



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 N.º de publicación: **ES 2 094 696**

21 Número de solicitud: 9500468

51 Int. Cl.⁶: A61K 38/16

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **09.03.95**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.97**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.01.97

71 Solicitante/s: **Universidad de Alicante**
Ctra. San Vicente del Raspeig, s/n
03690 San Vicente del Raspeig, Alicante, ES

72 Inventor/es: **Soria Escoms, Bernat;**
Meseguer Soria, Inmaculada;
Torreblanca Calvo, Marina;
Colom Valiente, Francisca y
Alba Carballo, Itziar

74 Agente: **Ungría López, Javier**

54 Título: **Aplicaciones de la Halocina H7.**

57 Resumen:

Aplicaciones de la Halocina H7.
La Halocina H7, proteína aislada de los cultivos de la cepa CECT 4547 de *Haloferox gibbonsii* tiene múltiples aplicaciones en el campo médico-farmacéutico como diurético, antihipertensivo, protector frente a la isquemia cardíaca y nerviosa, reductor de la resistencia a la insulina, inhibidor de la secreción de ácido clorhídrico en la mucosa gástrica y del crecimiento celular, regulador del volumen celular, inmunomodulador, etc.

ES 2 094 696 A1

DESCRIPCION

Aplicaciones de la halocina H7.

Campo técnico de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de las aplicaciones de determinado tipo de sustancias protéicas denominadas bacteriocinas producidas por las halobacterias.

Más concretamente, la presente invención se refiere a las diversas aplicaciones de una bacteriocina concreta, a saber, la halocina H7 derivadas de su mecanismo de acción a nivel de la membrana celular.

Estado de la técnica anterior a la invención

Las halobacterias son microorganismos procarióticos halófilos extremos. Su habitat natural lo constituyen medios con elevadas concentraciones de sales tales como las salinas solares o los lagos salados. Estos microorganismos, tan sencillos como las bacterias en su organización celular, están incluidos en el "dominio" de las *Archaea* (Woese, CR, Kankler, O, Weelis, ML, 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87; 4576), es decir han evolucionado paralela e independientemente del resto de los seres vivos. Esto supone importantes diferencias en composición química, genética y capacidades biosintéticas y metabólicas con respecto a los otros "dominios": *Bacteria* y *Eucarya*.

Entre las múltiples características peculiares de las halobacterias, las más destacables o definitorias que los distinguen respecto de otros microorganismos halófilos se refieren a su espectro de crecimiento en elevadas concentraciones de sales, su pigmentación, la composición de lípidos de su membrana celular y la resistencia a ciertos antibióticos tales como la penicilina.

La taxonomía de este grupo de microorganismos ha sido recientemente modificada en base a un exhaustivo estudio de sus características morfológicas, composición y pruebas metabólicas (Torreblanca, M. Rodríguez-Valera, F. Juez, G. Ventosa, A. Kamekura, M. Kates, M. 1986. *Sistem. Appl. Microbiol.* 8: 89-99). Asimismo, existe una reciente revisión bastante completa sobre microorganismos halófilos, en la que se recopilan diversos aspectos de su estudio (Rodríguez-Valera, F. 1988. *Halophilic bacteria* Vol. I-II. Ed. F. Rodríguez-Valera. CRC Press, Boca Raton, Florida). Sin embargo, existe una propiedad interesante de las halobacterias a la cual no se ha prestado la atención debida. Dicha propiedad es su capacidad de producción de sustancias protéicas del tipo de las bacteriocinas denominadas *halocinas*. Las bacteriocinas son sustancias capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos a través de mecanismos de acción que afectan a objetivos específicos y vitales para la célula (Reeves, P, 1972 *Bacteriol. Rev.* 29: 24-45; Tagg, JR, Dajany, AS, Wannamaker, LW, 1976. *Bact. Rev.* 40: 722-756). A pesar de haberse descrito multitud de sustancias del tipo de las bacteriocinas, el número de ellas que se han estudiado en profundidad es muy reducido y solo de unas pocas se conoce con precisión el mecanismo de acción (Konisky, J, 1982. *Ann. Rev. Microbiol.* 36: 125-144), debido en gran parte a la dificultad que ello entraña. No obstante el potencial farmacológico que representan estas sustancias es pro-

