

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 959**

51 Int. Cl.:

C07K 14/79

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2012** **PCT/EP2012/051111**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2012** **WO12101156**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2012** **E 12700715 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017** **EP 2668204**

54 Título: **Péptidos basados en lactoferrina humana que tienen actividad antiinflamatoria**

30 Prioridad:

26.01.2011 EP 11152213

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

11.12.2017

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 2 645 959 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 basados en lactoferrina humana que tienen actividad antiinflamatoria

Campo de la invención

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

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).

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

- 5 El documento WO 2010/081800 está dirigido a ciertos péptidos útiles en la curación de heridas, cicatrización y adhesiones postquirúrgicas, así como a una composición farmacéutica que comprende ciertos péptidos en combinación con un ácido hialurónico de alto peso molecular.

Håversen, L et al, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, enero de 2010, V54 N1, P418-425, divulga efectos antibacterianos de una serie de péptidos derivados de lactoferrina.

El documento WO 02/100387 divulga una sustancia antiangiogénica para uso en la neovascularización y/o neoinervación de discos intervertebrales y/o de tejidos con inflamación local, y para la prevención del dolor.

- 10 El documento WO 2008/096816 se refiere a ciertos péptidos para la inducción de terapia de angiogénesis.

El documento WO 00/49040 está dirigido a péptidos antibacterianos de al menos 33 aminoácidos de longitud.

El documento WO 2008/096814 divulga ciertos péptidos que tienen actividad antibacteriana.

Compendio de la invención

- 15 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)

Los péptidos según la primera realización de la invención se seleccionan de los péptidos

C-F-L-W-R-R-L-M-R-K-L-R (SEQ ID NO: 74);

C-W-L-W-R-R-A-M-R-K-V-W (SEQ ID NO: 76);

L-R-L-W-R-R-L-M-R-K-V-W (SEQ ID NO: 77);

R-R-L-W-R-R-W-M-R-K-V-L (SEQ ID NO: 78);

C-R-L-W-R-R-R-M-R-K-V-W (SEQ ID NO: 79);

L-R-L-W-R-R-S-M-R-K-V-W (SEQ ID NO: 81);

K-K-L-W-R-R-W-W-R-K-V-L (SEQ ID NO: 90);

R-W-C-K-L-W-R-R-L-M-R-K-V-R-R-L (SEQ ID NO: 85);

R-W-C-F-L-W-R-R-L-M-R-K-H-R-R-L (SEQ ID NO: 86);

W-C-K-L-W-R-R-L-M-R-K-V-R-R (SEQ ID NO: 87);

W-R-R-W-L-R-K-S-V-K-R-L (SEQ ID NO: 93);

W-C-R-W-L-R-K-M-V-K-A-L (SEQ ID NO: 94);

- 20 y

W-R-R-W-L-R-K-M-V-K-R-L (SEQ ID NO: 95).

Los péptidos según la invención comprenden aminoácidos seleccionados de 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".

- 25 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.

5 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.

15 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.

20 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).

25 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

C-F-L-W-R-R-L-M-R-K-L-R	(SEQ ID NO: 74);
C-W-L-W-R-R-A-M-R-K-V-W	(SEQ ID NO: 76);
L-R-L-W-R-R-L-M-R-K-V-W	(SEQ ID NO: 77);
R-R-L-W-R-R-W-M-R-K-V-L	(SEQ ID NO: 78);
C-R-L-W-R-R-R-M-R-K-V-W	(SEQ ID NO: 79);
L-R-L-W-R-R-S-M-R-K-V-W	(SEQ ID NO: 81);
K-K-L-W-R-R-W-W-R-K-V-L	(SEQ ID NO: 90);
R-W-C-K-L-W-R-R-L-M-R-K-V-R-R-L	(SEQ ID NO: 85);
R-W-C-F-L-W-R-R-L-M-R-K-H-R-R-L	(SEQ ID NO: 86);
W-C-K-L-W-R-R-L-M-R-K-V-R-R	(SEQ ID NO: 87);
W-R-R-W-L-R-K-S-V-K-R-L	(SEQ ID NO: 93);
W-C-R-W-L-R-K-M-V-K-A-L	(SEQ ID NO: 94);
y	
W-R-R-W-L-R-K-M-V-K-R-L	(SEQ ID NO: 95).

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 se 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, $16 \div 18 \times 100 = 89$) 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 contempladas como posibles.

Se contemplan también como posibles 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. Por ejemplo, puede ligarse PEG con grupos amino N-terminales, o con residuos aminoacídicos 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).

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*-butiloxycarbonilo, 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.

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 aminoacídicos 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.

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 donde 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 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.

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.

- 5 Los péptidos según la invención son adecuados para el tratamiento y/o la prevención de infecciones, inflamaciones, tumores, dolor, heridas y/o 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.

10

Las infecciones tratables con los péptidos o productos medicinales o 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 de dispositivos médicos para reducir/prevenir las infecciones relacionadas con el dispositivo.

15

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.

20

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.

25

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.

30

Además, otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de los péptidos de la invención para la producción de un producto medicinal o 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 o producto médico/dispositivo médico puede incluirse en comida o incluirse en un alimento de fórmula para bebés.

35

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).

40

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

Los péptidos según la invención pueden usarse como tales o incluirse en un dispositivo médico, producto medicinal o composición farmacéutica. El producto medicinal o dispositivo médico 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.

45

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

50

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.

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

55

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.

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.

- 5 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, bucofaríngea, intravenosa, intraarterial, intracavitaria, intramuscular, subcutánea, transdérmica, supositorios (incluyendo rectal) u otras vías conocidas por los especialistas en la materia.

- 10 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 bucofaríngea. Para el tratamiento de infecciones o inflamaciones locales, los péptidos o productos medicinales según la invención pueden incluirse, p.ej., en un gel, una crema, una pomada, solución o pasta, un polvo/solución de inhalación, una solución/suspensión/pomada ótica u oftálmica.

- 15 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.

- 20 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.

- 25 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.

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

- 30 1) Generalmente, tratamiento 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, desgarro muscular, lesión muscular, esguince muscular, torcedura muscular,
- 35 2c) dermatología; psoriasis, eccema (eczema), dermatitis, acné,
- 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,
- 40 2g) órganos sensoriales; glaucoma,
- 2h) superficies mucosas (inflamación como resultado de quimio/radioterapia),
- 45 2i) alergia,
- 2j) enfermedades autoinmunitarias.

