

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 421**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16	(2006.01)
A61K 9/08	(2006.01)
C07K 14/195	(2006.01)
A61P 17/00	(2006.01)
A61P 27/02	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2014 PCT/EP2014/058139**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14173899**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2014 E 14718621 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2988766**

54 Título: **Composiciones tópicas que comprenden variantes de pliegue-OB**

30 Prioridad:

22.04.2013 FR 1353662

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

13.10.2017

73 Titular/es:

**AFFILOGIC (100.0%)
"bio Ouest", 21 rue la Noue Bras de Fer
44200 Nantes, FR**

72 Inventor/es:

KITTEN, OLIVIER

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 637 421 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

Composiciones tópicas que comprenden variantes de pliegue-OB

5 La invención se refiere al ámbito de la preparación de composiciones tópicas para un uso cosmético o terapéutico, que contienen principios activos relacionados con dianas de interés.

10 Existe un cierto número de enfermedades dermatológicas, tales como eczemas, psoriasis, liquen plano y dermatosis ampollas autoinmunes, o cánceres de piel (melanoma). Con el fin de tratar estas enfermedades, es deseable poder disponer de composiciones tópicas, es decir, que se aplican directamente sobre las lesiones de la piel (o del cuero cabelludo) y que actúan localmente en el entorno en el que se aplican.

15 Por otro lado, dichas composiciones tópicas son deseables para el tratamiento de enfermedades oculares, tanto relacionadas con trastornos metabólicos (particularmente debidos a la edad) como con infecciones oculares (conjuntivitis graves, queratitis y úlceras corneales).

20 Cualquiera que sea la enfermedad, generalmente existe una diana de interés terapéutico sobre el cual son activos los medicamentos. Éste puede ser un receptor celular o una proteína de superficie de un microorganismo. De forma general, parece deseable disponer de composiciones que permitan la aplicación de los principios activos que actúan sobre las dianas de interés terapéutico directamente en el lugar de acción, evitando lo máximo posible el paso por la vía sistémica. Sin embargo, los anticuerpos no atraviesan fácilmente la barrera de la piel o de la córnea.

25 La solicitud WO 2007/139397 describe la utilización de bancos de proteínas de pliegue-OB en las cuales se modifica el dominio OB mediante la introducción de mutaciones en este dominio de unión de la proteína a su ligando natural.

30 La solicitud WO 2008/068637 describe la utilización de un banco basado en la proteína Sac7d para la obtención de ligandos que presentan afinidad por las dianas de interés. El método descrito en el documento WO 2008/068637 comprende la generación de bancos combinatorios que contienen una pluralidad de moléculas de ADN que tienen todas la misma secuencia, salvo la presencia de ciertas mutaciones aleatorias que dan lugar a la producción de variantes de una proteína natural, que presenta mutaciones en ciertos aminoácidos del sitio de unión de esta proteína al pliegue-OB natural. En particular, en el marco del documento WO 2008/068637, la proteína con el pliegue-OB natural es una proteína Sac7d, en la que se introducen mutaciones para generar una variabilidad, particularmente en los aminoácidos elegidos entre K7, Y8, K9, K21, K22, W24, V26, M29, S31, T33, T40, R42, A44, S46, o en otros aminoácidos, tales como V26, G27, K28, M29, S31, R42, A44, S46, E47 y K48. Estos aminoácidos están basados en la secuencia de la Sac7d, tal como la representada por la SEQ ID N° 1.

40 La solicitud de patente WO 2012/150314 presenta la portabilidad de mutaciones de una proteína de la familia Sac7d hacia otra proteína de la misma familia. Esta portabilidad vuelve a crear un mutante de otra proteína de la familia Sac7d a partir de un mutante de una proteína de dicha familia, que se ha podido obtener particularmente mediante la utilización del procedimiento del documento WO 2008/068637.

45 La familia Sac7d se define con referencia a La familia Sac7d se corresponde con una familia de proteínas de 7 kDa que se unen al ADN aisladas a partir de bacterias extremófilas. Estas proteínas y esta familia se describen particularmente en el documento WO 2008/068637. Así, en el marco de la presente invención, una proteína pertenece a la familia Sac7d cuando presenta una secuencia correspondiente a la secuencia SEQ ID N° 8. Esta familia comprende particularmente las proteínas Sac7d o Sac7e procedentes de *Sulfolobus acidocaldarius*, la Sso7d procedente de *Sulfolobus solfataricus*, la DBP 7 procedente de *Sulfolobus tokodaii*, la Ssh7b procedente de *Sulfolobus shibatae*, la Ssh7a procedente de *Sulfolobus shibatae*, y la p7ss procedente de *Sulfolobus solfataricus*.

50 Las proteínas de pliegue-OB son conocidas en la técnica. Particularmente se describen en los documentos mencionados en líneas anteriores, así como en Arcus (Curr Opin Struct Biol. Dic. de 2002; 12 (6): 794-801). El pliegue OB se presenta en forma de un cilindro que presenta cinco láminas beta (β). La mayor parte de las proteínas del pliegue-OB utiliza la misma interfase de unión de su ligando natural, que puede ser un oligosacárido, un oligonucleótido, una proteína, un ion metálico o un sustrato catalítico. Esta interfase de unión comprende principalmente los restos situados en las láminas beta. Algunos de los restos situados en los bucles también pueden estar implicados en la unión de una proteína de pliegue-OB a su ligando natural. Así, las solicitudes WO 2007/139397 y WO 2008/068637 y el documento Arcus (2002, *op. cit.*) describen los dominios de unión de las proteínas de pliegue-OB a su ligando natural. Así, el documento WO 2008/068637 describe precisamente la forma de identificar el dominio de unión de una proteína de pliegue-OB.

