

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 760 990**

51 Int. Cl.:

C07K 14/79 (2006.01)

A61K 38/40 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2016 PCT/IB2016/054513**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2017 WO17025846**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2016 E 16763573 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3334759**

54 Título: **Fragmento de lactoferrina para la utilización como agente antibacteriano y antiviral**

30 Prioridad:

11.08.2015 IT UB20153058

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

18.05.2020

73 Titular/es:

**FARMAGENS HEALTH CARE SRL (100.0%)
Via F.S. Nitti, 15
00191 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**SANNETTI, AUGUSTO;
PAGANO, FRANCESCO;
GALDIERO, STEFANIA y
GALDIERO, MASSIMILIANO**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 760 990 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

Fragmento de lactoferrina para la utilización como agente antibacteriano y antiviral

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un nuevo fragmento de lactoferrina para el uso como agente antimicrobiano y antiviral. La presente invención se refiere a un agente antimicrobiano y antiviral que consiste al menos en un fragmento de péptido de lactoferrina bovino como ingrediente activo.

10

Antecedentes de la invención

15 La lactoferrina es una glicoproteína de 80 kDa que se une al hierro presente en la mayoría de los fluidos excretados del cuerpo, incluyendo las lágrimas, la bilis, el moco bronquial, los fluidos gastrointestinales, el moco cervicovaginal, el fluido seminal y la leche. La lactoferrina es el constituyente principal de gránulos específicos secundarios de neutrófilos polimorfonucleares circulantes. La fuente de la lactoferrina más abundante es la leche y el calostro de los mamíferos.

20 La lactoferrina circula en el cuerpo a la concentración de 2-7 µg/ml, y lleva a cabo muchas funciones biológicas, incluyendo la regulación del metabolismo de hierro, la función inmune, y el desarrollo embrionario; está bien documentada su función antimicrobiana contra una amplia gama de patógenos, incluyendo las bacterias Gram positivas y Gram-negativas, las levaduras y los hongos. El efecto antimicrobiano se debe en parte a su capacidad de unirse al hierro, que es esencial para el crecimiento de los patógenos. La lactoferrina inhibe también la replicación de varios virus y aumenta la susceptibilidad de algunas bacterias a antibióticos y la lisozima a través de la unión del
25 componente lípido A de los lipopolisacáridos en las membranas bacterianas.

Sin embargo, la actividad antibacteriana de la lactoferrina no es muy potente, por lo tanto, a fin de explotar su actividad, se requiere una cantidad considerable de proteína. Esto representa, sin duda, una limitación para su utilidad como agente antimicrobiano.

30

Un intento de aumentar la actividad antibacteriana de la lactoferrina se realizó; por ejemplo, en la solicitud de patente japonesa N ° 62 (1987) 249931 que ha propuesto el uso combinado de lactoferrina con lisozima. También se informó de que la asociación de la lactoferrina y la IgA puede aumentar la actividad antibacteriana de la proteína.

35 Otro problema relacionado con el uso de la lactoferrina en general, y a su uso como un agente antibacteriano, en particular, es la inestabilidad con el calor, de hecho, la actividad antibacteriana de la lactoferrina puede en gran parte perderse por calentamiento a 62,5 °C durante 30 minutos, mientras que la desactivación completa se logra a una temperatura de 70 °C durante 15 minutos (Ford J.E. et al, Journal of Pediatrics, 1997, 90:29.); por lo tanto, el tratamiento térmico no se puede aplicar a los sustratos usando lactoferrina como agente antimicrobiano.

40

La lactoferrina también es sensible a las variaciones de pH.

45 La patente europea EP0438750 enseña que el hidrolizado de lactoferrina, o apolattoferrina, tiene una actividad antibacteriana extremadamente alta y una excelente estabilidad al calor que la molécula no hidrolizada correspondiente.

50 Un agente antimicrobiano que contiene fragmentos de péptidos que portan secuencia específica derivados de la lactoferrina se da a conocer en la solicitud de patente US 5.304.633. También WO2004089986 y WO012542 describen varios péptidos de lactoferrina que tienen actividad bactericida o citotóxica. Rastogi et al., 2014 (PLoS ONE, 9 (3), página e90011) dan a conocer la identificación de tres péptidos digeridos tripticos de la lactoferrina bovina que tienen actividad antimicrobiana.

55 A pesar de estos resultados, la identificación de otras formas, o porciones activas de lactoferrina, capaces de mantener de forma selectiva el efecto antimicrobiano y antiviral a un alto y estable nivel, es fuertemente necesaria en el campo de la investigación y el desarrollo de péptidos antimicrobianos para sus posibles aplicaciones terapéuticas.

Características de la invención

60 Un primer objetivo de la presente invención es proporcionar un nuevo fragmento de péptido de la lactoferrina bovina, y sus derivados, que tenga una secuencia de aminoácidos específica y actividad antimicrobiana y antiviral.

Un segundo objetivo de la presente invención es proporcionar un agente antimicrobiano y antiviral que comprende dicho fragmento de péptido de lactoferrina bovina, y sus derivados, como principio activo.

Un tercer objetivo de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende dicho fragmento de péptido de lactoferrina bovina, y sus derivados, y/o dicho agente antimicrobiano que comprende dicho péptido de la lactoferrina, y sus derivados, solos o en combinación de los mismos, como ingrediente activo.

- 5 Finalmente, un último objetivo de la presente invención es el uso como agente antimicrobiano y antiviral del fragmento de péptido de la lactoferrina bovina, y sus derivados, el uso del agente activo que comprende dicho péptido de lactoferrina bovina, y sus derivados, y el uso de las composiciones que los comprenden.

Descripción de las figuras

10

La Figura 1 muestra la gráfica de la prueba de toxicidad in vitro. La figura 1 muestra (A) el ensayo de MTT del péptido de SEQ ID No. 1; Figura 1 (b) muestra el ensayo de MTT del péptido de SEQ ID No. 2 que no es parte de la invención.

La Figura 2 muestra la gráfica del ensayo de hemólisis.

- 15 La figura 2 (A) muestra la hemólisis en porcentaje inducida por el péptido de la SEQ ID No. 1 a diversas concentraciones; la Figura 2 (B) muestra la hemólisis en porcentaje inducida por el péptido de la SEQ ID No. 2, que no es parte de la invención, a diversas concentraciones.

La Figura 3 muestra la gráfica de la actividad antibacteriana a diversas concentraciones de los péptidos de SEQ ID No. 1, y SEQ ID No. 2 que no es parte de la invención.