Los péptidos de la invención son además adecuados para la prevención y el tratamiento de heridas y 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,

3b) acné,

5 3c) cicatrices hipertróficas y queloides,

3d) pleuritis,

3e) diálisis peritoneal,

3f) heridas agudas y crónicas.

10 Los péptidos de la invención se cree además que tienen efectos antiangiogénicos y son por lo tanto adecuados para el tratamiento de:

4a) cáncer,

4b) artritis reumatoide.

Los péptidos de la invención tienen efectos antiinfecciosos, y son adecuados para la prevención y el tratamiento de:

5a) efectos antibacterianos:

15 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),

20 tracto genital (incluyendo vaginosis, vaginitis, cervicitis, endometritis, PID),

infecciones del tracto gastrointestinal (infecciones sistémicas iniciadas en el GI),

infecciones del sistema nervioso central,

25 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,

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

gingivitis

30 5b) Efectos antivíricos:

tracto respiratorio superior e inferior,

enfermedades de transmisión sexual,

infecciones del tracto gastrointestinal (infecciones sistémicas iniciadas en el GI),

infecciones del sistema nervioso central,

35 5c) Efectos antifúngicos:

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

tracto genitourinario (tales como candidiasis vulvovaginal, balanitis)

infecciones del tracto gastrointestinal (infecciones sistémicas iniciadas en el GI)

infecciones del sistema nervioso central

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

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, dispositivos médicos y métodos según la invención pueden usarse solos, en combinación entre sí o en combinación con terapia convencional.

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.

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.

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 de clase 2. Los péptidos se representan según sus propiedades fisicoquímicas. Los péptidos con actividad inhibidora de TNF- α (a una concentración de péptido de 40 μ M) pueden encontrarse en tres agrupamientos: agrupamientos A, B y C.

Figura 4. Efecto de dosis y respuesta del péptido 232 (SEQ ID NO 78)(A) y el péptido 220 (SEQ ID NO 67)(B) 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. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$.

Figura 5. Efecto de dosis y respuesta del péptido 232 (SEQ ID NO 78)(A) y el péptido 220 (SEQ ID NO 67)(B) 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. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Cribado peptídico 1

Se diseñaron y ensayaron dos clases de péptidos derivados de lactoferrina. Se identificaron los péptidos activos en todas las clases.

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. Para la primera ronda de cribado, se diseñaron nuevas variantes de péptidos de clase 1 mediante la introducción de motivos N-terminales y espaciados de leucina (i, i+3) e (i, i+4), ambos sugeridos por mejorar la estabilidad de hélice. Además, se modificó el carácter anfipático de las hélices mediante la inserción de aminoácidos cargados positivamente polares en posiciones específicas. Se diseñaron nuevas variantes de péptidos de clase 2 aumentando la carga positiva y las regiones hidrófobas de los péptidos. Por tanto, se aumentó el carácter anfipático de los péptidos. (Figura. 2). Basándose en los nuevos diseños, se ordenaron aproximadamente 50 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 101	SQPEATKCFQWQRNMRKVR	SEQ ID NO: 6
Péptido 102	NQPTATKCFQWQRNMRKVR	SEQ ID NO: 7
Péptido 103	TQPDATKCFQWQRNMRKVR	SEQ ID NO: 8
Péptido 104	QPEATKCFQWQRNMRKVR	SEQ ID NO: 9
Péptido 105	QTEADKCFQWQRNMRKVR	SEQ ID NO: 10
Péptido 106	QTEADKCFQWQRNMRKVR	SEQ ID NO: 11
Péptido 107	QSEAEKCFQWQRNMRKVR	SEQ ID NO: 12
Péptido 108	PEATKCFQWQRNMRKVR	SEQ ID NO: 13
Péptido 109	NEADKCFQWQRNMRKVR	SEQ ID NO: 14
Péptido 110	SEAEKCFQWQRNMRKVR	SEQ ID NO: 15
Péptido 111	QSLATKCFQWQRNMRKVR	SEQ ID NO: 16
Péptido 112	QSEATKLFQWQRNMRKVR	SEQ ID NO: 17
Péptido 113	QSEATKCFQWLRNMRKVR	SEQ ID NO: 18
Péptido 114	QSLATKLFQWLRNLRKVR	SEQ ID NO: 19
Péptido 115	QSEATKLFQWQRNLRKVR	SEQ ID NO: 20
Péptido 117	QSLAEKLFQWLRNLRKVR	SEQ ID NO: 21
Péptido 118	QPEATKCFPWQRNMRKVR	SEQ ID NO: 22
Péptido 119	QSEATKRFQWLRNLRKVL	SEQ ID NO: 23
Péptido 120	QSLAEKLFQWLRNRRKVR	SEQ ID NO: 24
Péptido 121	QSLATKLFQWRRNLRKVR	SEQ ID NO: 25
Péptido 122	FQWKRAMRKVR	SEQ ID NO: 26
Péptido 123	CFQWKRAMRKVR	SEQ ID NO: 27
Péptido 124	FQWQRRIRKVR	SEQ ID NO: 28
Péptido 125	FQWRRAIRKVR	SEQ ID NO: 29
Péptido 128	WFQWQRNMRKVR	SEQ ID NO: 30
Péptido 129	WFQWKRRMRKVR	SEQ ID NO: 31
Péptido 131	FWWQRKMRKVR	SEQ ID NO: 32
Péptido 133	FQWQRNMRKVR	SEQ ID NO: 33
Péptido 134	FQWQRNIRKIR	SEQ ID NO: 34
Péptido 135	FQWQRNLRKLR	SEQ ID NO: 35
Péptido 136	FQWQRNIRKVR	SEQ ID NO: 36

Péptido 137	FQWQRPPIRKVR	SEQ ID NO: 37
Péptido 138	FQWQPRIRKVR	SEQ ID NO: 38
Péptido 139	FQWRPGIRKLR	SEQ ID NO: 39
Péptido 140	FQWKPAIRKVR	SEQ ID NO: 40
Péptido 141	CLNFKRGVRKIR	SEQ ID NO: 41
Péptido 143	CFQWQRKMRKVR	SEQ ID NO: 42
Péptido 144	CFQWKRAMRKVR	SEQ ID NO: 43
Péptido 147	CFKWKRKMRKVR	SEQ ID NO: 44
Péptido 148	CFQWQKRMKRVK	SEQ ID NO: 45
Péptido 149	CFQWQRNMRKVR	SEQ ID NO: 46
Péptido 158	EATKCFQWQRNMRKVR	SEQ ID NO: 47