60 Al superponer varias secuencias y estructuras tridimensionales de las proteínas que presentan dominios de pliegue-OB utilizando las páginas Web WU-Blast2 (<http://www.ebi.ac.uk/blast2/index.html>) (Lopez y al., 2003, Nucleic Acids Res 31, 3795-3798), T-COFFEE (<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>) (Notredame y al., 2000, J Mol Biol 302, 205-217) y DALI lite (<http://www.ebi.ac.uk/DaliLite/>) (Holm y Park, 2000, Bioinformatics 16, 566-567), se pueden identificar las posiciones de los dominios de unión, y particularmente los aminoácidos que pueden ser modificados. Tomando como referencia la secuencia de la Sac7d (SEQ ID N° 1), se trata de los restos V2, K3, K5,

K7, Y8, K9, G10, E14, T17, K21, K22, W24, V26, G27, K28, M29, S31, T33, D36, N37, G38, K39, T40, R42, A44, S46, E47, K48, D49, A50 y P51. Siempre con esta secuencia Sac7d como referencia, los restos que pueden ser suprimidos son: A59, R60, A61 y E64.

5 La identificación de los dominios de unión de otras proteínas de pliegue-OB puede llevarse a cabo como se describe en el documento WO 2008/068637. Esta solicitud describe que se puede realizar una superposición de las estructuras tridimensionales de proteínas o de dominios de pliegues-OB (en esta solicitud se han utilizado 10 dominios, incluyendo la Sac7d), mediante la utilización de la página Web DALI (<http://www.ebi.ac.uk/dali/Interactive.html>) (Holm y Sander, 1998, Nucleic Acids Res 26, 316-319). Así, es fácil
10 identificar, para cualquier proteína (o cualquier dominio) de pliegue-OB, los aminoácidos implicados en el sitio de unión y que se corresponden con los aminoácidos de la Sac7d mencionados más arriba.

Las enseñanzas del documento WO 2008/068637 indican igualmente que eventualmente se pueden insertar aminoácidos en los bucles de las proteínas de pliegue-OB, particularmente de las proteínas de la familia Sac7d, en particular pueden realizarse inserciones de 1 a 15 restos de aminoácidos en el bucle 3 (tal como se define en las
15 figuras 1b y 2 del documento WO 2008/068637), por ejemplo, en la región de los restos 25 a 30 de la Sac7d, preferentemente entre los restos 27 y 28, pueden realizarse inserciones de 1 a 15 restos de aminoácidos en el bucle 4 (tal como se define en las figuras 1b y 2 del documento WO 2008/068637), por ejemplo, en la región de los restos 35-40 de la Sac7d, preferentemente entre los restos 37 y 38, y pueden realizarse inserciones de 1 a 20 restos en el
20 bucle 1 (tal como se define en las figuras 1b y 2 del documento WO 2008/068637), por ejemplo, en la región de los restos 7 a 12 de la Sac7d, preferentemente entre los restos 9 y 10.

Por extensión, en el marco de la presente solicitud, el término « proteína de pliegue-OB » comprende igualmente los dominios que presentan un pliegue-OB que se puede aislar a partir de proteínas más complejas. Estos dominios de
25 pliegue-OB se describen particularmente con más detalle en las solicitudes WO 2007/139397 y WO 2008/068637.

El interés del método descrito en el documento WO 2008/068637 es que permite la obtención de variantes de las proteínas de pliegue-OB mediante el cribado de bancos combinatorios que contienen o que expresan una pluralidad de variantes en las cuales un cierto número de aminoácidos han sido « aleatorizados », es decir, sustituidos por un
30 aminoácido aleatorio. El cribado de estos bancos permite la identificación de las variantes de estas proteínas que se unen de forma específica, generalmente con una fuerte afinidad (la solicitud WO 2008/068637 describe, en efecto, unas afinidades de orden nanomolar), a una diana de interés, diferente del ligando natural de la proteína natural a partir de la cual se ha generado el banco combinatorio.

35 Los inventores han demostrado que las proteínas de pliegue-OB son capaces de atravesar la barrera ocular o de la piel y pueden ser utilizadas por lo tanto en composiciones tópicas. Preferentemente se utiliza una variante de una proteína de pliegue-OB, que se une a una diana de interés, estando dicha diana de interés implicada en una patología, particularmente oftalmológica o dermatológica.

40 La presente invención se refiere por lo tanto a una composición tópica que comprende una proteína de pliegue-OB o a una variante de una proteína natural de pliegue-OB, presentando dicha variante entre 5 y 32 restos mutados en la interfase de unión de dicha proteína natural de pliegue-OB a su ligando natural. En un modo de realización particular, dicha variante se une de forma específica a una diana de interés diferente de dicho ligando natural. Esta variante se ha identificado por lo tanto generalmente a través de un método tal como el que se describe en el
45 documento WO 2008/068637 o en el documento WO 2007/139397. De hecho, la utilización de los métodos descritos en estas dos solicitudes de patente permite generalmente la identificación de las variantes de cualquier proteína de pliegue-OB que se una a cualquier diana de interés. Generalmente, esta composición también contiene un excipiente de utilización tópica, farmacéutica o cosméticamente aceptable

50 Dado lo visto en líneas anteriores, dicha proteína natural de pliegue-OB engloba también los dominios de pliegue-OB. De una forma preferida, la variante utilizada en el marco de la presente invención contiene como máximo 150 aminoácidos, de una forma más preferida como máximo 100 aminoácidos. En un modo de realización particular, contiene como máximo 70 aminoácidos.