- 20 La Figura 3 (A) muestra la gráfica de la inhibición en porcentaje frente al *E. coli*. La figura 3 (B) muestra la gráfica de la inhibición en porcentaje frente a *S. aureus*.

La Figura 4 muestra la gráfica de la actividad antiviral a diversas concentraciones de los péptidos de SEQ ID No. 1, y SEQ ID No. 2 que no es parte de la invención.

25 Descripción detallada de la invención

La presente invención describe un péptido derivado de lactoferrina bovina (*Bos taurus*) utilizada como inhibidores de amplio espectro contra las infecciones causadas por una variedad de patógenos. Estos patógenos pueden incluir bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, patógenos fúngicos y virus de ADN o ARN. El nuevo péptido de lactoferrina de acuerdo con la presente invención ha mostrado actividad antifúngica, antibacteriana y antiviral, estabilidad adecuada y falta de toxicidad in vitro en células de mamífero.

30

El número creciente de infecciones causadas por bacterias multiresistentes a los antibióticos es actualmente una importante amenaza para la salud humana. En la actualidad existe una necesidad urgente de nuevos fármacos, preferiblemente con diferentes mecanismos de acción para evitar el problema de la resistencia cruzada, así como nuevas estrategias para combatir los patógenos emergentes Gram-negativos resistentes a múltiples fármacos.

35

Se han descrito varios péptidos bioactivos en la literatura científica y de patentes. Generalmente, los péptidos bioactivos se aíslan de fuentes naturales, y recientemente han sido objeto de estudios de análisis de estructura-función en profundidad. Además, los péptidos naturales se utilizan como puntos de partida para el diseño de análogos de péptidos sintéticos. Los péptidos bioactivos son típicamente moléculas anfipáticas catiónicas de 12 a 45 aminoácidos de longitud, permeabilizan membranas celulares y ejercen actividad antimicrobiana. Las características antibacterianas, antifúngicas, antivirales, anticancerígenas y de cicatrización de heridas de péptidos bioactivos han sido ampliamente descritos. Parámetros estructurales considerados capaces de modular la actividad y selectividad de los mismos incluyen helicidad, momento hidrofóbico, hidrofobicidad y la carga. Un número de péptidos naturales y sintéticos ya está presente ampliamente en la literatura, sin embargo, existe la necesidad de mejorar los péptidos y procedimientos para su uso.

40

45

No debe pasarse por alto el hecho de que el uso de péptidos terapéuticos es sin embargo difícil a causa de la necesidad de mantener, a pesar de la longitud limitada, la estructura tridimensional del péptido específica que permita mantener la actividad biológica.

50

Además, la producción y los procedimientos biosintéticos a menudo no consiguen, o tienen un bajo rendimiento, precisamente debido a la falta de, o limitación, de la estabilidad del péptido durante los procedimientos de biosíntesis y de purificación.

55

La lactoferrina bovina es una proteína globular multifuncional de 689 aminoácidos presente de forma natural en diferentes fluidos biológicos, tales como leche, saliva, lágrimas. La proteína aproximadamente pesa 80 kDa e incluye dos regiones homólogas. La lactoferrina tiene características antioxidante, antitumorales e inmunomoduladoras significativas, incluyendo propiedades inmunotrópicas y antiinflamatorias. La actividad antimicrobiana típica de la lactoferrina es debida a la fuerte afinidad de las dos regiones homólogas para iones Fe^{3+} que se restan del medio circundante, evitando así la proliferación de microorganismos. Además, la combinación de la lactoferrina con el ion férrico en las secreciones mucosas modula la actividad y la capacidad de agregación de bacterias y virus a las membranas celulares. La actividad bactericida de independiente de hierro es capaz de atacar y lisar la membrana bacteriana explotando la afinidad de sus dominios catiónicos a la membrana que está cargada negativamente. Específicamente, la proteína está cargada positivamente, directamente interactúa con la superficie

60

65

de la célula bacteriana, particularmente con el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas y con el ácido teicoico y lipoteicoico de las bacterias Gram-positivas. Tales interacciones con membranas bacterianas fueron observadas mediante técnicas de microscopía de electrones. In vivo, la degradación parcial de lactoferrina por pepsina gástrica libera péptidos, que, como se documenta por numerosos estudios, no sólo tiene actividad antimicrobiana, sino también antiviral y antifúngica.

La presente invención se refiere al uso de un péptido derivado de la lactoferrina bovina para la prevención y la inhibición de la proliferación de microorganismos. En particular, la invención proporciona un procedimiento para prevenir la infección por microorganismos mediante administración de una cantidad eficaz de la formulación farmacéutica que comprende el péptido derivado de la lactoferrina. En particular, se describe que un péptido derivado de la lactoferrina bovina tiene actividad antimicrobiana, antifúngica y antiviral.

El péptido antimicrobiano descrito en este documento ofrece una ventaja significativa en comparación con los agentes antimicrobianos utilizados en la actualidad. El uso de péptidos antimicrobianos proporciona, de hecho, una alternativa válida a los fármacos actuales para el tratamiento de infecciones virales y bacterianas. Los péptidos en general son versátiles en que, por ejemplo, pueden ser diseñados para interrumpir el ciclo de vida de un microorganismo con mecanismos de acción diferentes de los de los análogos de nucleósidos, pueden utilizarse como agentes antivirales y antibióticos o actuando de una etapa metabólica donde es menos probable el desarrollo de la resistencia. Los péptidos también proporcionan la ventaja de que pueden ser sintetizados en gran cantidad a coste relativamente bajo y pueden ser fácilmente modificados para expresar diferentes propiedades. La elección de los aminoácidos particulares, o los análogos de aminoácidos, que se incorporan en un péptido dependerá, en parte, por las aplicaciones específicas físicas, químicas o biológicas del péptido antimicrobiano.

En la presente descripción se utilizan como sinónimos los términos "péptido", "fragmento de péptido" y "polipéptido", y a menos que se especifique lo contrario, se refieren a compuestos orgánicos poliméricos de nitrógeno que resultan de la combinación de dos o más aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, que surgen de la escisión de proteínas. El término también incluye oligopéptidos, fragmentos de proteínas, análogos y derivados de proteínas, derivados pegilados, derivados glicosilados, y similares, tal como se entiende comúnmente por los expertos.

En una realización de la invención, el péptido de lactoferrina bovina (*Bos taurus*) comprende un fragmento de 26 aminoácidos correspondiente a la región de aminoácidos que se extiende desde el residuo 296 al residuo 321 de la proteína de lactoferrina bovina (número de acceso: B9VPZ5) y que tiene la secuencia de SEQ ID NO. 1: KFGKNSRSFQLFGSPGQRDLLFKD.

