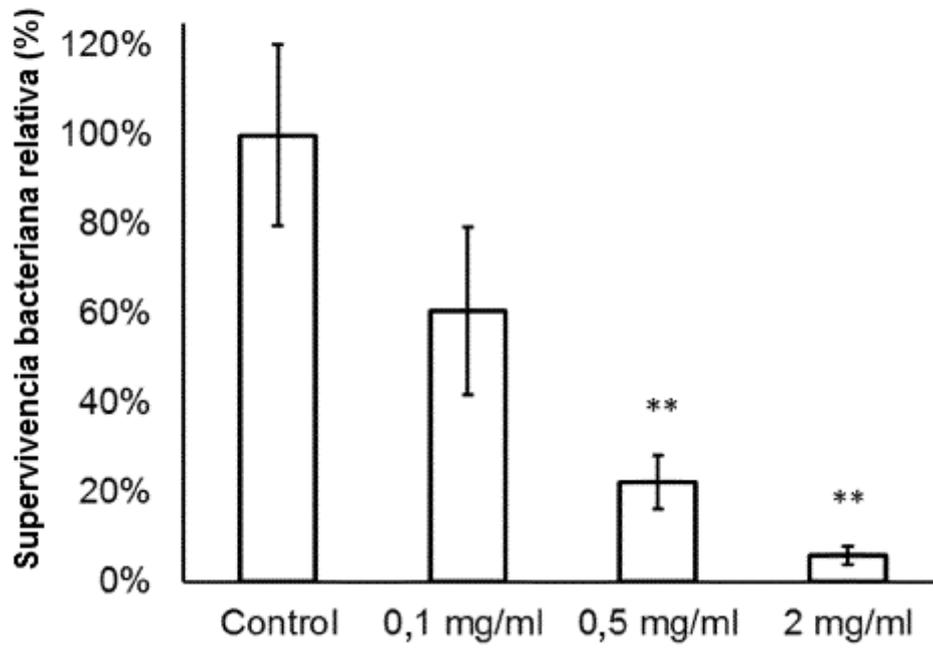


Figura 4

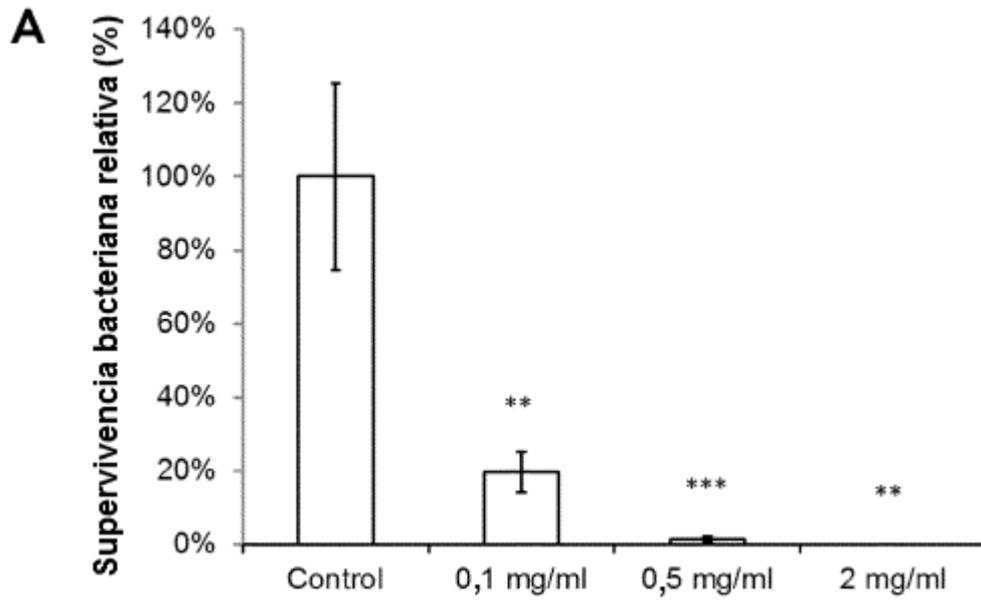


Figura 5