(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 034221 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.17

(21) Номер заявки
201390487

(22) Дата подачи заявки
2011.10.12

(51) Int. Cl. ***A23L 3/3463*** (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИПЕПТИДА BLAD, ОБЛАДАЮЩАЯ ФУНГИЦИДНЫМ И БАКТЕРИЦИДНЫМ ДЕЙСТВИЕМ, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **105330; 1017284.9**
(32) **2010.10.12; 2010.10.13**
(33) **PT; GB**
(43) **2013.08.30**
(86) **PCT/EP2011/067824**
(87) **WO 2012/049215 2012.04.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КОНСУМУ ЭМ ВЕРДИ - БИОТЕКНОЛОЖИЯ ДАШ ПЛАНТАШ, С.А. (PT)

(72) Изобретатель:
Каррейра Алезандра Мануэла Лоуренку, Валадаш Да Силва Монтейру Сара Алезандра, Ди Сейшаш Боавида Феррейра Рикардо Мануэль (PT)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A2-2007010459
Ribeiro, Ana Cristina Ferreira da Conceição: "Thesis: Anãlise molecular de lectinas em sementes de leguminosas", 2009, XP002666464, Retrieved from the Internet: URL:http://repositorio.ul.pt/handle/10451/257 [retrieved on 2011-12-29] abstract
US-B2-7067624
WO-A1-2006003110
ROBIN WAIT ET AL.: "Analysis of Lupinus albus Storage Proteins by Two-Dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry", JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 53, no. 11, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 4599-4606, XP55015516, ISSN: 0021-8561, DOI: 10.1021/jf050021i column 1
FR-A1-2921836
WO-A1-2004071521
M.D.L. OLIVEIRA ET AL.: "Purification of a lectin from Eugenia uniflora L. seeds and its potential antibacterial activity", LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 46, no. 3, 1 March 2008 (2008-03-01), pages 371-376, XP55014526, ISSN: 0266-8254, DOI: 10.1111/J.1472-765X.2007.02319.x page 374 - page 375
WOLDEMICHAEL G. M. ET AL.: "Triterpene glycosides of Lupinus angustifolius", PHYTOCHEMISTRY, PERGAMON PRESS, GB, vol. 60, no. 4, 1 June 2002 (2002-06-01), pages 323-327, XP004354728, ISSN: 0031-9422, DOI: 10.1016/S0031-9422(02)00112-7

(57) Изобретение относится к композиции для профилактики или лечения инфекций человека или животного, вызванных патогенными грибами или бактериями, содержащей антимикробный полипептид, обладающий фунгицидным и бактерицидным действием и включающий последовательность Blad, представленную в SEQ ID NO: 4, или его активный вариант, идентичный по меньшей мере на 70% последовательности SEQ ID NO: 4, либо фрагменту последовательности SEQ ID NO: 4 длиной по меньшей мере в 100 аминокислотных остатков, и к применению указанной композиции.

034221 B1

034221 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к антимикробным агентам, и в особенности к тем, которые воздействуют на патогены человека/животных.

Введение

Бактериальные инфекции

Бактерии, вне всяких сомнений, являются самыми распространенными возбудителями инфекционных заболеваний человека. Более одной трети мирового населения, вероятно, инфицировано бактериальными патогенами. По данным Центра по контролю заболеваний США (ЦКЗ) и Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) следующие бактериальные инфекции включены в список самых распространенных на сегодняшний день инфекционных заболеваний во всем мире:

Холера: это заболевание распространяется в основном через инфицированную питьевую воду и в антисанитарных условиях. Оно является эндемичным для Индостана, России и стран Африки южнее Сахары. Оно представляет собой острую кишечную инфекцию, возбудителем которой является бактерия Vibrio cholerae. Основным симптомом этого заболевания является обильная диарея. У 5-10% людей, инфицированных этим заболеванием, развиваются тяжелые симптомы, которые включают рвоту и судороги нижних конечностей. В своей тяжелой форме холера может приводить к смерти от обезвоживания. Ежегодно в ВОЗ сообщается о примерно 200000 случаев.

Менингит: часто известный как спинальный менингит, это инфекция спинного мозга. Как правило, он является результатом вирусной или бактериальной инфекции. Бактериальный менингит является более тяжелым, чем вирусный менингит, и может приводить к повреждению головного мозга, потере слуха и неспособности к обучению. Это заболевание может быть вызвано, например, Haemophilus influenzae тип b, Neisseria meningitidis или Streptococcus pneumoniae. По оценкам, каждый год регистрируется 1,2 миллиона случаев бактериального менингита, более десятой части из которых являются фатальными. Симптомы включают сильную головную боль, жар, тошноту, рвоту, сонливость, бредовое состояние, светобоязнь и ригидность затылочных мышц.

Пневмония: это заболевание имеет много возможных причин, но, как правило, оно является результатом инфекции бактерий родов Streptococcus или Mycoplasma. Эти бактерии годами могут жить в организме человека, не вызывая инфекции, и проявляются, только когда другое заболевание снижает иммунитет к ним. Streptococcus pneumoniae вызывает стрептококковую пневмонию, наиболее распространенный вид, который является более тяжелым, чем микоплазменная пневмония. S. pneumoniae является причиной более 100000 госпитализаций с пневмонией ежегодно, а также 6 миллионов случаев среднего отита и более 60000 случаев инвазивных заболеваний, таких как менингит.

Шигеллиоз: эта инфекция является причиной приблизительно 600000 смертей во всем мире каждый год. Она является наиболее распространенной в развивающихся странах с плохим санитарным состоянием. Бактерии рода Shigella вызывают бактериальную дизентерию или шигеллиоз. Симптомы включают диарею с кровянистым стулом, рвоту и колики в животе.