Cada residuo de aminoácido en el péptido, de acuerdo con la invención, puede estar en configuración isomérica (D) o (L), en la medida en que el péptido conserve sus propiedades funcionales. La elección de incluir un (L)- o (D)-aminoácido en un péptido antimicrobiano de la presente invención depende, en parte, de las características deseadas del péptido antimicrobiano. Por ejemplo, la incorporación de uno o más (D)-aminoácidos puede conferir una mayor estabilidad al péptido ya sea in vitro o in vivo. La inclusión de uno o más (D)-aminoácidos también puede aumentar o disminuir la actividad antimicrobiana del péptido. Por lo tanto, la inclusión de formas isoméricas "D", en comparación con las "L" más comunes, puede proporcionar péptidos antimicrobianos particularmente útiles.

En una realización de la invención, la secuencia del péptido de acuerdo con la invención, coincide exactamente con la secuencia de la región correspondiente de la lactoferrina.

Alternativamente, en algunas realizaciones, la secuencia del péptido puede contener también derivados de aminoácidos y aminoácidos no naturales, que se enumeran en el grupo de los alfa-aminoácidos, que se encuentran más comúnmente en las proteínas naturales, también conocidos como aminoácidos estándar (A. Lehninger Biochemistry, Segunda Edn. Zanichelli). De hecho, entre los aminoácidos que no sean los naturales presentes en los péptidos según la invención, se encuentran: norleucina, omofenilalanina, ornitina, citrulina, β -aminoácidos, gamma-aminoácidos, delta-aminoácidos, etc

Los aminoácidos no naturales son ampliamente utilizados incluso para modificar el comportamiento de las proteínas, que se incorporan en las mismas, para alterar la hidrofiliidad y la hidrofobicidad de ciertos dominios de proteínas, mejorar la funcionalidad de ciertas enzimas, hacer menos flexible la conformación de las proteínas, mejorar la farmacodinamia y la biodisponibilidad de ciertos medicamentos.

Según la presente invención, la sustitución de algunos aminoácidos naturales por miméticos, modificados o no naturales puede ayudar a asumir una estabilidad mayor al péptido final.

Por lo tanto, también péptidos homólogos que contienen derivados o aminoácidos no naturales, que llevan cadenas laterales no proteicas, se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Según la invención, se pueden utilizar los homólogos y derivados que tienen un ácido carboxílico terminal, o una carboxamida, o un alcohol terminal reducido, o cualquier sal farmacéuticamente aceptable, tal como una sal de metal, por ejemplo, sodio, potasio, litio o calcio, o una sal con una base orgánica, o una sal con un ácido mineral, incluyendo ácido sulfúrico, ácido clorhídrico,

o ácido fosfórico, o un ácido orgánico, por ejemplo ácido acético o ácido maleico. Generalmente, se puede usar cualquier sal farmacéuticamente aceptable siempre que las propiedades biológicas del péptido se conserven.

Los péptidos homólogos de acuerdo con la invención pueden tener uno o más residuos modificados por reacción de las cadenas laterales o grupos funcionales. Tales derivados incluyen, por ejemplo, moléculas que tienen grupos amino libres que forman clorhidratos de amina, grupos sulfónicos, grupos carbobenzoxílicos, grupos t-butiloxicarbonílicos, grupos cloro acéticos, grupo formilo. Los grupos carboxilo libres se pueden derivatizar para formar sales y ésteres; los grupos hidroxilo libres se pueden derivatizar para formar los derivados O-acilo, o derivados O-alquilo. También se incluyen los derivados de aminoácidos que comprenden grupos fenilo, alquilfenilo, trifluorometilfenilo, pirazinilo, piridinilo, tienilo, naftilo, pirenilo.

Más específicamente, algunos residuos del péptido de acuerdo con la invención puede no limitarse a aminoácidos naturales, tales como alfa-L-, o alfa-D-aminoácidos, o sus isómeros, pero también incluyen aminoácidos no naturales, tales como: D-, L-naftilalanina, D-, L-fenilglicina, D-, L-2-tienilalanina, D-, L-3-tienilalanina, D-, L-1, 2, 3, 4-pirenilalanina, D-, L-2- (pirinidil)alanina, D, o L-3-(pirinidil)alanina, D-, L-(pirazinil)alanina, D-, L-(isopropil)-fenilglicina, D-(trifluorometil)-fenilglicina, D-(trifluorometil)fenilalanina, D-rho-fluorofenilalanina, D-, L-rho-bifenilfenilalanina, D-, L-rho-metoxibifenilfenilalanina, D-, L-2-indol(alquil)alanina, y D-, L-alquilalanina, en los que el grupo alquilo es: metilo, etilo, propilo, hexilo, pentilo, isopropilo, isobutilo, sec-isotilo, isopentilo.

La sustitución para todos los residuos tiene la misma probabilidad. La elección de los cambios a realizar será dictada por el análisis de cada modificación, principalmente para obtener homólogos con mayor actividad antimicrobiana y estabilidad, pero menor toxicidad. La cantidad de residuos que pueden ser sustituidos simultáneamente es igual a 20%.

Además, según la invención, un derivado de péptido puede diferir de la secuencia natural debido a una modificación química que incluye, sin limitación, acilación en NH₂ terminal, acetilación, amidación con ácidos mercaptoacéticos, carboxilamidación terminal con amoníaco, metilamina, y similares.

Por lo tanto, dentro del alcance de la invención, también hay péptidos que tienen al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con el fragmento de péptido de SEQ ID No.

El péptido de acuerdo con la invención puede ser producido mediante todos los procedimientos conocidos para las personas expertas en materia. Los péptidos pueden aislarse a partir de hidrolizados de lactoferrina para la purificación posterior con procedimientos convencionales, de forma alternativa, los péptidos pueden ser producidos convenientemente mediante tecnologías de ADN recombinante de acuerdo con Sambrock et al. 1989, 1992, 2001, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York.

Preferiblemente, el péptido de acuerdo con la invención se sintetiza químicamente. A continuación, en la sección experimental, se describe un ejemplo de procedimiento de síntesis de péptidos antimicrobianos y antivirales, de acuerdo con la invención.