55 El número de restos mutados en dicha variante (con respecto a la proteína natural) está comprendido entre 5 y 32. En otros modos de realización, estas variantes presentan preferentemente al menos 5, de una forma más preferida al menos 8, de una forma aún más preferida al menos 10, mas generalmente menos de 32, de una forma más preferida menos de 24, de una forma aún más preferida menos de 20 o menos de 15 aminoácidos sustituidos con respecto a la proteína (o al dominio) de pliegue-OB natural. Se prefiere cuando 8, 9, 10, 11, 12 o 13 aminoácidos
60 están mutados con respecto a la proteína natural. Estos aminoácidos mutados están localizados en el sitio de unión de la proteína de pliegue-OB con su ligando natural. Generalmente están repartidos en el conjunto de este dominio de unión. Dada la estructura de este dominio de unión, algunos restos mutados se encuentran en una (generalmente en varias, particularmente dos o tres) lámina beta.

65 En un modo de realización particular, estas variantes pueden comprender igualmente inserciones de aminoácidos en los bucles que unen las láminas beta del pliegue-OB. Así, se pueden introducir entre 1 y 15 aminoácidos en el bucle

1 y/o en el bucle 4 y/o en el bucle 3 (estando numerados los bucles de la misma forma que en el documento WO 2008/068637.

5 En un modo de realización particular, dicha proteína natural de pliegue-OB se elige entre la Sac7d o la Sac7e procedentes de *Sulfolobus acidocaldarius*, la Sso7d procedente de *Sulfolobus solfataricus*, la DBP 7 procedente de *Sulfolobus tokodaii*, la Ssh7b procedente de *Sulfolobus shibatae*, la Ssh7a procedente de *Sulfolobus shibatae*, y la p7ss procedente de *Sulfolobus solfataricus*.

10 Se trata por lo tanto de la proteína con la que se compara la variante utilizada en la composición tópica de la presente invención.

Las diferentes secuencias de las proteínas Sac7d, Sso7d, Sac7e, Ssh7b, SSh7a, DBP7 y Sis7 están representadas por la SEQ ID N° 1 hasta la SEQ ID N° 7, respectivamente.

15 Una variante de una proteína de esta familia Sac7d se denomina nanofitina. La utilización de la invención se llevó así a cabo preferentemente con las variantes de las proteínas representadas por la SEQ ID N° 1 hasta la SEQ ID N° 7, en particular con las variantes de la Sac7d.

20 La concentración de la variante en la composición según la presente invención es generalmente superior a 10 ng/ml e inferior a 600 mg/ml. En efecto, en el caso de una aplicación ocular, no es necesario que la concentración de proteína sea muy importante. Por lo tanto, generalmente es inferior a 10 mg/ml, preferentemente inferior a 1 mg/ml, preferentemente inferior a 500 ng/ml, o a 250 ng/ml, incluso inferior a 100 ng/ml. Igualmente, si la concentración puede ser tan baja como de 10 ng/ml, preferentemente es superior a 50 ng/ml, incluso superior a 100 ng/ml.

25 En el marco de una utilización por vía tópica mediante una aplicación en la piel (o en el cuero cabelludo), la concentración de producto puede ser generalmente más importante. Así, la concentración será generalmente superior a 10 mg/ml, preferentemente superior a 50 mg/ml, de una forma más preferida superior a 100 mg/ml, de una forma aún más preferida superior a 200 mg/ml.

30 La variante presente en la composición según la invención se une de forma específica a una diana de interés. De hecho, se ha seleccionado, mediante un método tal como el descrito en el documento WO 2008/068637 o en el documento WO 2007/139397 por su especificidad de unión a esta diana de interés. Por otro lado, los métodos descritos en estas solicitudes de patente permiten la obtención de unas afinidades del orden micromolar (documento WO 2007/139397) o nanomolar (documento WO 2008/068637).

35 Las dianas de interés se eligen en función de la enfermedad que se desea tratar. Así, se puede citar cualquier antígeno, anticuerpo, proteína celular, proteína circulante, péptidos. Igualmente puede dirigirse a un principio activo de un medicamento o a un ácido nucleico en particular. Se contempla en particular que la diana de interés sea una interleucina, una citocina, un receptor de citocinas o de interleucinas, una proteína codificada por un oncogén, una proteína de superficie de un microorganismo o un lipopolisacárido de un microorganismo.

En un modo de realización particular, la composición tópica según la invención está destinada a aplicarse sobre la piel.

45 En otro modo de realización, esta composición tópica está destinada a una aplicación ocular.

La forma de la composición tópica según la invención es clásica, y depende particularmente del lugar de administración (piel u ojo).

50 Así, esta composición puede presentarse en una forma líquida (particularmente un colirio para una aplicación ocular), en pasta o sólida. Puede presentarse en forma de una crema, una pomada, un ungüento, un polvo, un gel, una emulsión (de aceite en agua o de agua en aceite), una espuma. Las formulaciones con base acuosa que contienen o no disolventes orgánicos (tales como etanol) están particularmente adaptadas para estas composiciones.

55 También puede presentarse en forma de un tampón embebido, una toallita, un pulverizador, un aerosol, una loción, una barra, un champú.

60 La composición según la invención puede presentarse igualmente en forma de una suspensión de microesferas o de nanoesferas o de vesículas lipídicas o poliméricas o de parches poliméricos y de hidrogeles que permiten una liberación controlada de los principios activos. Esta composición para aplicación tópica puede presentarse en forma anhidra, en forma acuosa o en forma de una emulsión.

65 En un modo de realización particular, la composición tópica según la invención se presenta en forma de un «parche» (sistema transdérmico). Dichos sistemas pueden permitir particularmente una liberación controlada del principio activo.