Острый фарингит: это заболевание вызывают бактерии рода Streptococcus. Несколько миллионов случаев острого фарингита регистрируется ежегодно. Симптомы включают боль в горле, жар, головную боль, слабость и тошноту.

Туберкулез: это заболевание является причиной почти 2 миллионов смертей ежегодно, и по оценкам ВОЗ около 1 миллиарда человек будут инфицированы в период с 2000 по 2020 годы, если не будут приняты более эффективные профилактические меры. Туберкулезные бактерии (например, Mycobacterium tuberculosis) чаще всего встречаются в легких, где они могут вызывать боль в груди и сильный кашель с выделением кровавой мокроты. Другие симптомы включают слабость, потерю веса, потерю аппетита, озноб, жар и ночную потливость.

Тиф: возбудителем брюшного тифа является бактерия Salmonella typhi, и примерно 600000 из 12-17 миллионов случаев этого заболевания заканчиваются летальным исходом ежегодно. Это заболевание, как правило, распространяется через инфицированную пищу или воду. Симптомы включают внезапный и постоянный жар, сильную головную боль, тошноту, сильную потерю аппетита, запор, и в некоторых случаях диарею.

Однако точное количество случаев трудно определить, особенно потому, что многие из этих заболеваний являются эндемичными для развивающихся стран, в которых многие люди не имеют доступа к современной медицинской помощи. Ежегодно приблизительно половину всех смертельных случаев от инфекционных заболеваний можно отнести к трем заболеваниям: туберкулез, малярия и СПИД. Вместе взятые, эти три инфекции являются причиной более 300 миллионов случаев заболеваний и более 5 миллионов смертей ежегодно.

Современная эпоха применения антибиотиков началась в девятнадцатом и начале двадцатого века с открытия активного ингредиента пенициллина, продуцируемого Penicillium notation, который обладал мощным антимикробным действием. Однако до 1955 года его продажи не контролировались, и избыточное и неконтролируемое применение привело к появлению невосприимчивых к нему бактерий. Устойчивость к антибиотикам стала главной проблемой, и эпидемии резистентных стафилококковых инфекций начали появляться в стационарных лечебных учреждениях.

В начале двадцатого века также появились такие антибиотики, как сульфаниламиды, стрептомицин, неомицин, хлорамфеникол, цефалоспорины и тетрациклины. Многие из этих химических соединений все еще применяются в настоящее время, хотя для них всех характерна проблема развития устойчивости, а некоторые имеют проблемы, связанные с токсичностью. Например, стрептомицин может вызывать повреждение почек и глухоту, а хлорамфеникол может вызывать серьезные побочные эффекты (например, тяжелые заболевания крови, включая анемию и лейкемию).

Дальнейшие исследования, проведенные в течение 1960-х годов, привели к созданию второго поколения антибиотиков. Среди них был метициллин, полусинтетическое производное пенициллина, производимое специально, чтобы преодолеть проблему устойчивости к пенициллину. Метициллин был назван качественным прорывом в борьбе с устойчивостью бактерий к пенициллину, но, к сожалению, это оказалось не так, и в настоящее время существуют бактерии, устойчивые к метициллину. Ампициллин также является производным пенициллина. Он был разработан с целью расширить круг инфекций, которые можно было лечить пенициллином, и в настоящее время в значительной степени заменил пенициллин. Ампициллин часто является средством первого выбора при лечении целого ряда инфекций, включая инфекции дыхательных и мочевыводящих путей. Амоксициллин является еще одним широко используемым производным пенициллина. Как и ампициллин, он обладает широким спектром действия. Гентамицин принадлежит к тому же семейству антибиотиков, что и стрептомицин (противотуберкулезный лекарственный препарат, открытый в 1943 году). Как правило, его применяют в случаях тяжелых инфекций, так как он может оказывать серьезное токсическое побочное действие на органы слуха и почки.

Недавно фармацевтическими лабораториями было разработано новое семейство антибиотиков, названное хинолоны, также известное как фторхинолоны. Кроме того, что эти антибиотики являются эффективными против широкого круга бактерий, их концентрация в крови может достигать высоких значений при пероральном приеме. Это означает, что намного больше инфекций, которые раньше требовали пребывания больного в стационаре, теперь можно лечить на дому. Фторхинолоны применяются только для лечения тяжелобольных пациентов, и/или когда необходимы длительные курсы антибиотиков (от неделей до месяцев).

Несмотря на создание этого второго поколения химических соединений, непрекращающееся появление устойчивых форм продолжает оставаться проблемой. Как правило, устойчивость возникает в результате применения, особенно широкого применения или неправильного применения лекарственного препарата, которое, в конечном итоге, приводит к потере его эффективности при лечении заболеваний человека. Постоянное использование антимикробных агентов увеличивает давление отбора в сторону появления, размножения и распространения резистентных штаммов. Этому способствует ненадлежащее и неконтролируемое использование антимикробных агентов, в том числе избыточное назначение, введение субоптимальных доз, недостаточная продолжительность лечения, ошибочный диагноз, приводящий к неправильному выбору лекарственного препарата, и использование (особенно чрезмерное использование) антибактериальной бытовой химии в домах, школах и т.д.

В некоторых случаях устойчивость появляется быстро (например, устойчивость Staphylococcus aureus к оксалину возникла всего за несколько лет), а в других для этого может потребоваться больше времени (например, для появления у Enterococcus faecium устойчивости к ванкомицину потребовалось почти 30 лет). Причины различий в сроках не ясны и вероятно имеют многофакторный характер. Тем не менее, способность бактерий избегать уничтожающего действия антимикробных агентов явно препятствует возможности лечить отдельных пациентов и контролировать крупные вспышки инфекционных заболеваний. Например, по оценкам ВОЗ в год насчитывается около полумиллиона новых случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ), которые составляют примерно 5% от девяти миллионов новых случаев заболевания туберкулезом всех типов.