Según la invención, el péptido que tiene actividad antimicrobiana y antiviral, y sus derivados, puede ser utilizados como tales, sin modificación adicional, o en combinación con otros agentes antibacterianos y antivirales. Los péptidos se pueden administrar a diversos organismos de especies animales y seres humanos a través de alimentos, los ejemplos no limitativos son: goma de mascar, dulces, barras dietéticas, bebidas, zumos, leche, bebidas funcionales, productos de la leche y yogur, cápsulas, polvo granular, comprimidos. El péptido de acuerdo con la invención también se puede utilizar en los productos farmacéuticos medicinales y en los productos farmacéuticos no medicinales, los ejemplos no limitativos son: enjuagues bucales, antitranspirantes, desodorantes para la piel, cosméticos, lociones para el cabello y acondicionadores como cremas, pasta de dientes, productos para higiene femenina, productos para la higiene de los niños, productos destinados a los usuarios en edad geriátrica como pasta adhesiva para dentaduras postizas, pañales.

Un amplio ámbito de aplicación muy amplio del péptido de acuerdo con la invención se refiere a la industria de la limpieza y detergentes, de hecho, dichos péptidos, sin limitación, se pueden incorporar en la composición de jabones, detergentes, champús, productos para el cuidado personal, productos para el lavado y limpieza de la casa, incluyendo ropa y toallas de papel.

Además, el péptido de acuerdo con la invención se puede añadir o pulverizar, o se utiliza para recubrir, impregnar o tratar cualquier material o producto en el que se persiga y desee la prevención y la inhibición de la proliferación de microorganismos.

En una realización particularmente preferida de la invención, el péptido de acuerdo con la invención, solo o en combinación con otros agentes bacterianos y antivirales, constituyen el principio activo de composiciones farmacéuticas que tienen actividad antimicrobiana y antiviral que comprenden dichos péptidos y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender, además, disolventes, estabilizantes y excipientes, tales como soluciones acuosas, solución salina fisiológica tamponada,

polietilenglicol, ácido esteárico y sus sales de magnesio y de calcio, goma arábica y xantano, emulsiones grasas, glicerina, vegetal o aceites de ésteres orgánicos inyectables. Los agentes estabilizantes incluyen, sin limitación, carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa, dextranos, almidón, maltodextrinas, pululanos, sílice, talco, antioxidantes, tales como ácido ascórbico, glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular y otros compuestos ampliamente conocidos por los expertos en el campo farmacéutico.

La composición farmacéutica de la presente invención está en una forma adecuada para ser administrada mediante absorción oral, intravaginal, rectal, parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraorbital, intraperitoneal o por absorción pasiva o facilitada a través de la piel. Con el fin de facilitar la transferencia del tratamiento antibacteriano o antiviral para el sujeto receptor, la composición farmacéutica también se puede incorporar en liposomas, microesferas u otras matrices poliméricas.

El péptido de lactoferrina según la invención está presentes en la composición farmacéutica en una cantidad variable que oscila entre 0,01 y 2 miligramos, preferiblemente en una cantidad entre 0,1 y 1 miligramo por gramo de composición. En particular, la composición farmacéutica que tiene actividad antibacteriana y antiviral de acuerdo con la invención comprende el fragmento de péptido de SEQ ID No: 1, y sus homólogos y derivados que presentan al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con el fragmento de péptido de secuencia SEQ ID NO. 1, en una cantidad total que varía entre 0,01 y 2 miligramos por gramo de composición.

La cantidad total eficaz del péptido según la invención depende de las necesidades individuales del sujeto a ser tratado; gravedad de la infección y la vía de administración se puede variar a discreción del médico a cargo.

El fragmento de péptido de acuerdo con la invención ha demostrado actividad antibacteriana y antiviral excepcionales, manteniendo al mismo tiempo las propiedades de lactoferrina completas, tal como se demuestra por los experimentos presentados en la sección experimental a continuación de esta descripción.

SECCION EXPERIMENTAL

La invención se ilustra ahora con referencia a los ejemplos y modos de uso y ensayos experimentales no limitantes del alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Preparación de Péptidos

Los péptidos se sintetizaron utilizando el procedimiento de 9-fluorenilmetoxicarbonilo estándar en un sintetizador de péptidos multiespecífico PSSM8 (Shimadzu Corporation Biotechnology, Kyoto, Japón). La resina NovaSyn TGA (Merck, Darmstadt, Alemania) (sustitución 0,25 mmol/g) se utilizó como soporte en fase sólida, y la síntesis se realizó en una escala de 100 micromol. Diez equivalentes del primer aminoácido se acoplaron en la resina de acuerdo con el procedimiento N, N'-diciclohexilcarbodiimida (DIC)/4-dimetilaminopiridina (DMAP) (10 equivalentes de aminoácido con Fmoc, 5 equivalentes de DIC, 0,1 equivalentes de DMAP). Todos los aminoácidos posteriores, 4 equivalentes con respecto a la resina, se acoplaron de acuerdo con el procedimiento de N-hidroxibenzotriazol (HOBT)/tetrafluoroborato de 2-benzotriazol-3-tetrametiluronio (TBTU)/Di-iso-propiletilamina (DIPEA) [1 equivalente de aminoácido con Fmoc, 1 equivalente de TBTU, un equivalente de HOBT (0,5 HOBT mM en NMP), 2 equivalentes de DIPEA (DIPEA 1 mM en N-metilpirrolidona, NMP)]. El grupo protector Fmoc se eliminó con piperidina al 30% en NMP (v/v). Los péptidos se desprotegeron completamente y se escindieron de la resina mediante ácido trifluoroacético (TFA) con tioanisol al 5%, etanoditiol al 3% y anisol al 2% como atrapadores. Los péptidos en bruto se precipitaron en hielo en acetato de éter, se filtraron, se disolvieron en agua, se liofilizaron y se redujeron con ditiotreitil (DTT).

Los péptidos se purificaron hasta homogeneidad por cromatografía líquido a alta presión preparativa en fase inversa (RP-HPLC) en un equipo de cromatografía de Shimadzu Class-LC8A, equipado con un detector SPD-10A Lambda UV. Las muestras se inyectaron en una columna C18 Phenomenex (columna Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.) (22 mm x 25 cm, 5 mm), se eluyeron con una mezcla de disolventes que consistía en H₂O/TFA al 0,1% (A) y CH₃CN/TFA al 0,1%(B). Se utilizó un gradiente lineal de 5 a 50% de B durante 17 min a un caudal de 20 ml/min. Las fracciones recogidas se liofilizaron y se analizaron mediante HPLC de fase inversa en un Shimadzu Class-LC10 equipado con un detector de diodos SPD-M10AVP usando una columna analítica Phenomenex C18 (4,6 x 250 mm, 5 mm). La identidad de los péptidos purificados se confirmó por cromatografía líquida/ espectrometría de masas (LC-MS ESI) utilizando un Thermo Electron Surveyor MSQ.