Dicho sistema comprende generalmente una lámina protectora (capa de soporte) impermeable a la sustancia de interés (la variante de la proteína de pliegue-OB en el marco de la presente invención), un depósito que contiene la sustancia de interés, un elemento que controla la liberación de la sustancia de interés sobre la piel a través de una capa adhesiva (sensible a la presión) que permite la sujeción del dispositivo sobre la piel, y una capa protectora extraíble antes de la aplicación en la piel. Es posible que el mismo elemento cumpla varias funciones (por ejemplo, depósito, control de la liberación y adhesión). Dichos dispositivos son conocidos en el estado de la técnica.

Las variantes de las proteínas de pliegue-OB utilizadas en la composición según la invención pueden ser producidas mediante una síntesis química en fase sólida o mediante una recombinación genética. La síntesis química puede llevarse a cabo, por ejemplo, con un sintetizador automático de péptidos del tipo Applied Biosystems, mod. 433A., o con la química Fmoc que utiliza el grupo fluoroenilmetiloxycarbonilo para la protección temporal de la función amino de los aminoácidos.

No obstante, se prefiere la producción de las variantes utilizables en el marco de la invención mediante ingeniería genética, en particular mediante la integración de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para dicho polipéptido en un vector de expresión. Este vector de expresión es introducido después en una célula hospedadora (las bacterias tales como *Escherichia coli* están particularmente adaptadas), que es cultivada en unas condiciones de cultivo que permiten la síntesis del polipéptido (particularmente se pueden utilizar promotores inducibles antes del polipéptido en el vector de expresión. Después se recupera el polipéptido sintetizado. Entonces se puede injertar cualquier tipo de molécula en el N- o el C-terminal del polipéptido.

El experto en la materia conoce los métodos de producción de polipéptidos, que se describen particularmente en la obra de Sambrook, Fritsch y Maniatis, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2ª edición.

La composición según la invención puede contener variantes de la proteína de pliegue-OB solas o con otros principios activos. Así, la composición también puede contener al menos un agente elegido entre agentes antibacterianos antiparasitarios, antifúngicos, antiinflamatorios, antipruriginosos, anestésicos, antivíricos, queratolíticos, anti-radicales libres, antiseborreicos, anticaspa, antiacnéicos y agentes que modulan la diferenciación y/o la proliferación y/o la pigmentación cutánea.

Esta composición puede contener igualmente un agente regulador del pH, particularmente para permitir la regulación del pH alrededor de un pH = 7.

Las variantes de la proteína de pliegue-OB también pueden estar fusionadas con una proteína activa, particularmente con el fin de aumentar su tiempo de semivida.

La composición según la invención también puede ser utilizada en un método de diagnóstico *in vivo*. Así, en un modo de realización particular, la variante de la proteína de pliegue-OB es acoplada a un agente de detección o de contraste. Esto permite particularmente un seguimiento de este agente de contraste y la determinación de los órganos en los cuales se une la variante de la proteína de pliegue-OB (lo que indica la presencia de la diana de interés).

La invención se refiere también a un procedimiento de preparación de una composición tópica, que comprende la etapa de mezclar una variante de una proteína natural de pliegue-OB con un excipiente de uso tópico, farmacéutica o cosméticamente aceptable.

En un modo de realización particular, dicha composición está destinada a ser aplicada sobre la piel. El excipiente permite, preferentemente, por lo tanto, la realización de una composición que pueda ser extendida sobre la piel, tal como una pomada, un ungüento o una loción.

En otro modo de realización, dicha composición está destinada a ser aplicada en el ojo, y los excipientes se eligen en consecuencia. Así se obtienen particularmente colirios, gotas oculares.

La invención se refiere igualmente a una composición tópica, según la invención, que contiene una variante de una proteína natural de pliegue-OB, presentando dicha variante entre 5 y 32 restos mutados en la interfase de unión de dicha proteína natural de pliegue-OB a su ligando natural, como medicamento. En este caso particular, dicha variante se une de forma específica a una diana de interés, que es una diana terapéutica.

La invención se refiere igualmente a una composición tópica según la invención para el tratamiento de una enfermedad o de un trastorno dermatológico u oftalmológico. En este modo de realización, la variante de la proteína de pliegue-OB utilizada se dirige (se une a) un factor etiológico de la enfermedad contemplado como una diana terapéutica o relacionada con dicha enfermedad.

En este modo de realización se selecciona por lo tanto una variante de la proteína de pliegue-OB, particularmente mediante los métodos de cribado descritos en el documento WO 2008/068637, que se une a una diana terapéutica

(efector o factor etiológico) implicada en la enfermedad o en el trastorno que se desea tratar, y esta variante se formula en una composición para una aplicación tópica.

5 La invención se refiere igualmente a una composición cosmética que comprende una composición tópica según la invención y a la utilización cosmética de una composición tópica según la invención.

10 La invención se refiere igualmente a un método de tratamiento de una enfermedad o de un trastorno dermatológico u oftalmológico, caracterizado por que se aplica localmente (sobre la piel o en el ojo, según las necesidades) una composición tópica según la invención, que contiene una proteína de pliegue-OB que se dirige, preferentemente, a un factor etiológico o a una diana terapéutica característica de dicha enfermedad o de dicho trastorno.

Ejemplos

15 En el conjunto de los ejemplos se utilizan nanofitinas, tales como las definidas más arriba, es decir, variantes de la Sac7d, obtenidas mediante el cribado de un banco combinatorio frente a una diana de interés, según un método similar al método descrito en el documento WO 2008/068637. El objetivo de estos ejemplos es demostrar que las proteínas de pliegue-OB, y particularmente las nanofitinas, son capaces de atravesar la barrera de la piel o de penetrar en el ojo, sin que esto dependa de la secuencia de la proteína, las secuencias de las nanofitinas y las dianas de interés no están indicadas.