Se midió la actividad antiinflamatoria como la 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 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	Clase
SEQ ID NO 23	119	10 %	1
SEQ ID NO 21	117	13 %	1
SEQ ID NO 19	114	15 %	1
SEQ ID NO 18	113	22 %	1
SEQ ID NO 25	121	35 %	1
SEQ ID NO 14	109	47 %	1
SEQ ID NO 24	120	49 %	1
SEQ ID NO 32	131	87 %	2
SEQ ID NO 10	105	87 %	1
SEQ ID NO 31	129	91 %	2

SEQ ID NO 47	158	91 %	2
SEQ ID NO 11	106	96 %	1
SEQ ID NO 36	136	96 %	2
SEQ ID NO 17	112	101 %	1
SEQ ID NO 15	110	102 %	1
SEQ ID NO 35	135	103 %	2
SEQ ID NO 30	128	104 %	2
SEQ ID NO 12	107	108 %	1
SEQ ID NO 6	102	108 %	1
SEQ ID NO 34	134	109 %	2
SEQ ID NO 46	149	109 %	2
SEQ ID NO 41	141	109 %	2
SEQ ID NO 44	147	111 %	2
SEQ ID NO 22	118	113 %	1
SEQ ID NO 6	101	116 %	1
SEQ ID NO 40	140	117 %	2
SEQ ID NO 20	115	119 %	1
SEQ ID NO 16	111	121 %	1
SEQ ID NO 13	108	127 %	1
SEQ ID NO 28	124	128 %	2
SEQ ID NO 9	104	132 %	1
SEQ ID NO 45	148	132 %	2
SEQ ID NO 33	133	135 %	2
SEQ ID NO 8	103	135 %	1
SEQ ID NO 37	137	137 %	2
SEQ ID NO 43	144	140 %	2
SEQ ID NO 39	139	148 %	2
SEQ ID NO 29	125	150 %	2
SEQ ID NO 42	143	153 %	2
SEQ ID NO 27	123	156 %	2
SEQ ID NO 38	138	172 %	2

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

5 Se transfirieron *S. aureus* (nº 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 10^7 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 10^7 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.

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 %	Clase
SEQ ID NO 19	114	2,5	1
SEQ ID NO 21	117	2,5	1
SEQ ID NO 32	131	5	2
SEQ ID NO 24	120	10	1
SEQ ID NO 25	121	10	1
SEQ ID NO 31	129	10	2
SEQ ID NO 43	144	10	2
SEQ ID NO 44	147	10	2
SEQ ID NO 46	149	13,3	2
SEQ ID NO 16	111	20	1
SEQ ID NO 23	119	20	1
SEQ ID NO 26	122	20	2
SEQ ID NO 27	123	20	2
SEQ ID NO 28	124	20	2
SEQ ID NO 29	125	20	2
SEQ ID NO 30	128	20	2
SEQ ID NO 35	135	20	2
SEQ ID NO 41	141	20	2
SEQ ID NO 42	143	20	2
SEQ ID NO 45	148	20	2
SEQ ID NO 34	134	40	2
SEQ ID NO 39	139	45	2
SEQ ID NO 11	106	160	1
SEQ ID NO 14	109	160	1
SEQ ID NO 6	101	>160	1
SEQ ID NO 7	102	>160	1
SEQ ID NO 8	103	>160	1

SEQ ID NO 9	104	>160	1
SEQ ID NO 10	105	>160	1
SEQ ID NO 12	107	>160	1
SEQ ID NO 13	108	>160	1
SEQ ID NO 15	110	>160	1
SEQ ID NO 17	112	>160	1
SEQ ID NO 18	113	>160	1
SEQ ID NO 20	115	>160	1
SEQ ID NO 22	118	>160	1
SEQ ID NO 33	133	>160	2
SEQ ID NO 36	136	>160	2
SEQ ID NO 37	137	>160	2
SEQ ID NO 38	138	>160	2
SEQ ID NO 40	140	>160	2

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 cada una de las clases peptídicas. Además, se crearon también modelos globales que consideraban todas las clases peptídicas. 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 cada 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 201	QREARKRFQWLRNMTKVR	SEQ ID NO: 48
Péptido 202	QESARKQFRWLRNLTKVL	SEQ ID NO: 49
Péptido 203	QREARKFRQWLRNMTKVR	SEQ ID NO: 50
Péptido 204	QSEYTKRYQWLRNLRKVL	SEQ ID NO: 51
Péptido 205	QKRATKRFQWLRNLRKVL	SEQ ID NO: 52
Péptido 206	QSERKKRFQWLRNLRKVL	SEQ ID NO: 53
Péptido 207	QSRATKRFQWHRNARKVL	SEQ ID NO: 54
Péptido 208	QSRATKRFQWLRNHRKVL	SEQ ID NO: 55
Péptido 209	QSLARTFKQWARNLRKVL	SEQ ID NO: 56
Péptido 210	QSAARTFKQWARNLRKTL	SEQ ID NO: 57
Péptido 211	QSEATKRFQWLRNLRKVLKR	SEQ ID NO: 58
Péptido 212	QSEATKRFQWLRNLRKVLWW	SEQ ID NO: 59