Resultados

El rendimiento de los péptidos obtenidos fue entre 20 y 30%, en el producto purificado hasta el 99%. Como es conocido por los expertos en la materia, tal rendimiento es muy bueno para la síntesis de péptidos de una longitud similar; además, el procedimiento de síntesis y purificación resultó ser extremadamente reproducible. Todos los péptidos homólogos que contienen residuos de aminoácidos modificados se obtuvieron por síntesis en fase sólida

con metodologías similares a las secuencias nativas, cambios apropiados en la estrategia sintética, también conocidos por los expertos en la materia.

Ejemplo 2 - Ensayo de Toxicidad

5

Ensayo de MTT: Se cultivaron células de la línea celular Vero (células epiteliales renales ATCC CRL-1586™ de *Cercopithecus aethiops*) en las condiciones de crecimiento apropiadas según lo recomendado por el proveedor en placas de 96 pocillos a una concentración de 2×10^4 células/pocillo y se trataron con los péptidos de acuerdo con la invención a diferentes concentraciones diluidas en medio de crecimiento (1, 5, 10, 20, 50, 100, 250 mM) durante 3, 10 y 24 horas. Posteriormente, el medio se aspiró y las células se incubaron a 37 °C durante 3 horas con 10 µl de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), un colorante vital capaz para entrar en la mitocondria y ser metabolizado por complejo de succinato deshidrogenasa a sales de formazán, determinando una coloración violeta en esas células.

15 A continuación, el sobrenadante se descargó y se añadió isopropanol (100 µL) a cada pocillo para disolver las sales producidas. La reacción se dejó proceder por incubación a temperatura ambiente en agitación ladeada durante 20 minutos, a continuación, se realizó una lectura espectrofotométrica a 570 nm para evaluar la viabilidad celular en términos de inhibición de proliferación y crecimiento celular.

20 Resultados

Los resultados obtenidos, que se muestran en la Figura 1, han mostrado que ambos péptidos de acuerdo con la invención no son tóxicos contra células eucariotas, de hecho, sólo a altas concentraciones de las variantes de los dos péptidos de la invención determinan un máximo de toxicidad del 20%, medida en función de la integridad celular en el sistema experimental. Las figuras 1 (A) y 1 (B) muestran los resultados del ensayo de MTT llevados a cabo en células Vero tratadas con el péptido de SEQ ID No. 1 (Fig. 1 (A)) y con el péptido de SEQ ID No. 2, que no es parte de la invención, (Fig. 1 (B)) a diferentes concentraciones.

Ejemplo 3 - Evaluación de la actividad hemolítica de los péptidos.

30

Se han aislado glóbulos rojos humanos de sangre de donantes sanos y se han utilizado para realizar el ensayo hemolítico. Los fragmentos peptídicos de la lactoferrina de la SEQ ID No. 1 y SEQ ID No. 2 a diferentes concentraciones (1, 5, 10, 20, 50, 100, 250 mM) se añadieron a la suspensión de eritrocitos hasta un volumen final de 100 µl. Las muestras se incubaron con agitación a 37 °C durante 60 min. La liberación de hemoglobina se controló midiendo la absorbancia (Abs) del sobrenadante a 540 nm. Como control negativo, es decir, cero hemólisis (blanco), se utilizaron glóbulos rojos resuspendidos en PBS, mientras que los eritrocitos completamente lisados se utilizaron como control positivo para 100% de hemólisis. El porcentaje de hemólisis se calculó usando la siguiente ecuación:

40 $\% \text{ Hemólisis} = \left[\frac{\text{Abs de la muestra} - \text{Abs de control negativo}}{\text{Abs de control positivo} - \text{Abs de control negativo}} \right] \times 100.$

Resultados

45 Los resultados del ensayo hemolítico obtenidos mediante el uso de los péptidos de lactoferrina según la invención han demostrado que los dos péptidos no son tóxicos hacia los eritrocitos. Las figuras 2 (A) y 2 (B) muestran la liberación de hemoglobina monitorizada mediante la medición de la absorbancia (Abs) del sobrenadante a 540 nm, con el péptido de la SEQ ID No. 1 (Fig. 2 (A)), respectivamente, y el péptido de SEQ ID No. 2, que no es parte de la invención, (Fig. 2 (B)) a diferentes concentraciones.

50

Ejemplo 4 - Actividad antibacteriana

Se incubaron *Escherichia coli* (ATCC 11229) gram negativa y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) gram positivo en un medio adecuado a 37 °C para alcanzar una turbidez visible. A continuación, el inóculo se resuspendió en solución salina estéril al 0,9% hasta alcanzar un valor de DO₆₀₀ correspondiente a una concentración de aproximadamente 1×10^8 ufc/ml. Este inóculo estandarizado se diluyó 1:10 en medio adecuado y la concentración del inóculo se confirmó por recuento de colonias.

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó utilizando el procedimiento de microdilución en tampón de lavado 96. Las diluciones en serie del péptido (1, 5, 10, 20, 50, 100, 250 mM) se prepararon, respectivamente, en PBS para alcanzar un volumen final de 100 microlitros por pocillo, se añadieron 10 microlitros de inóculo estandarizado a cada pocillo (correspondiente a una concentración final de aproximadamente 4×10^5 ufc/ml). El medio de cultivo solamente se utilizó como control negativo y el medio de cultivo sembrado con el inóculo microbiano se utilizó como control positivo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

65

Las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) se determinaron por medición espectrofotométrica.

Resultados

Los datos experimentales obtenidos mediante el análisis de la actividad antibacteriana contra patógenos comunes, tales como E. coli y S. aureus, han demostrado que ambos fragmentos de péptidos de lactoferrina según la invención, SEQ ID No. 1 y SEQ ID No. 2, que no es parte de la invención, tienen una buena actividad antimicrobiana mayor que 60% a 10 µM hacia E. coli, la Figura 3 (a). La actividad del péptido de SEQ ID No. 2 es reducida, sin dejar de ser siempre mayor que 40% a 10 µM, la Figura 3 (B). El péptido de la presente invención por lo tanto tiene una excelente actividad antibacteriana y representa compuestos válidos que se pueden utilizar como formas de realización básicas para modificaciones adicionales, tal como se presenta en la descripción.