bablemente incalculable. La producción de halocinas es una característica casi universal de las halobacterias (Meseguer, I. Ventosa, A. Rodríguez-Valera, F. 1986. *FEMS Microbiol. Lett.* 36: 177-182; Torreblanca, M. Meseguer, I. Ventosa, A. 1994. *Lett. Appl. Microbiol.* 19: 201-205) aunque en la actualidad solo se han estudiado dos halocinas H6 y H4 (Meseguer, I. Rodríguez-Valera, F. 1985. *FEMS. Microbiol. Lett.* 28: 177-182; Torreblanca, M. Meseguer, I. Rodríguez-Valera, F. 1989. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2655-1661) existe una gran diversidad de ellas.

Las halobacterias, además, poseen capacidad para producir halocinas, sustancias protéicas del tipo de las bacteriocinas, con un potencial farmacológico muy importante.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a las aplicaciones de la halocina H7, aislada de una nueva variedad de *Haloferax gibbonsii*, la variedad "alicante SPH7", depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con la referencia CECT 4547.

Concretamente, la halocina H7 es una proteína con un peso molecular de 30.500 ± 500 .

Tanto la halocina H7 como la nueva cepa CECT 4547 se describen en la solicitud de Patente co-pendiente n° 9500467 del solicitante, presentada simultáneamente y cuya descripción se incorpora aquí como referencia.

Dicha halocina H7, presenta la siguiente secuencia N-terminal:

N - Alanina - Aspártico - Glutámico - Asparagina - Glicina - Valina - Glicina - Aspártico - Glicina - Isoleucina - Glicina - Lisina - Aspártico - Fenilalanina - Aspártico - Fenilalanina - Triptófano - Leucina - Aspártico - Prolina

no habiéndose encontrado ningún péptido homólogo de la misma.

La halocina H7 es una proteína termorresistente, capaz de soportar un amplio rango de temperaturas. Mantiene su actividad a 90° durante 10 minutos y es necesario un tratamiento de 10 minutos a 121° centígrados para destruir totalmente su actividad por calor. Aunque la mayoría de las proteínas de organismos halófilos son saldependientes, en este caso se trata de una proteína capaz de mantener toda su actividad en un rango de soluciones tan amplio que va desde el agua destilada hasta concentraciones tan elevadas de sales como del 30%. Asimismo mantiene su actividad en las más diversas soluciones acuosas, no habiéndose encontrado hasta el momento pérdida de actividad por estos motivos en ningún caso. También soporta un amplio rango de pH del disolvente, siendo activa al menos, entre valores de pH de 5 a 9. Proteasas tales como la tripsina tampoco le afectan, sin embargo, si es sensible a otras enzimas tales como la pronasa. Es susceptible de liofilización y rehidratación sin pérdida alguna de actividad. Se trata además de una sustancia muy estable, capaz de conservar toda su actividad en soluciones acuosas estériles durante largos períodos de meses o años, incluso a temperatura ambiente. De igual modo soporta bien las bajas temperaturas, incluso la congelación aunque es sensible a sucesivas congelaciones y descongelaciones, que disminuyen parcialmente su actividad.

Las aplicaciones de la halocina H7 derivan de su mecanismo de acción a nivel de la membrana celular. La halocina H7 es una sustancia de tipo antibiótico capaz de alterar el equilibrio bioenergético existente en las membranas biológicas.

La halocina H7 inhibe de forma específica el intercambiador de *sodio-protón* localizado en la membrana celular. Dada la importancia de este mecanismo en el mantenimiento del volumen y el pH intracelular, la halocina H7 posee aplicaciones de gran interés relacionadas con el papel fisiológico y fisiopatológico del intercambiador sodio-protón. La actividad del intercambiador sodio-protón se demuestra por la extrusión de iones sodio contenidos en vesículas de membrana, al acidificar artificialmente el medio externo. La salida del sodio del medio intravesicular es muy lenta "per se" debido a la baja permeabilidad de la membrana a estos iones. Al acidificarse el medio externo, el intercambiador se activa, favoreciendo la rápida extrusión de iones sodio al medio externo. La disminución de la concentración de sodio en las vesículas se determina cromatográficamente. El efecto que produce la halocina H7 es una retención del sodio intravesicular como consecuencia de la inactivación del intercambiador sodio-protón (ver Tabla I).