Некоторые штаммы метициллин-резистентного золотистого стафилококка (МРЗС) с особой легкостью осуществляют внутрибольничное заражение. В некоторых стационарных лечебных учреждениях в США более 70% S. aureus, выделенного от пациентов, являются МРЗС, и эти штаммы часто являются резистентными ко всем лицензированным лекарственным препаратам, кроме ванкомицина, линезолида, даптомицина и тигециклина. Недавно, штаммы S. aureus, полностью резистентные к ванкомицину, были также выделены от пациентов в США, что дополнительно осложняет лечение. МРЗС стал высокоэндемичным во многих стационарах, и после попадания в лечебное учреждение этот организм очень трудно искоренить.

Проблемы, связанные с искоренением, существуют также для ванкомицин-резистентных штаммов E. faecium (ВРЭ), которые часто являются резистентными ко всем другим клинически разрешенным лекарственным препаратам. Устойчивость к ванкомицину у энтерококков часто является плазмидоопосредованной и может быть результатом нескольких уникальных детерминант устойчивости. Сочетание у E. faecium устойчивости к пенициллину и гликопептидам является причиной инфекций, которые невозможно эффективно лечить. К счастью, большинство ВРЭ вызывает колонизацию, а не инфекцию. Когда имеет место инфекция, то ее нельзя лечить антибиотиками. Устойчивость к хинолонам может развиться быстро, даже в течение курса лечения.

В настоящее время некоторые бактерии получили статус "суперпатогенов", к ним относятся мети-

циллин-резистентный золотистый стафилококк, ванкомицин-резистентные энтерококки и хинолон-резистентный Streptococcus pneumonia. Для этих патогенов существует мало или вообще не существует антибиотиков, пригодных для лечения вызываемых ими заболеваний. Но, удивительно, что только несколько классов новых антибиотиков было введено за последние 40 лет, и все, начиная с 1999 года, включая стрептограминовую комбинацию хинупристин/дальфопристин (Синерцид), оксазолидинон линезолид и липопептид даптомицин.

Существует растущая потребность в новых антибиотиках для лечения заболеваний, вызываемых бактериальными патогенами, в частности, в связи с проблемой антимикробиальной устойчивости. Как упоминалось ранее, у многих патогенов развивается устойчивость к мощным антибиотикам, применяемым для лечения. Вызывает тревогу тот факт, что устойчивость часто не ограничивается единственным агентом, и может включать устойчивость ко многим антибиотикам. Поиск новых и более эффективных лекарственных препаратов продолжается и сегодня, особенно антибиотиков направленного спектра действия, способных преодолевать механизмы множественной лекарственной устойчивости. Однако темп этого поиска значительно замедлился, так как в настоящее время фармацевтическим компаниям намного сложнее получить разрешение для новых лекарственных препаратов. Кроме того, необходимые затраты и временной интервал между идентификацией нового антибиотика в лаборатории и разрешением на его коммерческое производство настолько велики, что это привело к тому, что некоторые компании полностью ушли с рынка.

Грибковые инфекции

Заболеваемость грибковыми инфекциями повысилась за последние тридцать лет, отчасти как следствие увеличения количества пациентов, имеющих нарушения в иммунной системе. Это является прямым результатом значительного прогресса в медицине за последние годы, особенно в лечении рака, который приводит к увеличению количества пациентов с ослабленным иммунитетом. Были предложены некоторые другие причины увеличения грибковых инфекций, включая парентеральное питание и центральные венозные катетеры, лечение антибиотиками широкого спектра действия, беременность, пациентов с неконтролируемым диабетом, реципиентов с трансплантированными паренхиматозными органами, пациентов со СПИД, раковых пациентов, подвергающихся цитотоксической химиотерапии, пациентов с ожогами или нейтропенией и патологии желудочно-кишечного тракта.

Наиболее серьезными грибковыми инфекциями являются инвазивные грибковые инфекции (ИГИ) (например, инфекция кровяного русла), которые связаны с высокой смертностью. Виды рода Candida являются наиболее частыми возбудителями ИГИ со средним уровнем смертности 30%. Candida albicans является причиной примерно 50% случаев инвазионного кандидоза, но постоянно увеличивается относительная частота видов Candida, отличных от albicans, а именно Candida glabrata, Candida parapsilosis, Candida tropicalis и Candida krusei. Виды Aspergillus являются наиболее часто выделяемыми инвазивными плесневыми грибками, с преобладанием вида Aspergillus fumigatus. Подобно инфекциям, вызываемым Candida, инвазивный аспергиллез часто связан с критическим состоянием у пациентов, но уровень смертности при нем значительно выше, хотя и зависит от конкретной отдельной рассматриваемой инфекции: например, 85% или более при рассеянном заболевании или заболевании центральной нервной системы и 60% при диффузном легочном заболевании.

Распространенность и смертность при ИГИ увеличились за последние три десятилетия. Данные для США показывают, что в 1980 году эта группа заболеваний являлась причиной смерти в 828 случаях и была десятой среди самых распространенных причин смертельной инфекции. В 1997 году тот же набор данных показал, что количество смертельных случаев возросло до 2370, и эта группа заболеваний стал седьмой среди самых распространенных причин агональной инфекции. Недавно полученные данные показывают, что Candida стала более распространенной, чем Escherichia coli и виды Pseudomonas, и в настоящее время является четвертой наиболее распространенной смертельной инфекцией в США.