Ejemplo 5 - Actividad antiviral

Las células de la línea celular Vero se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero de ternera fetal al 10%. El HSV-1 (virus herpes simple tipo 1) que contiene el gen lacZ bajo el control del promotor IE-1 del citomegalovirus (CMV) que expresa beta-galactosidasa se ha propagado como se describe en dirigida en Galdiero M. Site-directed linker and insertion mutagenesis of herpes simplex virus type 1 glycoprotein HJ Virol 1997, 71: 2163-70. Los péptidos se disolvieron en medio DMEM con suero y se usaron a diferentes concentraciones. El experimento se llevó a cabo en paralelo con las mezclas de péptidos y controles negativos. Con el fin de evaluar el efecto de los péptidos sobre la inhibición de la infectividad por HSV, se trataron monocapas de células de la siguiente manera.

i) experimento de "co-exposición": las células se incubaron con concentraciones crecientes de péptidos (1, 5, 10, 20, 50, 100, 250 mM) y con el inóculo viral durante 45 min a 37 °C. El virus no penetrado se inactivó mediante la adición de tampón de citrato a pH 3,0 después de 45 min de incubación con las células a 37 °C. Las células se incubaron entonces durante 48 horas a 37 °C en DMEM suplementado con carboximetilcelulosa (CMC). Las monocapas se fijaron, se tiñeron con 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido (X-Gal) y se contaron las placas con lisis. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y se calculó el porcentaje de inhibición en comparación con los experimentos de control.

ii) experimento "pretratamiento al virus": aproximadamente 2 x 10⁴ unidades formadoras de placas con HSV-1 (UFP) se incubaron en presencia de 20 µM de péptido durante 45 min a 37 °C, y a continuación se valoró en monocapas de células Vero.

iii) experimento "preexposición de las células": las células Vero se incubaron con 20 µM de péptido durante 30 min a 4 °C. Los péptidos se retiraron y las células se lavaron con PBS antes de ser infectadas con diluciones en serie de HSV-1 y se incubaron durante 45 min a 37 °C.

Resultados

Los datos experimentales obtenidos mediante el análisis de la actividad antiviral contra los virus con envoltura (HSV-1) han mostrado una buena actividad antiviral con una CI50 igual a 10 µM. Por lo tanto, el péptido de la presente invención tiene una excelente actividad antiviral y representa un compuesto válido para ser utilizado como forma de realización básica para modificaciones adicionales tal como se presenta en la descripción.

Listado de Secuencias

<110> FARMAGENS HEALTHCARE SRL

<120> FRAGMENTO DE LACTOFERRINA PARA UTILIZAR COMO AGENTE ANTIBACTERIANO Y ANTIVIRAL

<130> 9536

<150> IT102015000044047

<151> 2015-08-11

<160> 2

<170> BISSAP 1.3

<210> 1

<211> 26

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 1

Lys Phe Gly Lys Asn Lys Ser Arg Ser Phe Gln Leu Phe Gly Ser Pro
 1 5 10 15
 Pro Gly Gln Arg Asp Leu Leu Phe Lys Asp
 20 25

<210> 2

ES 2 760 990 T3

<211> 30
<212> PRT
<213> Bos taurus

5 <400> 2
Tyr Thr Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Arg
1 5 10 15
Lys Thr Ser Lys Tyr Ser Ser Leu Asp Cys Val Leu Arg Pro
20 25 30