TABLA I

Inhibición de la extrusión de sodio en vesículas de membrana por la halocina H7.

Tiempo (min)	% Na ⁺ retenido en vesículas	
	Control	H7
0	100	100
1	74	98
2	40	96
3	37	94
4	32	93
5	26	92
6	23	91

El intercambiador Na⁺-H⁺ está presente en todos los tipos celulares. Se sabe que participa, a nivel celular en varios procesos, como por ejemplo, a) el control del pH intracelular, b) el control de la concentración de Na⁺ intracelular, c) el control del volumen celular y el control de la división celular (Motais et al, *Biochim Biophys Acta* 10, 1075 (2): 169-180, 1.991; Maidurna et al, *Br J Cancer*. 67 (2): 297-303. 1993; Harguindey y Cragoe *Med Hypotheses*. 39 (3): 229-37, 1992). Desde el punto de vista tisular parece ser que interviene en varios procesos fisiológicos y patológicos de vital importancia como la diuresis, la hipertensión arterial, la isquemia cardiaca y cerebral, la división de las células tumorales, el transporte epitelial, la activación de los macrofagos, etc. Rolfe et al (*Am J Respir Cell Mol Biol*. 6 (6): 576-582, 1992) han señalado que el intercambiador sodio-protón participa en la liberación de citokinas por parte de los macrófagos. La inhibición de dicho intercambiador podría ser de gran utilidad en los procesos en los que se precisa de inmunosupresión (trasplantes, autoinmunidad, etc). Asimismo, la actividad del intercambiador

sodio-protón está aumentada en la hipertensión esencial en el humano y en los modelos animales de hipertensión (Canessa et al, *Hypertensión*. 17 (3): 340-348, 1991; Roskopf et al *Hypertensión*. 21 (5): 607-617, 1993). La asociación frecuente diabetes -hipertensión tendría como mecanismo común el aumento de actividad de dicho intercambiador (Dudeya et al, *Kidney Int*. 42 (5): 1184-1190, 1992; Dudeja PK et al *J Clin Invest*. 87 (5): 1755-1762, 1991; Dusing et al. *Clin Investia*. 71 (2): 119-25, 1993). La inhibición del intercambiador puede mejorar la resistencia a la insulina. Por último, el intercambiador sodio-protón participaría en los procesos de reperfusión durante un período de isquemia. Durante la reperfusión del miocardio el gradiente de H⁺ es muy alto (pH intracelular muy grande comparado con fuera). Como consecuencia se produce una carga de sodio intracelular que fuerza al intercambiador sodio-calcio a operar en sentido inverso y se produce un aumento del calcio citosólico hasta niveles tóxicos y, como consecuencia, la muerte celular. Al disponer de un buen bloqueador del intercambiador sodio-protón puede mejorarse dicho cuadro.

En la actualidad no se dispone de inhibidores fisiológicos del intercambiador sodio-protón. El amiloride y sus derivados inhiben el intercambiador pero no lo hace de forma específica. El amiloride es también un inhibidor del intercambiador sodio-protón, de otros intercambiadores, como el intercambiador sodio-calcio y de canales inespecíficos de sodio. A pesar de estas limitaciones el amiloride se está utilizando en terapéutica como diurético. No obstante, es grande el número de efectos secundarios. Por otra parte los derivados de amiloride que han mostrado un efecto más específico sobre el intercambiador sodio-protón tienen el grave inconveniente de ser difíciles de revertir.

Las ventajas más destacables que presenta la halocina H7 son las siguientes:

1.- Al ser un producto de naturaleza peptídica tiene reversibilidad de acción terapéutica y la facilidad para metabolizarse propia de las sustancias protéicas.

2.- Es una sustancia natural de tipo antibiótico, su poder bactericida está basado en su acción inhibidora del intercambiador sodio-protón.

3.- Es un inhibidor específico, activo a concentraciones muy bajas lo que disminuye los efectos secundarios.

4.- Puede operar en un gran rango de concentraciones de sales, temperatura y pH, lo que le convierte en el fármaco de elección en determinados procesos.

5.- Es resistente a la acción de la tripsina, lo que permite su utilización en el tracto intestinal.

6.- Al tratarse de un péptido sensible a pona su efecto puede terminarse cuando se desee.