Распространенность ИГИ, вызываемых Candida, также повышается среди внутрибольничных инфекций, и прогнозируется, что дальнейшее увеличение этих инфекций в качестве факторов риска будет продолжать расти. Виды рода Candida составляют от 8 до 10% всех внутрибольничных ИГИ и ежегодно встречаются с частотой от 6 до 23 случаев инфекций на 100000 человек в США. Основной проблемой инвазивного кандидоза является не только высокий уровень смертности при этом заболевании, но также дополнительное увеличение сроков госпитализации инфицированных пациентов от 3 до 10 дней, что приводит к общим затратам, связанным с кандидемией, равным примерно 1 миллиарду долларов в год в США. Недавно опубликованные результаты исследования населения Португалии показали, что число случаев внутрибольничной фунгемии составляет 2,7 на 1000 госпитализированных пациентов, с уровнем смертности 39,3%. В соответствии с другими недавно опубликованными исследованиями заболеваемости ИГИ в Европе, это количество, по-видимому, ближе к заболеваемости, выявленной в других европейских странах, но значительно ниже, чем среди населения США. Еще одни недавно полученные результаты свидетельствуют о том, что в Шотландии заболеваемость кандидемией составляет 4,8 случаев на 100000 населения в год.

С конца 1950-х годов стандартом в лечении угрожающих жизни грибковых инфекций стал амфотерицин В. Это химическое соединение является специфичным и связывается со стеролами грибковой кле-

точной мембраны, создавая ионные поры, в результате чего происходит потеря мембранного потенциала и последующее разрушение. Хотя амфотерицин В остается доступным фунгицидным агентом с самым широким спектром действия, его высокая токсичность и необходимость парентерального введения ограничивают его применение.

В 1990-е годы появились липидные препараты амфотерицина В, а также триазолы, флуконазол и итраконазол. Триазолы действуют путем нарушения синтеза эргостерола через ингибирование цитохром Р450-зависимой ланостерол 14α-деметилазы, что препятствует клеточному росту и, в конечном итоге, приводит к гибели клетки. Хотя эти агенты обнаружили явные преимущества перед амфотерицином В, они ограничены технологией производства, спектром действия и/или развитием устойчивости.

С 2000 года с целью преодоления серьезных ограничений уже существующих лекарственных препаратов были разработаны новые противогрибковые агенты, такие как триазолы с расширенным спектром действия (вориконазол и посаконазол) и эхинокандины (каспофунгин, микафунгин и анидулафунгин). Эхинокандины ингибируют синтез β-1,3-D-глюканов, приводя к дестабилизации грибковой клеточной стенки, клеточному лизису и гибели клетки. Они активны in vitro против видов родов Candida и Aspergillus, но не против широкого круга других появляющихся патогенных грибков. Даже у этих новых агентов существуют ограничения, такие как побочные эффекты лекарственного препарата (особенно для вориконазола), межлекарственные взаимодействия, связанные с триазолами, и отсутствие альтернативных препаратов (например, внутривенные препараты отсутствуют для посаконазола и пероральные препараты отсутствуют для эхинокандинов).

Доступные в настоящее время противогрибковые препараты являются также неэффективными для профилактического устранения колонизации Candida. Более того, эти дрожжевые грибки обладают способностью образовывать биопленки, которые проявляют повышенную собственную устойчивость к противогрибковым препаратам, таким как азолы, полиены и 5-фторцитозин. По этой причине кандидоз часто связан с колонизацией медицинского оборудования (например, зубных имплантатов, катетеров, сердечных клапанов, обходных сосудистых шунтов, глазных линз, искусственных суставов и анастомозов центральной нервной системы), которое может выступать в роли субстрата для роста биопленки. В многоцентровом исследовании среди 427 произвольно отобранных пациентов с кандидемией уровень смертности среди пациентов с катетер-ассоциированной кандидемией составил 41%. Таким образом, несмотря на создание новых противогрибковых препаратов, уровень смертности при внутрибольничной грибковой инфекции остается неприемлемо высоким. Кроме того, растет число новых и появляющихся грибковых патогенов, включая виды Candida, отличные от albicans, и виды Aspergillus, отличные от fumigatus, которые, как правило, труднее диагностировать и лечить, что делает их причиной более высокого уровня смертности.

Одна из целей настоящего изобретения состоит в попытке решения этих проблем и, в частности, например, в создании альтернативного антимикробного агента с мощным действием широкого спектра против патогенов человека/животных и при этом обладающего низкой токсичностью.

Сущность изобретения

Авторами настоящего изобретения неожиданно было обнаружено, что полипептид Blad из Lupinus обладает мощным антимикробным действием в отношении большого числа разнообразных бактериальных и грибковых организмов, которые являются патогенными для людей и животных. Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что полипептид Blad является нетоксичным для животных, что делает Blad превосходным химическим соединением для применения в качестве антимикробного препарата против патогенов человека и животных в различных условиях.

Таким образом, авторами настоящего изобретения предложена композиция, содержащая антимикробный полипептид, включающий Blad или его активный вариант, для применения в способе терапевтического или профилактического лечения организма человека или животного. Авторами настоящего изобретения также предложена указанная композиция для применения в способе лечения или предупреждения инфекции, вызванной микроорганизмом, внутри или на субъекте. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель и/или хелатирующий агент. Предпочтительно, композиция применяется в указанном способе, когда субъект имеет ослабленную иммунную систему или тяжело болен.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к композиции для профилактики или лечения инфекций человека или животного, вызванных патогенными грибами или бактериями, содержащей антимикробный полипептид, обладающий фунгицидным и бактерицидным действием и включающий последовательность Blad, представленную в SEQ ID NO:4, или его активный вариант, идентичный по меньшей мере на 70% последовательности SEQ ID NO: 4, либо фрагменту последовательности SEQ ID NO: 4 длиной по меньшей мере в 100 аминокислотных остатков, а также содержащей фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Авторами настоящего изобретения также предложено применение композиции, содержащей антимикробный полипептид, включающий Blad или его активный вариант, для уничтожения или подавления роста грибов или бактерий, патогенных для человека или животного, на участке, который не находится