ES 2 645 959 T3

Péptido 213	QSEATKRFQWLRNLRKVLGP	SEQ ID NO: 60
Péptido 214	VSQSEATKRFQWLRNLRKVL	SEQ ID NO: 61
Péptido 215	KRQSLARTFKQWARNLRKVL	SEQ ID NO: 62
Péptido 216	LVKRLNRLWQFRKTAESQ	SEQ ID NO: 63
Péptido 217	QSEATKRFQWLRNLRKVL	SEQ ID NO: 64
Péptido 218	QSLAHSLFQWLRNLRKVR	SEQ ID NO: 65
Péptido 219	RSLAQKLFQWLRNLRKVR	SEQ ID NO: 66
Péptido 220	QSLARKLFQWLRNLRKVA	SEQ ID NO: 67
Péptido 221	QSLAEKLFQWLRNLRKVR	SEQ ID NO: 68
Péptido 222	NSLFEKLAQWLRQLRKVR	SEQ ID NO: 69
Péptido 223	GRRRRSVQWCA	SEQ ID NO: 70
Péptido 225	QSEATKCFWRRNMRKVR	SEQ ID NO: 71
Péptido 226	QSAKTACFWRRNMRKVR	SEQ ID NO: 72
Péptido 227	CFLWRRNMRKVR	SEQ ID NO: 73
Péptido 228	CFLWRRLMRKLR	SEQ ID NO: 74
Péptido 229	CRLWRRNMRKVR	SEQ ID NO: 75
Péptido 230	CWLWRRAMRKVW	SEQ ID NO: 76
Péptido 231	LRLWRRLMRKVW	SEQ ID NO: 77
Péptido 232	RRLWRRWMRKVL	SEQ ID NO: 78
Péptido 233	CRLWRRRMRKVW	SEQ ID NO: 79
Péptido 234	LRTWRRLTRKVW	SEQ ID NO: 80
Péptido 235	LRLWRRSMRKVW	SEQ ID NO: 81
Péptido 236	CFLWRRSMRRLR	SEQ ID NO: 82
Péptido 237	CFLWRRLMRKV	SEQ ID NO: 83
Péptido 238	RLWRRLMRKVR	SEQ ID NO: 84
Péptido 239	RWCKLWRRLMRKVRRL	SEQ ID NO: 85
Péptido 240	RWCFLWRRLMRKHRRL	SEQ ID NO: 86
Péptido 241	WCKLWRRLMRKVRR	SEQ ID NO: 87
Péptido 242	TKCFLWRRNMRKVRG	SEQ ID NO: 88
Péptido 243	WFKCFQWQRNMRKVR	SEQ ID NO: 89
Péptido 244	KKLWRRWWRKVL	SEQ ID NO: 90
Péptido 245	VWIVKKQVKRIK	SEQ ID NO: 91
Péptido 246	LVWIKRHIKKFK	SEQ ID NO: 92
Péptido 247	WRRWLRKSVKRL	SEQ ID NO: 93

Péptido 248	WCRWLRKMKVKA	SEQ ID NO: 94
Péptido 249	WRRWLRKMKVKRL	SEQ ID NO: 95
Péptido 255	GRRRRSVQWCA	SEQ ID NO: 96

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	Clase
48	201	128,6 %	nd	nd	1
49	202	90,3 %	nd	nd	1
50	203	98,1 %	nd	nd	1
51	204	96,9 %	nd	nd	1
52	205	28,3 %	89,5 %	91,5 %	1
53	206	51,0 %	92,9 %	96,9 %	1
54	207	160,9 %	nd	nd	1
55	208	130,2 %	nd	nd	1
56	209	23,6 %	68,2 %	88,0 %	1
57	210	101,0 %	nd	nd	1
58	211	62,8 %	89,8 %	100,7 %	1
59	212	25,7 %	85,8 %	90,9 %	1
60	213	84,4 %	125,5 %	110,3 %	1
61	214	88,8 %	nd	nd	1
62	215	1,3 %	69,6 %	86,6 %	1
63	216	121,9 %	nd	nd	1
64	217	103,0 %	nd	nd	1
65	218	9,2 %	55,7 %	81,8 %	1
66	219	7,3 %	44,0 %	68,5 %	1

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	Clase
67	220	11,6 %	37,0 %	70,8 %	1
68	221	94,4 %	nd	nd	1
69	222	32,9 %	65,9 %	89,2 %	1
70	223	104,4 %	nd	nd	otra
71	225	111,6 %	nd	nd	1 y 2
72	226	108,7 %	nd	nd	1 y 2
73	227	111,0 %	nd	nd	2
74	228	53,6 %	95,4 %	106,6 %	2
75	229	108,5 %	nd	nd	2
76	230	80,4 %	135,6 %	119,2 %	2
77	231	49,8 %	89,1 %	102,6 %	2
78	232	33,2 %	66,6 %	96,9 %	2
79	233	90,7 %	nd	nd	2
80	234	102,0 %	nd	nd	2
81	235	89,3 %	nd	nd	2
82	236	94,4 %	nd	nd	2
83	237	89,2 %	nd	nd	2
84	238	76,5 %	89,2 %	83,9 %	2
85	239	7,4 %	56,5 %	65,6 %	2
86	240	40,1 %	59,9 %	78,3 %	2
87	241	8,1 %	57,9 %	92,7 %	2
88	242	116,8 %	nd	nd	2
89	243	113,1 %	nd	nd	2
90	244	10,7 %	116,7 %	107,7 %	2
91	245	146,3 %	nd	nd	2
92	246	125,5 %	nd	nd	2
93	247	88,2 %	nd	nd	2
94	248	24,2 %	80,2 %	87,1 %	2
95	249	-0,7 %	78,0 %	91,2 %	2
96	255	100,7 %	nd	nd	otra

nd= no realizado

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

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 10^7 bacterias/ml estimada midiendo la densidad óptica a 600 nm.

- 5 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].

- 10 Se incubaron después de ello los péptidos (100 μ l) con bacterias (5 μ l a 10^7 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 %	Clase
52	205	12,5	50	1
53	206	12,5	100	1
56	209	12,5	100	1
58	211	6,25	100	1
59	212	12,5	100	1
60	213	25	200	1
62	215	6,25	25	1
65	218	6,25	50	1
66	219	6,25	12,5	1
67	220	12,5	25	1
69	222	12,5	100	1
70	223	25	nd	otra
74	228	12,5	50	2
76	230	25	100	2
77	231	12,5	50	2
78	232	12,5	25	2
84	238	12,5	100	2
85	239	12,5	25	2
86	240	12,5	25	2
87	241	12,5	25	2
90	244	12,5	50	2
94	248	25	50	2
95	249	12,5	6,25	2
96	255	25	nd	otra

nd= no realizado

Péptidos de clase 2

Se diseñaron varias variantes de péptidos con carga aumentada y regiones hidrófobas añadidas. Especialmente, era importante la modulación de la anfipatía para conseguir péptidos con alta actividad.

- 5 Basándose en un análisis del componente principal (ProPHECY™) usando las secuencias de péptidos de clase 2 y los resultados del ensayo antiinflamatorio, se identificaron tres agrupamientos diferentes de péptidos activos (Figura 3). Los agrupamientos contenían péptidos solo de la ronda de cribado 2. Los péptidos más activos de cada agrupamiento se resumen en la Tabla 7.