20 Ejemplo 1: prueba de penetración de las nanofitinas a través de un modelo de piel humana

La prueba utilizada es la prueba de difusión de las células de Franz.

25 Les células de Franz sirven para la determinación, *ex vivo*, de la penetración cutánea de sustancias exógenas, y para medir de forma eficaz la velocidad de paso a través de las diferentes capas de la barrera cutánea de las moléculas constituyentes del principio activo depositado en la superficie de la piel.

30 Se deposita una solución que contiene la molécula que se va a estudiar en un compartimento « donante » del dispositivo, la molécula difunde a continuación a través de una membrana (la piel en este caso concreto) y es recogida en un compartimento « receptor ».

35 En la práctica, después de haber retirado la capa hipodérmica (tejido adiposo), el fragmento de piel es depositado sobre una célula de difusión, denominada célula de Franz. La cara profunda de la dermis está en contacto con una solución receptora que se supone que reemplaza al líquido intersticial de la piel. Se deposita una solución que contiene la molécula estudiada por encima de la piel. A unos intervalos de tiempo regulares, la solución receptora es sustituida con el fin de dosificar la molécula que ha atravesado la piel desgrasada y después es sustituida por una nueva solución.

40 La dosis de las sustancias presentes en la fase receptora recogida permite la determinación bien de la cantidad de moléculas que han atravesado la piel o bien del flujo (en nanogramo/cm²/hora).

45 Se han probado nanofitinas procedentes de cribados de un banco de variantes de la Sac7d por su afinidad frente a tres dianas de interés diferentes, implicadas en enfermedades cutáneas u oftalmológicas. Estas nanofitinas han sido producidas en un sistema bacteriano, y por lo tanto se unen a ligandos diferentes.

Se han utilizado 6 fragmentos de piel humana (espesor de 1 mm) descongelados procedentes del mismo donante.

50 El compartimento receptor se ha rellenado con PBS (tampón de fosfato salino, pH 7,4; 5,8 ml). La membrana se ha colocado en el medio receptor.

Se han depositado 100 µl de cada formulación que contiene 5 mg/ml de nanofitina en la membrana. La superficie de intercambio sería de 2 cm².

55 La temperatura se ha mantenido a 35 °C durante todo el experimento por el lado del receptor, lo que se corresponde con una temperatura de 32 °C en la superficie externa de la piel humana.

60 En cada periodo de toma de muestras siguiente: 0 h y 24 h, se han recogido 500 µl de líquido del lado del receptor, que ha sido sustituido por PBS.

En el lado del donante, en t = 24 h, la piel se ha lavado con 5 ml de PBS.

65 Al final del periodo de toma de muestras, se han retirado los 2 cm² de piel del dispositivo de células de Franz y se han colocado en un baño de ultrasonidos en 1 ml de PBS.

En cada una de las muestras recogidas se ha medido la concentración de nanofitinas mediante la tecnología de BioLayer Interferometry, que permite la medición de la interacción entre dos proteínas. En este caso concreto, el contenido en nanofitinas se mide mediante el reconocimiento de una etiqueta de poli-Histidina que les ha sido previamente acoplada.

5 Los resultados son los siguientes:

10 El porcentaje de nanofitinas recuperado en el lado del receptor varía, según la nanofitina, entre el 8 % y el 17 %. El patrón de permeabilidad de la piel utilizado es la cafeína, que en el contexto experimental presenta una permeabilidad del orden del 10 %.

Estos resultados demuestran que las nanofitinas efectivamente atraviesan la piel humana, y que este resultado no depende de la diana contra la cual se ha generado y a la que se une la nanofitina.

15 Ejemplo 2: prueba de penetración de las nanofitinas a través de córnea de conejo

Se han utilizado tres conejos macho (Fauve de Bourgogne).

20 El principio es el mismo que para la permeabilidad de la piel.

Se han utilizado 2 cámaras de reacción para el estudio de la permeabilidad de cada formulación (NF1, NF2 y NF3).

25 Se han colocado 3 ml de la formulación que contiene cada nanofitina en el lado del donante de las cámaras de reacción, y se han colocado 3 ml de PBS en el lado del receptor. Se han colocado tejidos corneales recién extraídos entre las dos semicámaras.

La temperatura se ha mantenido a 37 °C durante todo el estudio, y se ha proporcionado oxigenación mediante una perfusión continua de carbógeno (95 % de O₂, 5 % de CO₂). La superficie de intercambio sería de 0,5 cm².

30 En cada periodo de toma de muestras siguiente: 0 h; 2 h y 4 h, se han recogido 500 µl de líquido del lado del receptor, que ha sido sustituido por PBS.

- se han recogido 100 µl de líquido del lado del donante y no han sido sustituidos.

35 Al final del periodo de toma de muestras, se han retirado los 0,5 cm² de córneas de la cámara de reacción y se han rascado con un escalpelo. Se ha añadido 1 ml de PBS a las muestras, que se han homogeneizado.

40 En cada una de las muestras recogidas se ha medido la concentración en nanofitinas mediante la tecnología de BioLayer Interferometry, que permite la medición de la interacción entre dos proteínas. En este caso concreto, el contenido en nanofitinas se mide mediante el reconocimiento de una etiqueta de poli-Histidina que les ha sido previamente acoplada.

Los resultados son los siguientes:

45 La cantidad de nanofitinas recuperada del lado del receptor permite calcular una permeabilidad aparente (cm/s) comprendida, según las nanofitinas, entre $5 \cdot 10^{-6}$ y $2 \cdot 10^{-5}$. En comparación con los patrones utilizados en este tipo de protocolo experimental, las nanofitinas probadas presentan una permeabilidad comparable a la del norfloxacino ($1,1 \cdot 10^{-5}$ en este modelo experimental), que es una molécula que presenta una buena penetración en la córnea y que se utiliza en oftalmología en un colirio para el tratamiento antibacteriano local de infecciones oculares graves debidas a gérmenes sensibles al norfloxacino.