снаружи или внутри организма человека или животного. Предпочтительно, указанная композиция применяется для дезинфекции, с учетом патогенного микроорганизма человека или животного, изделия для применения внутрь или наружно в отношении человека или животное, или поверхности, которая нуждается в дезинфекции, где предпочтительно указанное изделие является пищевым продуктом или медицинским устройством или инструментом или где указанная поверхность находится в условиях, в которых:

(a) проводится медицинское обследование, диагностика или лечение;

(b) готовятся или иным образом обрабатываются или хранятся продукты питания;

(c) осуществляются процедуры личной гигиены и/или санитарная обработка; и/или

(d) находится лицо, подверженное особому риску

(i) заражения инфекцией, вызванной грибами или бактериями, патогенными для человека или животного; и/или

(ii) быть не в состоянии избавиться от микробной инфекции без медицинского вмешательства.

В предпочтительных вариантах осуществления этих применений указанная композиция дополнительно содержит хелатирующий агент.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения микроорганизм является бактерией или грибом, где предпочтительно:

бактерия является патогенным видом одного из следующих родов: Pseudomonas, Listeria, Bacillus, Staphylococcus и Salmonella; или

гриб является патогенным видом одного из следующих родов: Candida, Aspergillus, Alternaria, Fusarium, Cryptococcus и Trichosporon, где предпочтительно гриб может являться возбудителем инвазивной грибковой инфекции, предпочтительно Candida albicans, Aspergillus fumigatus или Alternaria alternata.

Авторами настоящего изобретения также предложен:

способ лечения человека или животного, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антимикробного полипептида, включающего Blad или его активный вариант;

способ предупреждения или лечения инфекции, вызванной микроорганизмом, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антимикробного полипептида, включающего Blad или его активный вариант; и

способ уничтожения или подавления роста микроорганизма, который является патогенным для человека или животного, на участке, который не находится снаружи или внутри организма

человека или животного, причем указанный способ включает введение в указанное местонахождение композиции, содержащей эффективное количество антимикробного полипептида, включающего Blad или его активный вариант.

Краткое описание чертежей

Настоящее изобретение будет описано со ссылкой на прилагаемые чертежи, где:

на фиг. 1 показаны кривые время-эрадикация для Listeria monocytogenes и Pseudomonas aeruginosa;

на фиг. 2 показаны зоны подавления для (A) Staphylococcus aureus, (B) Bacillus subtilis, (C) P. aeruginosa и (D) L. monocytogenes;

на фиг. 3A показана кривая время-эрадикация для C. albicans;

на фиг. 3B и 4 показаны кривые роста для C. albicans;

на фиг. 5 показаны зоны подавления для C. albicans со следующим: 20 мкг BLAD (A, нижний диск), 50 мкг BLAD (B, нижний диск), 100 мкг BLAD (B, верхний диск), 200 мкг BLAD (A, верхний диск), 20 мкг амфотерицина B (C, верхний диск) и 25 мкг флуконазола (C, нижний диск);

на фиг. 6 показаны зоны подавления для BLAD против Cryptococcus neoformans на (A) PDA и (B) PDA pH 7.5: см. фиг. 6. I - верхние диски 200 мкг, нижние диски 10 мкг; II - верхние левые диски 50 мкг, верхний правый диск 20 мкг, нижний диск 100 мкг;

на фиг. 7 показаны зоны подавления для BLAD против Aspergillus fumigatus на (A) среде Мюллера-Хинтона (правило M44-A), (B) PDA или (C) PDA с pH 7,5. Левая панель демонстрирует чашки, вид сверху, правая панель демонстрирует чашки вид снизу. I - верхние диски 200 мкг, нижние диски 10 мкг; II - верхние левые диски 50 мкг, верхний правый диск 20 мкг, нижний диск 100 мкг;

на фиг. 8 показаны зоны подавления (A и B) BLAD и (C) амфотерицином B или флуконазолом в отношении Aspergillus fumigatus на PDA с pH 7,5 при следующих концентрациях: 20 мкг BLAD (A, нижний диск), 50 мкг BLAD B, нижний диск), 100 мкг (B, верхний диск), 200 мкг BLAD (A, верхний диск), 10 мг амфотерицина B (C, верхний диск), 100 мг флуконазола (C, нижний диск);

на фиг. 9 показаны кривые время-эрадикация для L. monocytogenes, P. aeruginosa и C. albicans;

на фиг. 10 показана кодирующая последовательность предшественника β-конглютина Lupinus albus (SEQ ID NO: 1); и

на фиг. 11 показан внутренний фрагмент кодирующей последовательности предшественника β-конглютина, соответствующий Blad (SEQ ID NO: 3).