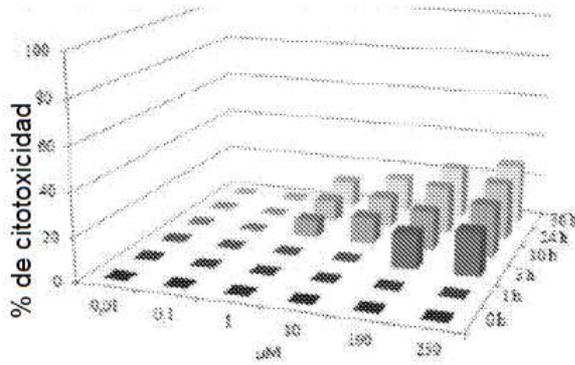
10

REIVINDICACIONES

1. Fragmento de péptido correspondiente a la región de aminoácidos que se extiende desde el residuo de aminoácido 296 a 321 de la proteína de lactoferrina bovina (número de acceso B9VPZ5) y que tiene la secuencia SEQ ID NO. 1, y sus homólogos y derivados con al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con el fragmento de péptido de secuencia SEQ ID NO. 1, en el que el péptido tiene actividad antibacteriana y antiviral.
2. Fragmento de péptido, según la reivindicación 1, en el que cada residuo de aminoácido puede estar presente como un isómero de configuración (D) o (L).
3. Fragmento de péptido, según la reivindicación 1 y 2, en el que el homólogo y derivado de péptido comprende un 20% de aminoácidos no naturales, beta-aminoácidos, gamma-aminoácidos, delta-aminoácidos, derivados de aminoácidos con cadenas laterales no proteicas.
4. Fragmento de péptido, según la reivindicación 3, en el que el homólogo y derivado de aminoácido tiene un ácido carboxílico terminal, o una carboxamida, o un alcohol terminal reducido, o cualquier sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
5. Fragmento de péptido, según la reivindicación 3, **caracterizado por que** el derivado de aminoácido incluye moléculas en las que los grupos amino libres pueden formar clorhidratos de amina, grupos sulfónicos, grupos carbobenzoxi, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacéticos, grupo formilo, en el que los grupos carboxilo libres se pueden derivatizar para formar sales y ésteres, los grupos hidroxilo libres se pueden derivatizar para formar derivados de O-acilo o derivados de O-alquilo.
6. Fragmento de péptido, según la reivindicación 3, en el que el derivado de aminoácido deriva de una modificación química que comprende la acilación del NH₂ terminal, acetilación, amidación con ácido tioglicólico, carboxilamidación terminal con amoníaco, metilamina, y similares.
7. Fragmento de péptido, según la reivindicación 3, en el que el derivado de aminoácido incluye un grupo: fenilo, alquilfenilo, trifluorometilfenilo, pirazinilo, piridinilo, tienilo, naftilo, pirenilo.
8. Fragmento de péptido, según la reivindicación 3, en el que el aminoácido no natural se selecciona del grupo de: D-, L-naftilalanina, D-, L-fenilglicina, D-, L-2-tienilalanina, D-, L-3-tienilalanina, D-, L-1, 2, 3, 4-pirenilalanina, D-, L-2-(pirinidil)alanina, D, o L-3-(pirinidil)alanina, D-, L-(pirazinil)alanina, D-, L-(isopropil)-fenilglicina, D-(trifluorometil)-fenilglicina, D-(trifluorometil)fenilalanina, D-rho-fluorofenilalanina, D-, L-rho-bifenilfenilalanina, D-, L-rho-metoxibifenilfenilalanina, D-, L-2-indol(alquil)alanina, y D-, L-alquilalanina, en los que el grupo alquilo es: metilo, etilo, propilo, hexilo, pentilo, isopropilo, isobutilo, sec-isotilo, isopentilo.
9. Uso no terapéutico del fragmento de péptido, según la reivindicación 1, como ingrediente activo de un agente antibacteriano y antiviral.
10. Uso, según la reivindicación 9, en el que el agente antibacteriano y antiviral se utiliza en productos farmacéuticos no medicinales.
11. Uso, según la reivindicación 10, en el que el producto farmacéutico no medicinal comprende productos de limpieza y detergentes, jabones, champús, detergentes, productos para la higiene personal, productos de lavandería y para la limpieza de la casa, paños y papel absorbente, enjuagues bucales, antitranspirantes, desodorantes para la piel, cosméticos, cremas, lociones y acondicionadores para el cabello, pasta de dientes, productos de higiene para mujeres y niños, productos destinados a usuarios de edad avanzada, pastas adhesivas para dentaduras postizas, pañales absorbentes.
12. Fragmento de péptido que corresponde a la región que se extiende desde el residuo de aminoácido 296 a 321 de la proteína de lactoferrina bovina y que tiene la secuencia SEQ ID NO. 1, y sus homólogos y derivados con al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con el fragmento de péptido de secuencia SEQ ID NO. 1 para uso médico.
13. Fragmento de péptido que corresponde a la región que se extiende desde el residuo de aminoácido 296 a 321 de la proteína de lactoferrina bovina y que tiene la secuencia SEQ ID NO. 1, y sus homólogos y derivados con al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con el fragmento de péptido de secuencia SEQ ID NO. 1 para uso en la prevención e inhibición de la proliferación de bacterias.
14. Composición farmacéutica que tiene actividad antibacteriana y antiviral que comprende el fragmento de péptido de SEQ ID No: 1, y sus homólogos y derivados con al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con el fragmento de péptido de secuencia SEQ ID No. 1, solo o en combinación con otros agentes antibacterianos y antivirales, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15. Composición farmacéutica que tiene actividad antibacteriana y antiviral, según la reivindicación 14, que comprende el fragmento de péptido de SEQ ID No: 1, y sus homólogos y derivados con al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con el fragmento de péptido de secuencia SEQ ID No. 1, en una cantidad total que varía entre 0,01 y 2 miligramos por gramo de composición.
- 5
16. Composición farmacéutica que tiene actividad antibacteriana y antiviral, según las reivindicaciones 14 y 15, que comprende además disolventes, estabilizantes y excipientes, soluciones acuosas, solución salina fisiológica tamponada, polietilenglicol, ácido esteárico y sus sales de magnesio y de calcio, goma arábiga y xantano, emulsiones grasas, glicerina, aceites vegetales o ésteres orgánicos inyectables, carbohidratos, tales como glucosa, 10 sacarosa, dextranos, almidón, maltodextrinas, pululanos, sílice, talco, antioxidantes, ácido ascórbico, glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular.
17. Composición farmacéutica que tiene actividad antibacteriana y antiviral, según las reivindicaciones 14 a 16 en una forma adecuada para administrarse por vía oral, intravaginal, rectal, parenteral, intravenosa, intramuscular, 15 subcutánea, intraorbital, intraperitoneal o por absorción pasiva o facilitada a través de la piel.
18. Composición farmacéutica que tiene actividad antibacteriana y antiviral, según las reivindicaciones 14 a 17, incorporada en liposomas, microesferas u otras matrices poliméricas.
- 20 19. Composición farmacéutica que comprende el fragmento de péptido de SEQ ID No: 1, y sus homólogos y derivados con al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con el fragmento de péptido de secuencia SEQ ID No. 1, solo o en combinación con otro agente antibacteriano y antiviral, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable para usar en la prevención e inhibición de la proliferación de microorganismos.

(A) Ensayo de MTT: péptido de SEQ ID NO: 1



(B) Ensayo de MTT: péptido de SEQ ID NO: 2

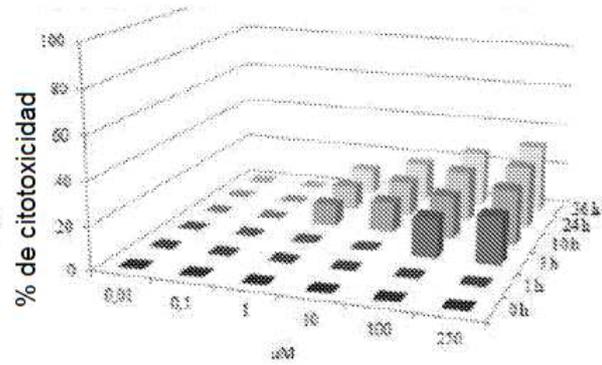
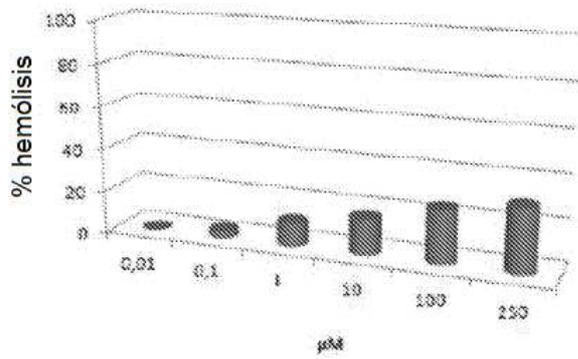