- 10 El gráfico de dispersión de la Figura 3 está basado en el análisis del componente principal de las propiedades peptídicas. Se alinearon los péptidos y se consideran las propiedades fisicoquímicas de cada aminoácido. Los péptidos que están cercanos entre sí en el gráfico se espera que tengan también un mayor grado de similitud. Es decir, los péptidos tienen los mismos o similares aminoácidos en la mayoría de posiciones. Correspondientemente, los péptidos distantes se espera que tengan una secuencia más distinta. Por ejemplo, los péptidos 232 y 244 están muy cercanos (véase el agrupamiento A) y difieren en tres posiciones, donde 232 tiene R, R y M y 244 tiene K, K y W (R y K, y M y W no son muy diferentes). Esto puede compararse con los péptidos 240 y 249 (agrupamiento B y C respectivamente) que difieren en dos residuos de longitud además de diferencias en ocho posiciones. Por ello, el gráfico de puntuación da una visión general de la similitud fisicoquímica entre los péptidos.

Tabla 7: Péptidos de clase 2

Posición :	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Molde :	x	x	C	F	Q	W	Q	R	N	M	R	K	V	R	x	x
AGRUPAMIENTO A																
231:			L	R	L		R		L					W		
232:			R	R	L		R		W					L		
233:				R	L		R		R					W		
235:			L	R	L		R		S					W		
244:			K	K	L		R		W	W				L		
AGRUPAMIENTO B																
239:	R	W		K	L		R		L						R	L
240:	R	W			L		R		L				H		R	L
241:		W		K	L		R		L						R	
AGRUPAMIENTO C																
247:			W	R	R		L		K	S	V		R	L		
248:			W	C	R		L		K		V		A	L		
249:			W	R	R		L		K		V		R	L		

Los residuos en negrita indican los tipos de aminoácido que contribuyen positivamente a la actividad.

- 20 La visión general de los resultados de la Tabla 7 hace más fácil identificar posiciones y mutaciones que son importantes para actividad alta. En estos péptidos, se han reemplazado varias posiciones por aminoácidos cargados positivamente tales como Lys (K) y Arg (R). Además, se han cambiado varias posiciones a aminoácidos hidrófobos para aumentar la hidrofobia en los extremos peptídicos y modular la anfipatía. El análisis ProPHECY™ muestra que es beneficioso tener un aminoácido cargado positivamente en las posiciones 1 y 2, así como en la posición 5.
- 25 Además, los aminoácidos hidrófobos son beneficiosos en las posiciones 7, 8 y 12. Todos estos péptidos tienen una Leu (L) en posición 3. La anfipatía mejoraba por tanto si las posiciones 7, 8 y 12 se cambian a residuos hidrófobos o se cambian a residuos con hidrofobia aumentada (como Met a Trp en el péptido 244).

- Los péptidos en el agrupamiento B se han extendido tanto en el extremo N como en el extremo C con uno o dos residuos para aumentar la carga positiva e hidrofobia. El péptido 240 es menos activo debido que la carga positiva y la anfipatía son menores para este péptido. Los péptidos más activos 239 y 241 tienen aminoácidos cargados positivamente en posiciones 2 y 5 y aminoácidos hidrófobos en posiciones 3 y 7.

- En los péptidos del agrupamiento C, la anfipatía se ha desplazado y "girado" a otra parte de la superficie a lo largo del péptido. Esto se consigue reemplazando las posiciones 1, 5, 9 y 12 por aminoácidos hidrófobos y las 2, 3, 7 y 11 por aminoácidos cargados positivamente.

- 35 Finalmente, algunos de los péptidos de clase 2 activos pertenecientes al agrupamiento A y especialmente al agrupamiento B exhiben altos efectos antimicrobianos incluso a concentraciones salinas cercanas a la fisiológica.

Ejemplo 3. Efecto antimicrobiano *in vitro*

Se analizaron los efectos antimicrobianos de los péptidos 232 (SEQ ID NO: 78) y 220 (SEQ ID NO: 67) 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.

Se diluyeron en serie los péptidos 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, todos los péptidos tienen la capacidad de destruir microorganismos que aparecen frecuentemente en infecciones.

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

	Péptido 232 (SEQ ID NO 78)		Péptido 220 (SEQ ID NO 67)	
	BHI al 1 %	SWF al 50 %	BHI al 1 %	SWF al 50 %
<i>S. aureus</i>	5	44	7	28
MRSA	6	100	6	200
<i>P. aeruginosa</i>	5	>176	7	>200
<i>E. coli</i>	5	>176	3	>200
<i>P. acnes</i>	6	>200	<3	100
<i>S. pyogenes</i>	<3	>200	<3	50

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

	Péptido 232 (SEQ ID NO 78)	
	BHI al 1 %	SWF al 50 %
<i>S. epidermidis</i>	3	50
<i>K. pneumoniae</i>	6	>200
<i>A. baumannii</i>	3	200
<i>C. albicans</i>	3	50

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

Se investigaron los efectos antimicrobianos *in vivo* del péptido 232 (SEQ ID NO: 78) y el péptido 220 (SEQ ID NO: 67) en un modelo de herida por extirpación en ratas. Se inocularon las heridas con *S. aureus* resistente a meticilina (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. Todos los péptidos mostraban un pronunciado efecto antimicrobiano (Figura 4).

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

Se investigaron los efectos antimicrobianos del péptido 232 (SEQ ID NO: 78) y el péptido 220 (SEQ ID NO: 67) 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 los péptidos son agentes antiinfecciosos altamente eficaces cuando se aplican localmente (Figura 5).

REIVINDICACIONES

1. Un péptido seleccionado de:

C-F-L-W-R-R-L-M-R-K-L-R	(SEQ ID NO: 74);
C-W-L-W-R-R-A-M-R-K-V-W	(SEQ ID NO: 76);
L-R-L-W-R-R-L-M-R-K-V-W	(SEQ ID NO: 77);
R-R-L-W-R-R-W-M-R-K-V-L	(SEQ ID NO: 78);
C-R-L-W-R-R-R-M-R-K-V-W	(SEQ ID NO: 79);
L-R-L-W-R-R-S-M-R-K-V-W	(SEQ ID NO: 81);
K-K-L-W-R-R-W-W-R-K-V-L	(SEQ ID NO: 90);
R-W-C-K-L-W-R-R-L-M-R-K-V-R-R-L	(SEQ ID NO: 85);
R-W-C-F-L-W-R-R-L-M-R-K-H-R-R-L	(SEQ ID NO: 86);
W-C-K-L-W-R-R-L-M-R-K-V-R-R	(SEQ ID NO: 87);
W-R-R-W-L-R-K-S-V-K-R-L	(SEQ ID NO: 93);
W-C-R-W-L-R-K-M-V-K-A-L	(SEQ ID NO: 94);

y

5 W-R-R-W-L-R-K-M-V-K-R-L (SEQ ID NO: 95).

2. Un péptido según la reivindicación 1, en el que un COOH libre en el extremo carboxiterminal se ha transformado en CONH₂.