Estos resultados demuestran que las nanofitinas efectivamente atraviesan la córnea, y que este resultado no depende de la diana contra la cual se ha dirigido la nanofitina.

55 Ejemplo 3: evaluación de la permeabilidad cutánea de las nanofitinas *in vivo*

Objetivo:

60 Con el fin de verificar la penetración cutánea de las nanofitinas y la conservación de sus propiedades, particularmente de neutralización de la relación receptor-ligando, se han utilizado modelos de inflamación de tipo psoriasis y se ha medido la reducción en la inflamación (puntuación PASI) después de la administración tópica de las nanofitinas antiinflamatorias directamente en la piel.

65 Estas nanofitinas se dirigen a dos citocinas diferentes implicadas en la inflamación psoriasisiforme, pero con unas localizaciones diferentes, desde las capas basales de la dermis hasta la epidermis (Nestle et al., Nature Reviews Immunology 9, 679-691, 2009). Las nanofitinas en cuestión neutralizan la unión a su receptor de las citocinas a las

que se dirigen. Para inhibir la acción de estas citocinas durante la inflamación de tipo psoriasis, hay que alcanzar las capas en las que están localizadas bien por la vía sistémica, como hacen los anticuerpos terapéuticos, bien por la vía cutánea tópica. La medición de un efecto antiinflamatorio por la administración tópica de las nanofitinas atestigua así una penetración de las Nanofitinas a través de la piel y la eficacia terapéutica asociada.

5

Método:

La aplicación local de imiquimod (Aldara) en la superficie interna de las orejas de ratones provoca una inflamación cutánea similar a la psoriasis (Van der Fits et al., J Immunol. 2009 May 1; 182 (9): 5836-45, Flutter et al., Eur J Immunol. Dic. 2013; 43 (12): 3138-46). Este protocolo se ha aplicado en ratones Balb/c de 6-8 semanas, en las dos orejas.

10

Se han utilizado cuatro grupos de ratones

15 - un grupo de blanco, en el que los ratones no han recibido imiquimod (control negativo)
 - tres grupos experimentales, en los cuales los ratones han recibido imiquimod en las dos orejas, así como un tratamiento en la oreja derecha. Estos tres grupos experimentales son:

20 ° Un grupo de prueba de la eficacia de las nanofitinas: se han aplicado cuatro nanofitinas diferentes en la oreja derecha de los ratones (n = 4) de cada subgrupo experimental de este grupo. Las nanofitinas estaban formuladas en PBS eventualmente con un 20 % de EtOH.

° Un grupo de control en el que los ratones han recibido únicamente el vehículo (PBS, 20 % de EtOH) de las nanofitinas en la oreja tratada

25 ° Un grupo de control en el que los ratones tienen un tratamiento de control (clobetazol de forma tópica como control positivo del tratamiento.

25

El protocolo se ha organizado como sigue:

30 - Administración diaria de imiquimod durante 7 días consecutivos, 1 adm/día por la mañana
 - Administración de las nanofitinas o de los otros controles a partir del tercer día hasta el séptimo día, 1 adm/día por la tarde
 - Observación y determinación de la puntuación PASI desde el día 4 hasta el día 7, por la mañana antes de la administración del imiquimod.
 - Sacrificio el octavo día tras la determinación de la puntuación PASI.

35

La medición de la eficacia ha consistido en la observación por parte de dos operadores de forma independiente y con enmascaramiento de los parámetros de la puntuación PASI para cada oreja: espesor, descamación, enrojecimiento sobre un grado de entre 0 (más débil) y 4 (más elevado). Se obtiene una puntuación total mediante la suma de las diferentes puntuaciones para cada oreja de cada animal.

40

Las cuatro nanofitinas se dirigen a las citocinas implicadas en el fenotipo inflamatorio provocado por el imiquimod e impiden que se unan a sus receptores respectivos, como ya se ha verificado previamente *in vitro* (BioLayer Interferometry). Se han administrado a 10 mg/kg (con la excepción de la segunda, a 20 mg/kg) en una solución de PBS/20 % de EtOH o de PBS sin etanol.

45

Resultados:

50 Para todas las nanofitinas aplicadas se ha constatado una reducción muy significativa de la inflamación en la oreja tratada en comparación con la oreja no tratada (Figura 1). La inflamación de las orejas no tratadas ha permanecido en cualquiera de los grupos, con la excepción del que ha recibido el clobetazol.

El clobetazol se ha administrado en una crema, y los ratones de este grupo se han lamido profusamente las orejas únicamente en este grupo. Igualmente se observó una reducción en la inflamación de la oreja izquierda no tratada, en este grupo. Por lo tanto, es muy probable un efecto sistémico tras la ingestión, con un efecto sobre las dos orejas.

55

Conclusión

La administración tópica de las nanofitinas antiinflamatorias ha permitido inducir una reducción de más del 30 % y puede superar el 80 % de las manifestaciones inflamatorias después de 5 días de tratamiento.

60

Estas puntuaciones atestiguan una eficacia muy significativa *in vivo* de las nanofitinas utilizadas, y demuestra su capacidad para franquear de forma natural las barreras celulares en formulaciones neutras, conservando una actividad neutralizante. Las nanofitinas pueden ser así utilizadas como tratamiento tanto dirigido como tópico, para el tratamiento de patologías cuyas dianas o efectores están bajo la piel.