De acuerdo con lo anterior, las aplicaciones de la halocina H7, objeto de la presente invención, son las siguientes:

- Diurético y antihipertensivo;
- Protector en los procesos de isquemia cardiaca y nerviosa;
- Reductor de la resistencia a la insulina en la

diabetes no insulino-dependiente;

- Inhibidor de la formación de ácido clorhídrico en la mucosa gástrica;
- Inhibidor del crecimiento celular;
- Regulador del volumen celular;
- Regulador del crecimiento de otras bacterias y organismos microbiológicos;
- Inmunomodulador;
- Inhibidor del transporte epitelial.

Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes experimentos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance. *Demostración del efecto de H7 sobre el intercambiador sodio-protón de mamíferos:*

De particular importancia a la hora de reivindicar sus usos terapéuticos es la demostración del efecto de H7 sobre células de mamíferos tal y como se demuestra en la siguiente serie de experimentos. En ratones que recibieron una inyección única de 2.250 unidades arbitrarias/gr de peso del ratón (se define como una unidad arbitraria, a la mínima cantidad de H7 capaz de producir un efecto inhibidor visible del crecimiento de *Halobacterium salinarium* en doble capa) se observaron los siguientes efectos: a) Aumento sensible de la concentración de Na⁺, e en orina de 24 h (la concentración de orina pasaba de 350-380 mmol/l en controles a 700 mmol/l en ratones tratados con halocina H7) dicho efecto se corresponde con una pérdida neta de iones sodio ya que coincide en el tiempo con un aumento en la formación de orina que pasa de 0,25-0,30 ml/24 h en ratones control a 0,32-0,45 ml/24 h en ratones a los que se inyectó halocina H7, b) Disminución en la concentración de K⁺ en orina pasando de 375-440 mmol/l en controles a 240 mmol/l en ratones tratados con H7. Una disminución tan intensa en la concentración no puede deberse al efecto dilutor del aumento de la diuresis. Los efectos descritos son compatibles con la acción inhibidora de H7 sobre el intercambiador sodio-protón de la membrana luminal del epitelio renal. Los efectos descritos revirtieron espontáneamente a las 48-72 h.

Efectos sobre la Isquemia y Necrosis (Infarto) del Miocardio:

El ensayo se ha realizado sobre nueve perros mestizos a los que se les practicó el siguiente protocolo experimental: (i) anestesia general, (ii) toracotomía, (iii) ligadura de la arteria coronaria durante 2 horas y (iv) reperfusión durante 3 horas. A las 5 h. de iniciado el experimento se les sacrificó y se procedió a cuantificar el área de riesgo, el área isquémica y el área necrosada (infarto de miocardio). Durante todo el proceso se monitorizó la presión arterial, la frecuencia cardíaca y las arritmias. Todos los animales siguieron este protocolo. A cuatro de los animales se les administró Halocina H7 siguiendo la siguiente pauta: antes de la ligadura se les administró vía intravenosa 5 ml de una solución 2000 Unidades Arbitrarias de Halocina H7/ml (1 Unidad Arbitraria se define como la mayor dilución que muestra un halo visible de inhibición sobre una doble capa de microorganismo sensible), durante el resto del experimento recibieron 2 ml de dicha solución cada 10 min durante todo el experimento. En total se administraron 100.000 Unidades Arbitrarias por

animal. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

(i) *Sobre el Area de Necrosis. Tamaño del Infarto:*

En los perros control el área de infarto fue de aproximadamente un 75% del área de riesgo (área irrigada por la arteria coronaria ligada) mientras que en los perros que recibieron halocina el área infartada fue de un 57-58% del área de riesgo lo que supone una reducción de aproximadamente un 30% del área de infarto.

(ii) *Sobre la actividad eléctrica cardíaca:*

En los perros control a los 20 minutos de iniciarse la reperfusión se inicia una "tormenta de arritmias" con períodos de fibrilación que suele durar todo el periodo de reperfusión. Este período es especialmente crítico y conlleva la muerte de numerosos animales. Sin embargo, en los animales tratados con Halocina H7 las arritmias sufrieron una reducción muy significativa (de un 82%) con respecto al control ($p < 0,005\%$). El número de latidos ectópicos totales paso de 12.900 ± 8.848 a 2.428 ± 1.574 . El número de latidos ectópicos durante las dos horas de ligadura pasó de 290 ± 401 a 88 ± 25 y el número de latidos ectópicos durante las tres horas de reperfusión pasó de 12.769 ± 8.925 a 2.340 ± 1.598 . Durante la reperfusión no se desarrolló ningún episodio de fibrilación ventricular en los animales que recibieron Halocina H7.