3. Un péptido según la reivindicación 1 o 2, en el que un grupo NH₂ libre del extremo aminoterminal se ha transformado en CH₃CONH.

10 4. Un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el aminoácido Cys, si está presente, se ha reemplazado por una acetamidometilcisteína.

5. Un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, siendo dicho péptido

R-R-L-W-R-R-W-M-R-K-V-L (SEQ ID NO: 78).

15 6. Una composición farmacéutica que comprende un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Una composición farmacéutica según la reivindicación 6, para uso en el tratamiento y/o la prevención de infecciones, inflamaciones, tumores, dolor, heridas y cicatrices.

20 8. La composición farmacéutica según la reivindicación 7, para uso en 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.

9. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, formulada para administración oral, administración sistémica, administración parenteral, administración local o administración tópica.

25 10. Alimento que comprende un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

11. Un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso como medicamento.

12. Un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en el tratamiento y/ la prevención de infecciones, inflamaciones, tumores, dolor, heridas y cicatrices.

13. Un péptido para uso según la reivindicación 12, en el que dicho péptido se formula para administración oral, administración sistémica, administración parenteral, administración local o administración tópica.

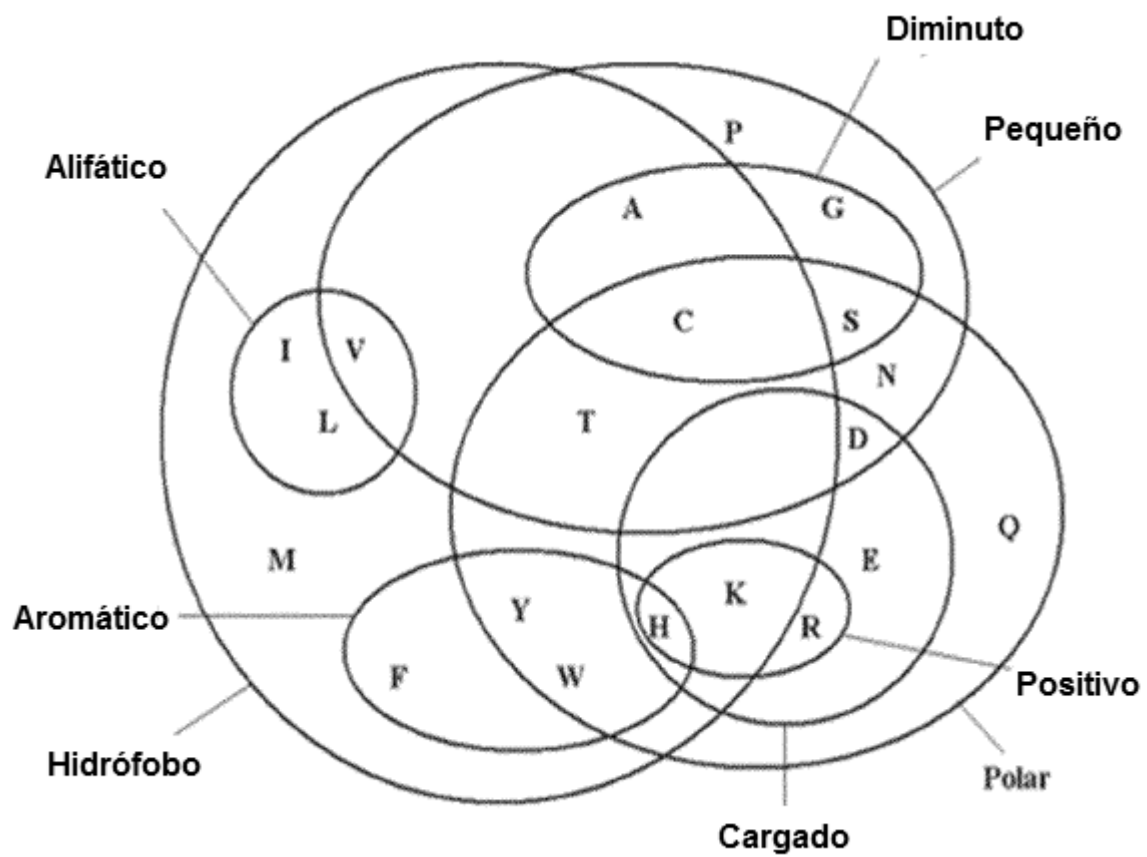


Figura 1

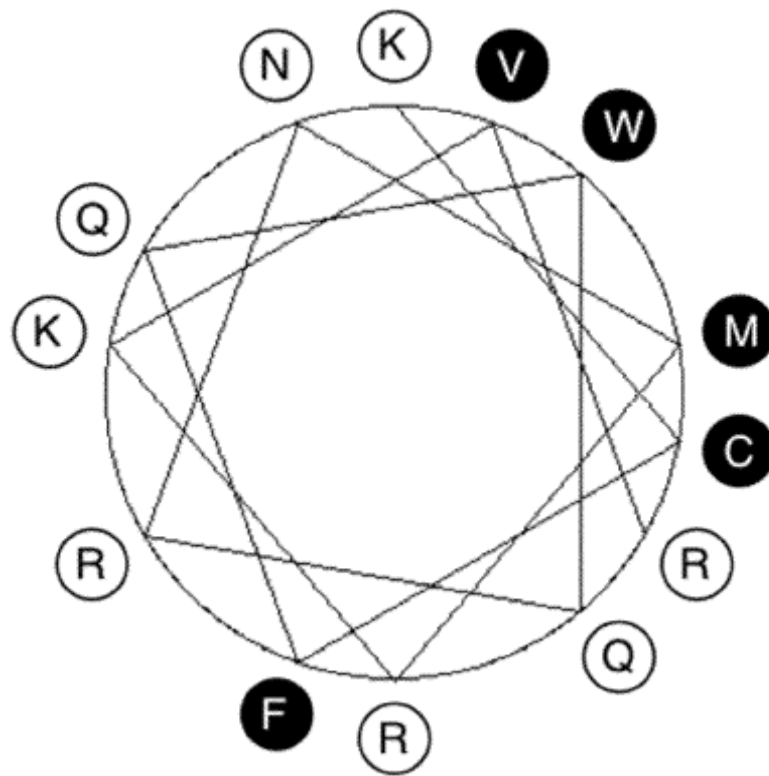
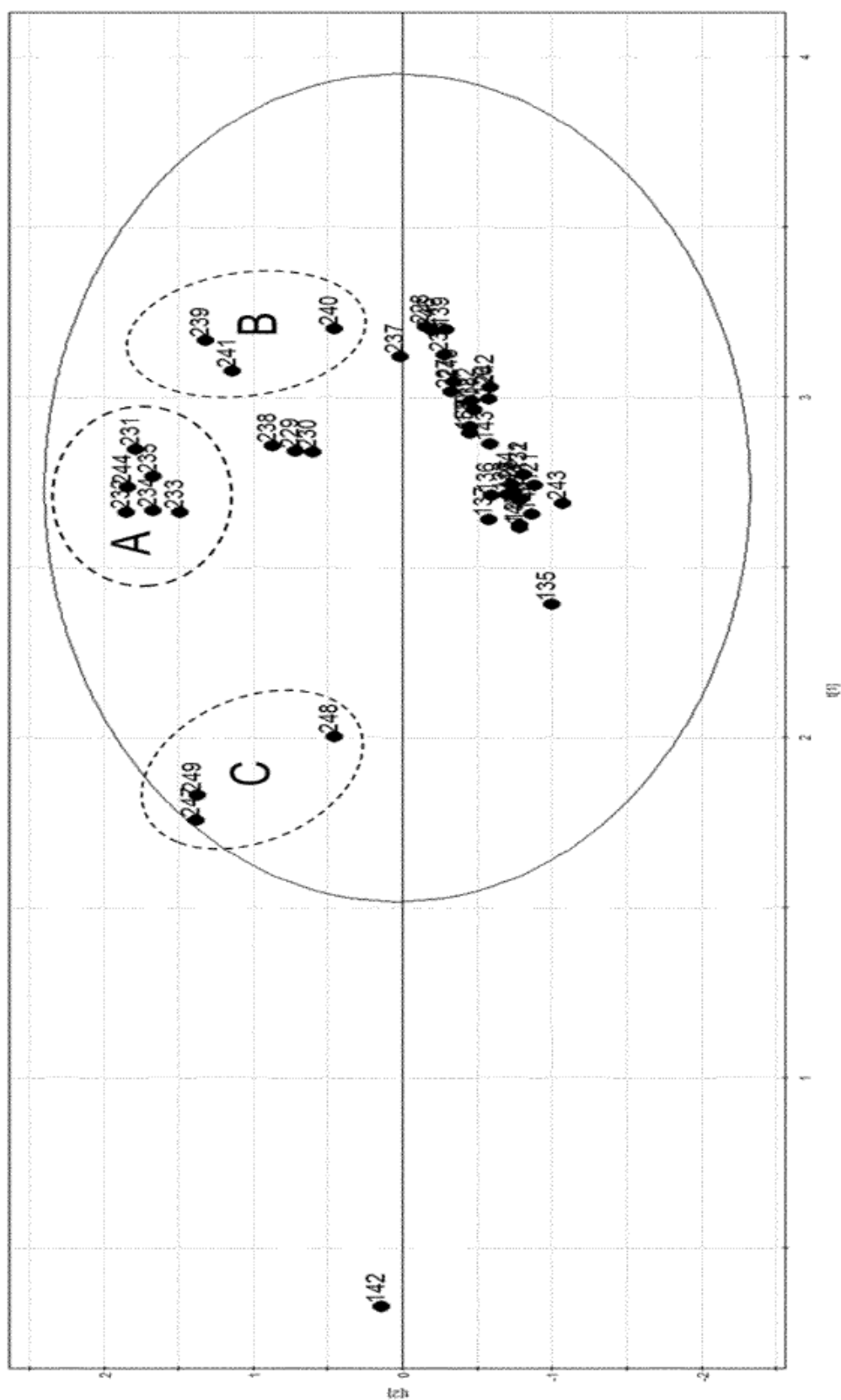
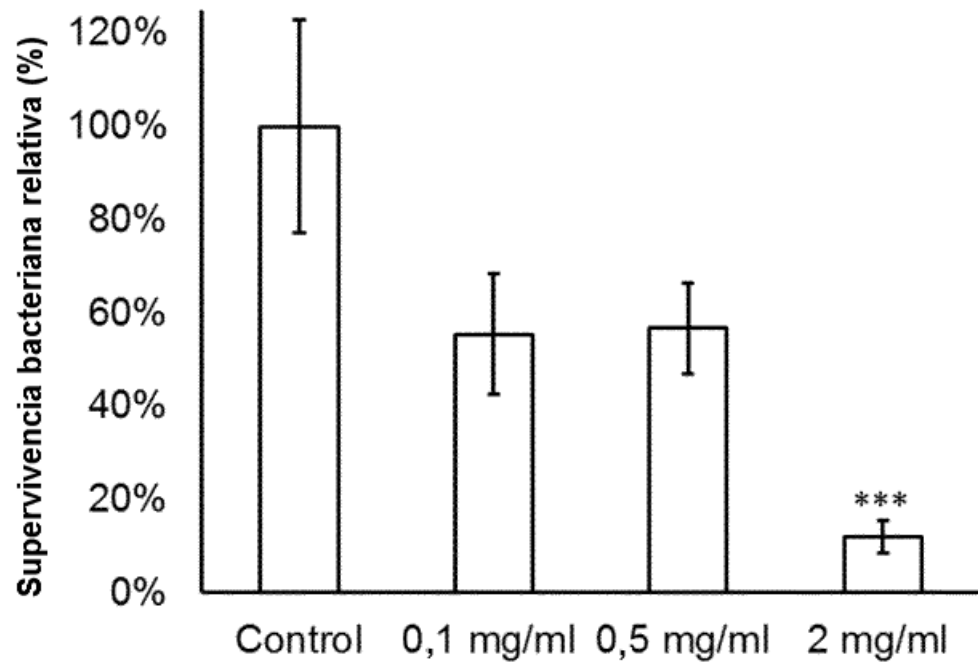