65

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AFFILOGIC
 <120> Composiciones tópicas

5 <130> BRV 75 – WO

<150> FR 13/53662
 <151> 22-04-2013

10 <160> 8

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> *Sulfolobus acidocaldarius*

20 <400> 1

```

Met Val Lys Val Lys Phe Lys Tyr Lys Gly Glu Glu Lys Glu Val Asp
 1           5           10           15

Thr Ser Lys Ile Lys Lys Val Trp Arg Val Gly Lys Met Val Ser Phe
          20           25           30

Thr Tyr Asp Asp Asn Gly Lys Thr Gly Arg Gly Ala Val Ser Glu Lys
          35           40           45

Asp Ala Pro Lys Glu Leu Leu Asp Met Leu Ala Arg Ala Glu Arg Glu
 50           55           60

Lys Lys
65
    
```

25 <210> 2
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> *Sulfolobus solfataricus*

<400> 2

```

Met Ala Thr Val Lys Phe Lys Tyr Lys Gly Glu Glu Lys Glu Val Asp
 1           5           10           15

Ile Ser Lys Ile Lys Lys Val Trp Arg Val Gly Lys Met Ile Ser Phe
          20           25           30

Thr Tyr Asp Glu Gly Gly Gly Lys Thr Gly Arg Gly Ala Val Ser Glu
          35           40           45

Lys Asp Ala Pro Lys Glu Leu Leu Gln Met Leu Glu Lys Gln Lys Lys
 50           55           60
    
```

30 <210> 3

ES 2 637 421 T3

<211> 65
 <212> PRT
 <213> *Sulfolobus acidocaldarius*

5 <400> 3

Met Ala Lys Val Arg Phe Lys Tyr Lys Gly Glu Glu Lys Glu Val Asp
 1 5 10 15
 Thr Ser Lys Ile Lys Lys Val Trp Arg Val Gly Lys Met Val Ser Phe
 20 25 30
 Thr Tyr Asp Asp Asn Gly Lys Thr Gly Arg Gly Ala Val Ser Glu Lys
 35 40 45
 Asp Ala Pro Lys Glu Leu Met Asp Met Leu Ala Arg Ala Glu Lys Lys
 50 55 60
 Lys
 65

<210> 4
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> *Sulfolobus shibatae*

10

<400> 4

15

Met Val Thr Val Lys Phe Lys Tyr Lys Gly Glu Glu Lys Glu Val Asp
 1 5 10 15
 Thr Ser Lys Ile Lys Lys Val Trp Arg Val Gly Lys Met Ile Ser Phe
 20 25 30
 Thr Tyr Asp Glu Gly Gly Gly Lys Thr Gly Arg Gly Ala Val Ser Glu
 35 40 45
 Lys Asp Ala Pro Lys Glu Leu Leu Gln Met Leu Glu Lys Gln Lys Lys
 50 55 60

<210> 5
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> *Sulfolobus shibatae*

20

<400> 5

ES 2 637 421 T3

Met Ala Thr Val Lys Phe Lys Tyr Lys Gly Glu Glu Lys Gln Val Asp
1 5 10 15

Ile Ser Lys Ile Lys Lys Val Trp Arg Val Gly Lys Met Ile Ser Phe
20 25 30

Thr Tyr Asp Glu Gly Gly Gly Lys Thr Gly Arg Gly Ala Val Ser Glu
35 40 45

Lys Asp Ala Pro Lys Glu Leu Leu Gln Met Leu Glu Lys Gln Lys Lys
50 55 60

<210> 6
<211> 64
<212> PRT
<213> *Sulfolobus sp.*

<400> 6

5

Met Val Thr Val Lys Phe Lys Tyr Lys Gly Glu Glu Lys Glu Val Asp
1 5 10 15

Ile Ser Lys Ile Lys Lys Val Trp Arg Val Gly Lys Met Ile Ser Phe
20 25 30

Thr Tyr Asp Asp Asn Gly Lys Thr Gly Arg Gly Ala Val Ser Glu Lys
35 40 45

Asp Ala Pro Lys Glu Leu Leu Gln Met Leu Glu Lys Ser Gly Lys Lys
50 55 60

10

<210> 7
<211> 64
<212> PRT
<213> *Sulfolobus islandicus*

<400> 7

15

Met Val Thr Val Lys Phe Lys Tyr Lys Gly Glu Glu Lys Gln Val Asp
1 5 10 15

Thr Ser Lys Ile Lys Lys Val Trp Arg Val Gly Lys Met Ile Ser Phe
20 25 30

Thr Tyr Asp Glu Gly Gly Gly Lys Thr Gly Arg Gly Ala Val Ser Glu
35 40 45

Lys Asp Ala Pro Lys Glu Leu Leu Gln Met Leu Glu Lys Gln Lys Lys
50 55 60

20

<210> 8
<211> 60

ES 2 637 421 T3

- <212> PRT
<213> Artificial
- 5 <220>
<223> Secuencia consenso
- 10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa es V, A o T
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa es T o K
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa es R o K
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (14)..(14)
<223> Xaa es E o Q
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (17)..(17)
<223> Xaa es T o I
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (30)..(30)
<223> Xaa es A, V o I
- 40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (36)..(38)
<223> Xaa Xaa Xaa es EGG o DN-
- 45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (56)..(56)
<223> Xaa es M o L
- 50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (57)..(57)
<223> Xaa es Q o D
- 55 <220>
<221> VARIANTE
<222> (60)..(60)
<223> Xaa representa A, ARAE, EKQKK, EKSGKK, ARAEREKK, ARAEKKK, ACAEREKK o ACAEKKK
- <400> 8