Подробное описание изобретения

Blad

Blad ("banda de Lupinus albus doce" - полоса из сладкого L. albus) - это название, данное стабильному промежуточному продукту распада β-конглютина, основного запасного белка, содержащегося в семенах растений рода Lupinus. Он представляет собой полипептид с массой 20 кДа, состоящий из 173 аминокислотных остатков, который кодируется внутренним фрагментом (519 нуклеотидов, зарегистрирован в GenBank под номером доступа ABB13526) гена, кодирующего предшественник β-конглютина из Lupinus (1791 нуклеотидов, зарегистрирован в GenBank под номером доступа AAS97865). Когда праймеры, кодирующие концевые последовательности Blad, были использованы для амплификации последовательности из геномной ДНК Lupinus, был получен продукт размером ~620 п.н., что указывает на наличие интрона в фрагменте, кодирующем Blad. Существующий в природе Blad является основным компонентом гликоолигомера массой 210 кДа, который накапливается (после интенсивного ограниченного протеолиза β-конглютина) исключительно в семядолях видов растений из рода Lupinus между 4 и 12 днями после начала прорастания. В то время как указанный олигомер является гликозилированным, существующий в природе Blad является негликозилированным. Содержащий Blad гликоолигомер состоит из нескольких полипептидов, основные из которых имеют молекулярную массу 14, 17, 20, 32, 36, 48 и 50 кДа. Полипептид массой 20 кДа Blad несомненно является наиболее распространенным полипептидом этого олигомера, и по всей видимости только он один обладает лектиновой активностью. Существующий в природе Blad составляет приблизительно 80% от всех семядольных белков у 8-дневных проростков.

Кодирующая последовательность предшественника β-конглютина L. albus (SEQ ID NO: 1) приведена на фиг. 10. Кодирующая последовательность исходной субъединицы β-конглютина соответствует остаткам с 70 по 1668. Кодируемые ею 533 аминокислотных остатка исходной субъединицы β-конглютина (SEQ ID NO: 2) представляют собой:

MGKMRVRFPTLVLVLGIVFLMAVSIGIAYGEKDVLKSHERPEEREQEEWQPRRQR
PQSRREEREQEQEQGSPSYPRRQSGYERRQYHERSEQREEREQEQQQGSPSYSRR
QRNPYHFSSQRFQTLYKNRNGKIRVLERFDQRTNRLENLQNYRIVEFQSKPNTLI
LPKHSDADYVLVVLNGRATITIVNPDRRQAYNLEYGDALRIPAGSTSYILNPDDN
QKLRVVKLAIPINNPGYFYDFYPSSTKDQQSYFSGFSRNTLEATFNTRYEEIQRI
ILGNEDEQEYEEQRRGQEQSDQDEGVIVIVSKKQIQKLTKHAQSSSGKDKPSDSG
PFNLRSNEPIYSNKYGNFYEITPDRNPQVQDLNISLTYIKINEGALLLPHYNSKA
IYVVVVDEGEGNYELVGIRDQQRQQDEQEEKEEEVIRYSARLSEGDIFVIPAGYP
ISINASSNLRLLGFGINADENQRNFLAGSKDNVIRQLDRAVNELTFPGSAEDIER
LIKNQQQSYFANGQPQQQQQQQSEKEGRRGRRGSSLPF

Внутренний фрагмент кодирующей последовательности предшественника β-конглютина, соответствующий Blad (SEQ ID NO: 3), приведен на фиг. 11. Полипептид Blad (SEQ ID NO: 4) представляют собой:

RRQRNPYHFSSQRFQTLYKNRNGKIRVLERFDQRTNRLENLQNYRIVEFQSKPNT
LILPKHSDADYVLVVLNGRATITIVNPDRRQAYNLEYGDALRIPAGSTSYILNPD
DNQKLRVVKLAIPINNPGYFYDFYPSSTKDQQSYFSGFSRNTLEATFNTRYEEIQ
RIILGNED

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей антимикробный полипептид, включающий Blad или его активный вариант. Таким образом, оно относится к композиции, содержащей антимикробный полипептид, включающий полипептидную последовательность (SEQ ID NO: 4) или ее активный вариант. В альтернативных вариантах осуществления изобретения композиция в основном состоит из антимикробного полипептида, включающего Blad или его активный вариант, и/или антимикробный полипептид в основном состоит из Blad или его активного варианта. В дополнительных вариантах осуществления изобретения антимикробный полипептид, включающий (или в основном состоящий из) Blad или его активный вариант, может быть использован в изолированном виде.

Активным вариантом Blad является вариант Blad, который сохраняет способность действовать в качестве антимикробного агента (т.е. обладает антимикробной активностью - описание уровня такой активности и способа ее измерения см. ниже). Термин "активный вариант Blad" включает в свой объем фрагмент последовательности SEQ ID NO: 4. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения фрагмент последовательности SEQ ID NO: 4 выбран таким образом, что он составляет, по меньшей мере 10% длины SEQ ID NO: 4, предпочтительно по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 40%, предпочтительно по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% длины SEQ ID NO: 4. Таким образом, Blad или его вариант, как правило, имеет длину по меньшей мере 10 аминокислотных остатков, например по меньшей мере 20, 25, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160 или 173 аминокислотных остатка.

Термин "активный вариант Blad" также включает в свой объем полипептидную последователь-

ность, которая обладает гомологией с SEQ ID NO: 4, например по меньшей мере 40% идентичности, предпочтительно по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, предпочтительно по меньшей мере 97% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99% идентичности, например, по всей последовательности или на участке по меньшей мере из 20, предпочтительно по меньшей мере 30, предпочтительно по меньшей мере 40, предпочтительно по меньшей мере 50, предпочтительно по меньшей мере 60, предпочтительно по меньшей мере 80, предпочтительно по меньшей мере 100, предпочтительно по меньшей мере 120, предпочтительно по меньшей мере 140 и наиболее предпочтительно, по меньшей мере 160 или более соседних аминокислотных остатков. Способы измерения гомологии белков хорошо известны из уровня техники и специалистам в данной области техники будет понятно, что в данном контексте гомология рассчитывается на основе идентичности аминокислот (иногда обозначается как "строгая гомология").