(iii) *Sobre la Frecuencia Cardíaca:*

No se ha observado ninguna diferencia significativa al respecto.

Se concluye que la administración de Halocina H7 posee un efecto reductor del área de necrosis miocárdica, disminuye también de forma significativa la duración e intensidad de la tormenta de arritmias presente en el periodo de reperfusión. Por lo tanto, posee un efecto beneficioso sobre la patología cardíaca ligada a los procesos de isquemia y necrosis.

Sobre la diuresis y natriuresis:

El ensayo se realizó sobre tres perros a los que se les practicó el siguiente protocolo experimental: a cuatro perros convenientemente anestesiados se les canuló la arteria renal de un riñón y el ureter de los dos riñones. Se monitorizó la presión en arteria renal y el volumen y composición de la orina. La Halocina H7 se administró con la siguiente pauta: tras la primera medición de control (tiempo 0), se les administró durante 25 min una solución que contenía 50.000 Unidades Arbitrarias de H7. Con los siguientes resultados:

Riñón experimental:

Tiempo (min)	Diuresis (ml/min)	Na ⁺ (mEq/min)	K ⁺ (mEq/min)
0 (Control)	0,14	5,3	17,6
25 (tras admin. H7)	0,08	2,9	12,2
45	0,21	20,0	32,1
60	0,33	35,0	35,0
75	0,41	48,7	35,4
90	0,28	37,2	24,4
105	0,21	30,5	23,7

Riñón contralateral:

Tiempo (min)	Diuresis (ml/min)	Na ⁺ (mEq/min)	K ⁺ (mEq/min)
0 (Control)	0,14	5,5	18,2
25 (tras admin.H7)	0,15	6,2	18,9
45	0,22	26,8	26,8
60	0,33	37,3	33,7
75	0,41	47,6	32,4
90	0,33	44,2	26,4
105	0,24	38,0	23,5

La Halocina H7 aumenta significativamente la diuresis y la natriuresis sin cambios significativos en la tasa de filtración glomerular y flujo renal. Es decir, se trata de un diurético natriurético que no provoca cambios en la hemodinámica renal. El mecanismo sería una disminución de la tasa de reabsorción tubular.

En base a estos efectos esta sustancia podría ser útil en procesos de tipo hipertensivo, especialmente la hipertensión dependiente de renina, en el tratamiento de la hipertensión por cambios en la sensibilidad a la sal y en el hiperaldosteronismo.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Aplicación de la halocina H7 en la fabricación de medicamentos diuréticos y antihipertensivos.

2. Aplicación de la halocina H7 en la fabricación de medicamentos protectores frente a los procesos de isquemia cardíaca y nerviosa.

3. Aplicación de la halocina H7 en la fabricación de medicamentos reductores de la resistencia a la insulina.

4. Aplicación de la halocina H7 en la fabricación de medicamentos inhibidores de la formación de ácido clorhídrico en la mucosa gástrica.

5. Aplicación de la halocina H7 en la fabricación de medicamentos inhibidores del crecimiento celular.

6. Aplicación de la halocina H7 en la fabricación de medicamentos reguladores del volumen celular.

7. Aplicación de la halocina H7 en la fabricación de medicamentos reguladores del crecimiento de bacterias y organismos microbiológicos.

8. Aplicación de la halocina H7 en la fabricación de medicamentos inmunomoduladores.

9. Aplicación de la halocina H7 en la fabricación de medicamentos inhibidores del transporte epitelial.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: A61K 38/16

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MESEGUER, I. et al. "Mode of actions of halocins H4 and H6: are they effective against the adaptation to high salt environments?." NATO ASI SER A (NALSDJ). (Gen. Appl. Aspects, Halophilic Microorg.). Vol. 201, 1991, páginas 157-164 * Todo el documento *	1-9
A	MARINA TORREBLANCA et al. "Halocin H6, a bacteriocin from Haloferax gibbonsii." JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, Vol. 135, 1989, páginas 2655-2661 * Todo el documento *	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
13.12.96

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/1