Figura 1

(A) Péptido de hemólisis de SEQ ID NO: 1



(B) Péptido de hemólisis de SEQ ID NO: 2

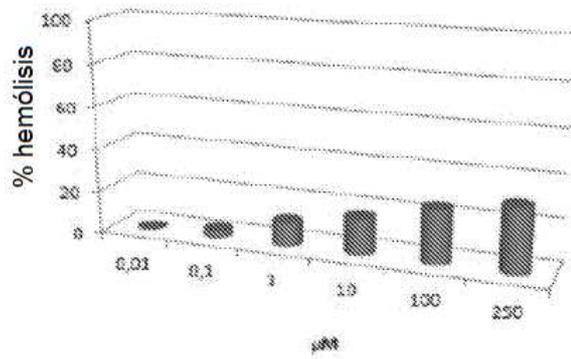


Figura 2

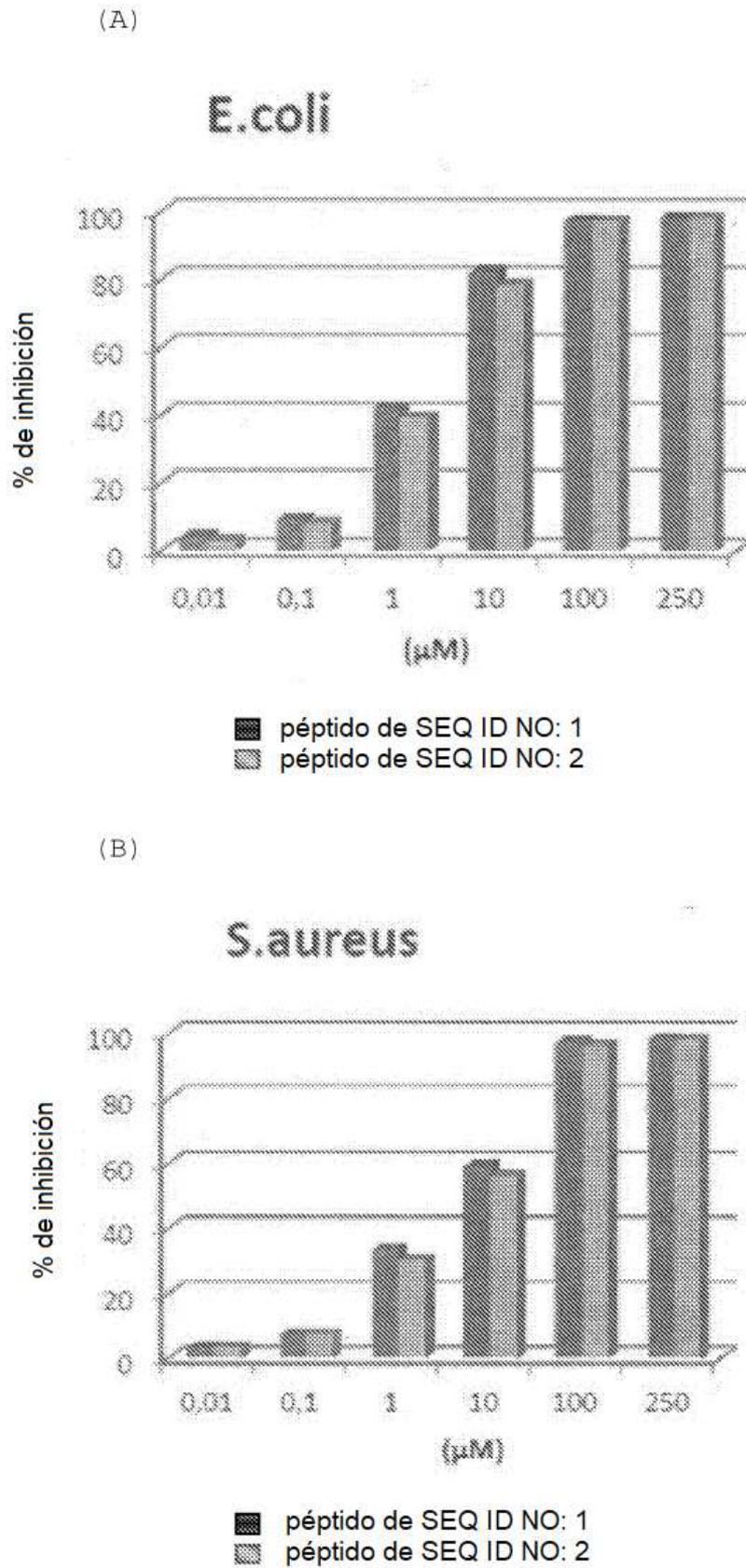


Figura 3

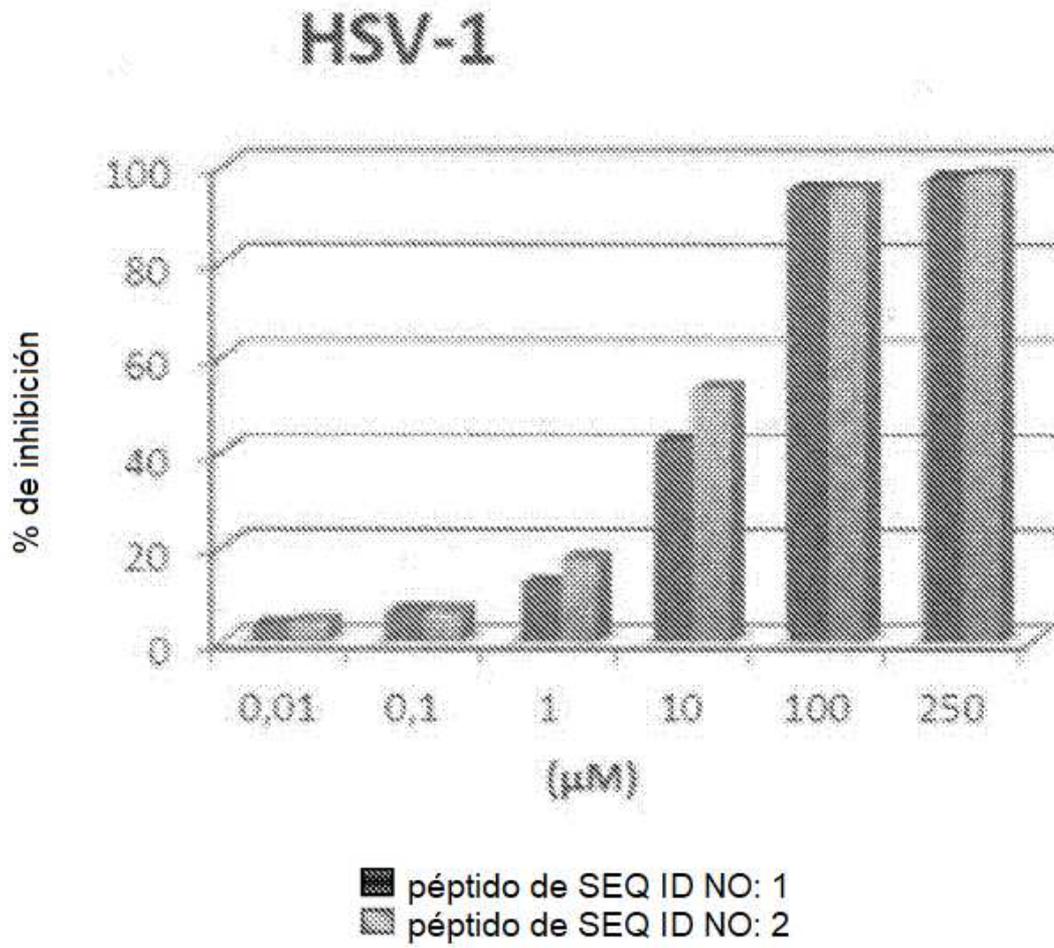


Figura 4