Гомологичный активный вариант Blad, как правило, отличается от полипептидной последовательности SEQ ID NO: 4 заменами, инсерциями или делециями, например, имеет от 1, 2, 3, 4, 5 до 8 или более замен, инсерций или делеций. Замены являются предпочтительно "консервативными", то есть другими словами, аминокислота может быть заменена аналогичной аминокислотой, где аналогичные аминокислоты имеют одинаковую с заменяемой аминокислотой одну из следующих групп: ароматические остатки (F/H/W/Y), неполярные алифатические остатки (G/A/P/I/L/V), полярные незаряженные алифатические остатки (C/S/T/M/N/Q) и полярные заряженные алифатические остатки (D/E/K/R). Предпочтительные подгруппы включают: G/A/P; I/L/V; C/S/T/M; N/Q; D/E; и K/R.

Антимикробный полипептид, включающий Blad или его активный вариант (как описано выше), может состоять из Blad или его активного варианта с любым количеством аминокислотных остатков, добавленных к N-концу и/или C-концу, при условии, что полипептид сохраняет антимикробную активностью (описание уровня такой активности и способа ее измерения опять см. ниже). Предпочтительно, чтобы к одному или обоим концам Blad или его активного варианта было добавлено не более 300 аминокислотных остатков, более предпочтительно, не более 200 аминокислотных остатков, предпочтительно, не более 150 аминокислотных остатков, предпочтительно, не более 100 аминокислотных остатков, предпочтительно, не более 80, 60 или 40 аминокислотных остатков, наиболее предпочтительно, не более 20 аминокислотных остатков.

Антимикробный полипептид, включающий (или в основном состоящий из) Blad или его активный вариант (как описано выше), может быть использован в настоящем изобретении в очищенном виде (например, выделен из растительного, животного или микробного источника) и/или в виде рекомбинантного белка. Получение рекомбинантной формы позволяет получать активные варианты Blad.

Способы очистки существующего в природе Blad уже описаны в литературе (например, Ramos et al. (1997) Planta 203(1): 26-34 и Monteiro et al. (2010) PLoS ONE 5(1): e8542). Подходящим источником существующего в природе Blad является растение рода Lupinus, такое как Lupinus albus, предпочтительно семядоли указанного растения, предпочтительно, собранные между примерно 4 и примерно 14 днем после начала прорастания, более предпочтительно, собранные с 6 по 12 день после начала прорастания (например, на 8 день после начала прорастания). В уровне техники раскрыты способы экстрагирования общего белка, приводящие к получению неочищенного экстракта, содержащего Blad, и способы выделения белков из такого экстракта, приводящие к получению частично очищенного экстракта, например, включающего Blad-содержащий гликоолигомер, который включает Blad. Для того чтобы выделить собственно Blad, можно затем использовать ДСН-ПААГ и/или, предпочтительно, обращенно-фазную ВЭЖХ на колонке C-18.

Альтернативным способом получения частично очищенного экстракта, содержащего гликоолигомер, который включает Blad, является использование хитинсвязывающей активности Blad. Этот гликоолигомер очень эффективно связывается с хитиновой колонкой, в способе очистки при помощи хитиновой аффинной хроматографии, и элюируется 0,05 Н раствором HCl. Подробное описание примера этого способа очистки приводится ниже:

Семядоли восьмидневных растений люпина собирают и гомогенизируют в воде, очищенной при помощи системы Milli-Q plus (значение pH доведено до 8,0), содержащей 10 mM $CaCl_2$ и 10 mM $MgCl_2$. Гомогенат фильтруют через марлю и центрифугируют при 30000 g в течение 1 ч при температуре 4°C. Затем осадок ресуспендируют в 100 mM Tris-HCl буфере с pH 7,5, содержащем 10% (масса/объем) NaCl, 10 mM ЭДТА и 10 mM ЭГТА, перемешивают в течение 1 ч при температуре 4°C и центрифугируют при 30000 g в течение 1 ч при температуре 4°C. Общую глобулиновую фракцию, содержащуюся в надосадочной жидкости, осаждают сульфатом аммония (561 г/л), перемешивают на холоде в течение 1 ч и центрифугируют при 30000 g в течение 30 мин при температуре 4°C. Полученный осадок растворяют в 50 mM Tris-HCl буфере с pH 7,5, обессоливают на колонке PD-10, уравновешенной тем же буфером, и пропускают через колонку для хитиновой аффинной хроматографии, предварительно уравновешенную тем же буфером. Эту колонку промывают 50 mM Tris-HCl буфером с pH 7,5 и связавшиеся белки элюируют 0,05 Н раствором HCl. Элюированные фракции сразу нейтрализуют 2 М раствором Tris, и пиковые фракции объединяют, лиофилизируют и анализируют при помощи ДСН-ПААГ.

Для изготовления хитиновой колонки хитиновое сырье было получено от компании Sigma и обработано следующим образом: образец хитина обильно промывали водой, очищенной при помощи системы Milli-Q plus, а затем 0,05 Н раствором HCl. Затем его промывали 1% (мас./об.) раствором карбоната натрия и затем этанолом до тех пор, пока поглощение промывочной жидкости не становилось меньше 0,05. После этого хитин помещали в наконечник для пипетки и уравновешивали 50 mM Tris-HCl буфером с pH 7,5.

Способы получения рекомбинантных белков хорошо известны из уровня техники. Такие способы, какие применяются здесь, будут включать вставку полинуклеотида, кодирующего полипептид, включающий Blad или его активный вариант, в подходящий экспрессионный вектор, позволяющий совмещать указанный полинуклеотид с одним или несколькими промоторами (например, с индуцибельным промотором, таким как T71ac промотор) и с другими целевыми полинуклеотидами или генами, введение данного экспрессионного вектора в подходящую клетку или организм (например, Escherichia coli), экспрессию полипептида в трансформированной клетке или организме и удаление экспрессированного рекомбинантного полипептида из этой клетки или организма. Для облегчения такой очистки экспрессионный вектор может быть сконструирован так, чтобы полинуклеотид дополнительно кодировал, например, концевую метку, которая может способствовать очистке: например, метку из гистидиновых остатков для аффинной очистки. После того как рекомбинантный полипептид был очищен, метка очистки может быть удалена из полипептида, например, путем протеолитического расщепления.