ES 2 637 421 T3

Met Xaa Xaa Val Xaa Phe Lys Tyr Lys Gly Glu Glu Lys Xaa Val Asp
1 5 10 15

Xaa Ser Lys Ile Lys Lys Val Trp Arg Val Gly Lys Met Xaa Ser Phe
20 25 30

Thr Tyr Asp Asp Asn Xaa Gly Lys Thr Gly Arg Gly Ala Val Ser Glu
35 40 45

Lys Asp Ala Pro Lys Glu Leu Xaa Xaa Met Leu Xaa
50 55 60

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición tópica que comprende una variante de una proteína natural de pliegue-OB, presentando dicha variante entre 5 y 32 restos mutados en la interfase de la unión de dicha proteína natural de pliegue-OB a su ligando natural.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, **caracterizada por que** dicha proteína natural de pliegue-OB se elige entre la Sac7d o la Sac7e procedentes de *Sulfolobus acidocaldarius*, la Sso7d procedente de *Sulfolobus solfataricus*, la DBP 7 procedente de *Sulfolobus tokodaii*, la Ssh7b procedente de *Sulfolobus shibatae*, la Ssh7a procedente de *Sulfolobus shibatae* y la p7ss procedente de *Sulfolobus solfataricus*.
- 15 3. Composición según una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada por que** contiene entre 10 ng/ml y 600 mg/ml de dicha variante.
- 20 4. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada por que** dicha variante se une a una diana de interés elegida entre antígenos, anticuerpos, proteínas celulares, proteínas circulantes, péptidos, principios activos de medicamentos, ácidos nucleicos, y particularmente las interleucinas, las citocinas, los receptores de las citocinas o de las interleucinas, las proteínas codificadas por oncogenes, las proteínas de superficie de microorganismos, y los lipopolisacáridos de microorganismos.
- 25 5. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada por que** está adaptada para una aplicación en la piel.
- 30 6. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada por que** está adaptada para una aplicación ocular.
- 35 7. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada por que** se presenta en forma de una solución acuosa, oleosa o hidroalcohólica, de una emulsión, de una microemulsión, de un gel acuoso, de un gel anhidro, de un suero, de una dispersión de vesículas, de una loción, de un gel, de una crema, de una espuma, de un aerosol o de un pulverizador.
- 40 8. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada por que** contiene además al menos un agente elegido entre agentes antibacterianos, antiparasitarios, antifúngicos, antiinflamatorios, antipruriginosos, anestésicos, antivíricos, queratolíticos, anti-radicales libres, antiseborreicos, anticaspa, antiacneicos y los agentes que modulan la diferenciación y/o la proliferación y/o la pigmentación cutánea.
9. Composición tópica según una de las reivindicaciones 1 a 8, para su utilización en el tratamiento de un trastorno o de una enfermedad dermatológica u oftalmológica.
10. Procedimiento de preparación de una composición tópica según una de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende la etapa de mezclar una variante de una proteína natural de pliegue-OB, presentando dicha variante entre 5 y 32 restos mutados en la interfase de la unión de dicha proteína natural de pliegue-OB a su ligando natural en un vehículo farmacéutica o cosméticamente aceptable.

Figura 1

Fecha	J4				J5				J6				J7			
	Derecha	Izquierda	OD-OG		Derecha	Izquierda	OD-OG		Derecha	Izquierda	OD-OG		Derecha	Izquierda	OD-OG	
			OG	%			OG	%			OG	%			OG	%
Nanofitina E8	Puntuación total	16,00	29,00		19,00	28,00		14,50	22,00		15,50	28,00		28,00		
	Media	4,00	7,25	-45 %	4,75	7,00	-32 %	3,63	5,50	-34 %	3,88	7,00	-45 %	7,00		
	Desviación	2,12	0,5		1,71	0,82		1,11	0,58		0,85	0,00		0,00		
Nanofitina G2	Puntuación total	14,50	31,00		11,00	30,00		10,00	32,00		9,00	29,00		29,00		
	Media	3,63	7,75	-53 %	2,75	7,50	-63 %	2,50	8,00	-69 %	2,25	7,25	-69 %	7,25		
	Desviación	0,75	0,50		0,96	0,58		0,58	1,41		1,32	0,50		0,50		
Nanofitina N2	Puntuación total	13,50	29,00		10,00	29,00		9,00	28,00		9,00	30,00		30,00		
	Media	3,38	7,25	-53 %	2,50	7,25	-66 %	2,25	7,00	-68 %	2,25	7,50	-70 %	7,50		
	Desviación	0,48	0,96		1,00	0,96		0,50	0,82		0,50	1,00		1,00		
Nanofitina N9	Puntuación total	14,00	23,00		8,00	21,00		10,00	24,50		5,00	24,50		24,50		
	Media	3,50	5,75	-39 %	2,00	5,25	-62 %	2,50	6,13	-59 %	1,25	6,13	-80 %	6,13		
	Desviación	2,00	2,87		1,00	0,85		1,00	2,93		0,00	2,78		2,78		
Clobetazol	Puntuación total	11,00	22,00		4,00	11,00		1,50	10,00		1,00	9,00		9,00		
	Media	2,75	5,50	-50 %	1,00	2,75	-64 %	0,38	2,50	-85 %	0,25	2,25	-89 %	2,25		
	Desviación	1,50	1,00		0,71	0,96		0,48	0,58		0,50	0,96		0,96		
Vehículo PBS/20 % de EtOH	Puntuación total	23,50	31,00		26,50	32,00		26,00	31,00		25,50	27,50		27,50		
	Media	5,88	7,75	-24 %	6,63	8,00	-17 %	6,50	7,75	-16 %	6,38	6,88	-7 %	6,88		
	Desviación	1,03	0,96		1,31	0,00		0,71	0,96		0,63	0,25		0,25		