Figura 2



A



B

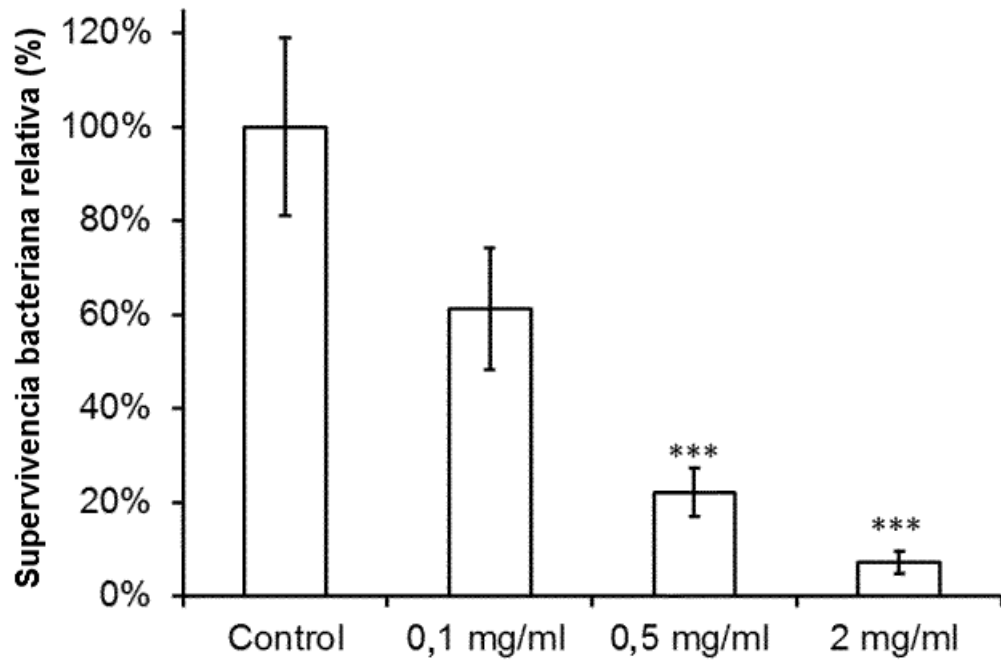


Figura 4

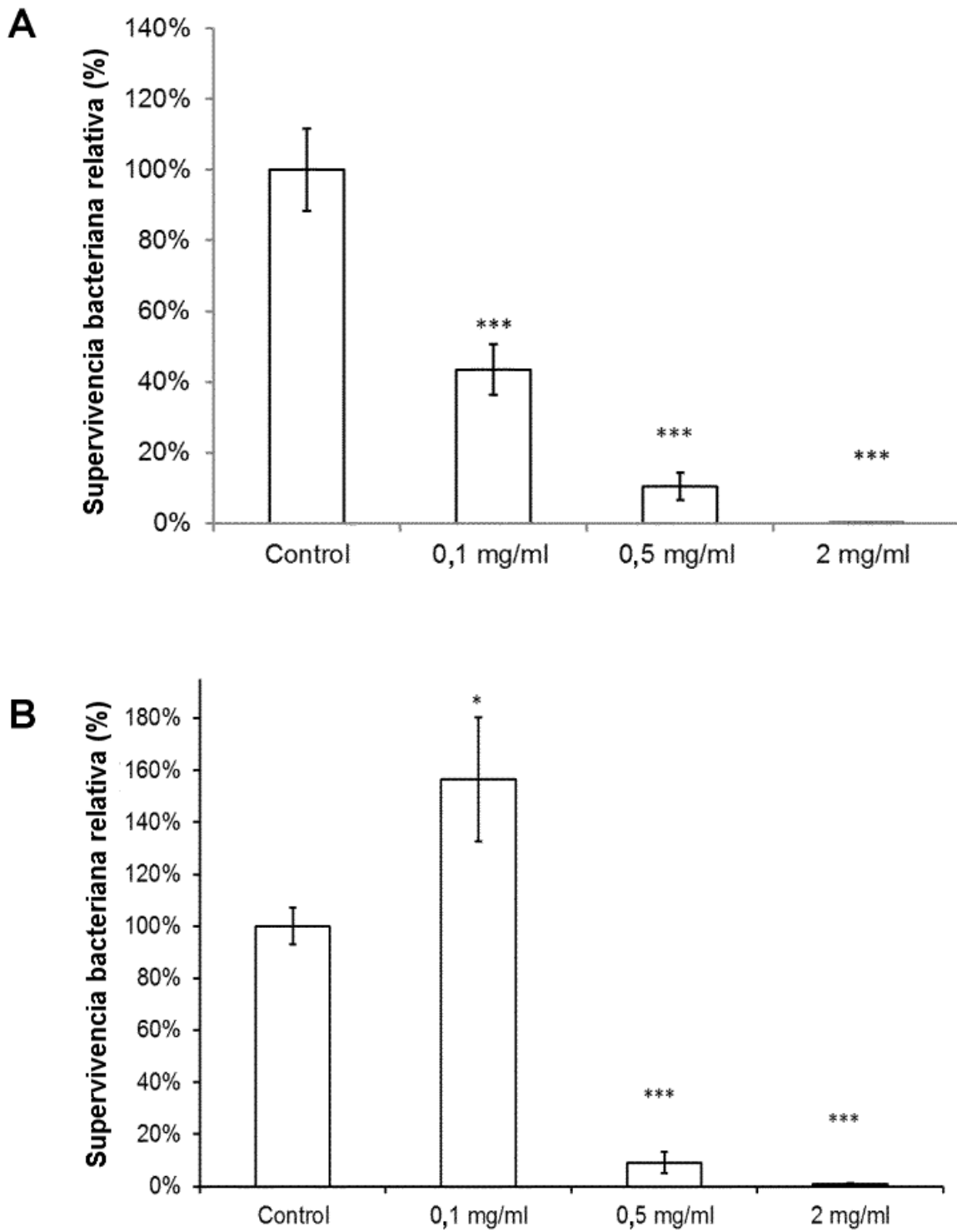


Figura 5