В композиции, содержащей антимикробный полипептид, включающий (или в основном состоящий из) Blad или его активный вариант, указанный полипептид предпочтительно находится в частично очищенном виде, более предпочтительно, в очищенном виде. Указанный полипептид является частично очищенным, если он находится в среде, в которой отсутствуют один или несколько других полипептидов, с которыми он связан в естественных условиях, и/или составляет по меньшей мере 10% от всех присутствующих белков. Указанный полипептид является очищенным, если он находится в среде, в которой отсутствуют все или большинство других полипептидов, с которыми он связан в естественных условиях. Например, термин "очищенный Blad" означает, что Blad составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% от всех белков в композиции.

В композиции, содержащей антимикробный полипептид, включающий (или в основном состоящий из) Blad или его активный вариант, набор белков Lupinus может состоять в основном из Blad-содержащего гликоолигомера, который включает полипептид, который включает (или в основном состоит из) Blad или его активный вариант.

Композиция, содержащая антимикробный полипептид, включающий (или в основном состоящий из) Blad, также может представлять собой препарат, содержащий другое химическое соединение(я), добавленное в эту композицию специалистом в данной области техники. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения такой препарат является фармацевтическим препаратом, содержащим антимикробный полипептид, включающий (или в основном состоящий из) Blad, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Целевые микроорганизмы

Настоящее изобретение относится к применению Blad в качестве антимикробного химического соединения, т.е. для подавления роста или уничтожения микроорганизмов, которые являются патогенными для людей или животных. Такие микроорганизмы включают, в частности, бактерии и грибки. Такие патогенные микроорганизмы способны вызывать инфекционные заболевания или любое другое ухудшение состояния здоровья (например, пищевое отравление, аллергию) у людей и/или животных и могут поражать или инфицировать, например, глаза, кожу, ожоги, раны, верхние дыхательные пути, легкие, желудочно-кишечный тракт, урогенитальный тракт, почки, печень, нервную систему и/или сердечно-сосудистую систему (например, кровяное русло). Такие патогенные микроорганизмы могут быть изначально патогенными или могут быть условно патогенными (т.е. не вызывать заболевания в организме здорового хозяина, но делать это в организме хозяина с ослабленной иммунной системой). Такие патогенные микроорганизмы могут дополнительно или альтернативно вызывать ухудшение состояния здоровья путем выделения химических соединений, которые являются токсичными для людей или животных.

В качестве антимикробного препарата Blad может применяться против грамположительных и грамотрицательных бактериальных патогенов. Особенно предпочтительные целевые бактерии включают патогенные виды Pseudomonas, такие как P. aeruginosa, Pseudomonas oryzihabitans и Pseudomonas plecoglossicida (наиболее предпочтительно, P. aeruginosa), патогенные виды Listeria, такие как L. monocytogenes и Listeria ivanovii (наиболее предпочтительно, L. monocytogenes), патогенные виды Bacillus, такие как B. subtilis, Bacillus anthracis и Bacillus cereus (наиболее предпочтительно, B. subtilis), патогенные виды Staphylococcus, такие как S. aureus (включая метициллин-резистентный золотистый стафилококк [MPЗC]), Staphylococcus pseudintermedius, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus, Staphylococcus lugdunensis, Staphylococcus schleiferi и Staphylococcus caprae (наиболее предпочтительно, S. aureus), патогенные виды Salmonella, такие как подвиды Salmonella enterica, такие как Salmonella

arizonae, Salmonella choleraesuis, Salmonella enteritidis, Salmonella paratyphi A, Salmonella paratyphi B, Salmonella typhi, Salmonella typhimurium, Salmonella dublin, Salmonella typhisuis и Salmonella brandenburg (наиболее предпочтительно, S. enteritidis или S. typhi), и патогенные виды Campylobacter, такие как Campylobacter jejuni и Campylobacter coli (наиболее предпочтительно, C jejuni). В предпочтительных вариантах осуществления изобретения Blad применяется против патогенов, которые могут вызывать генерализованное воспаление и сепсис (например, P. aeruginosa), холеру (например, V. cholerae), менингит (например, L. monocytogenes, Haemophilus influenzae тип b, Neisseria meningitidis или Streptococcus pneumoniae), пневмонию (например, S. pneumoniae, Streptococcus agalactiae или S. aureus), шигеллиоз (например, Shigella boydii, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri или Shigella sonnei), острый фарингит (например, Streptococcus pyogenes), туберкулез (например, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis, Mycobacterium africanum, Mycobacterium canetti и Mycobacterium microti), тиф (S. typhi) или пищевое отравление (например, патогенные виды одного из следующих родов: Listeria, Staphylococcus и Salmonella).

В качестве антимикробного препарата Blad может применяться против как одноклеточных (дрожжевые грибки), так и многоклеточных (мицелиальных, плесневых) грибковых патогенов. Особенно предпочтительные целевые грибки включают патогенные виды Candida, такие как C. albicans, Candida glabrata, Candida lusitaneae, Candida parapsilosis, Candida tropicalis, Candida krusei и Candida dubliniensis, патогенные виды Alternaria, такие как A. alternata и Alternaria molesta, патогенные виды Aspergillus, такие как A. fumigatus, Aspergillus niger, Aspergillus flavus и Aspergillus clavatus, патогенные виды Fusarium, такие как Fusarium solani, Fusarium oxysporum, Fusarium verticillioides и Fusarium proliferatum, патогенные виды Cryptococcus, такие как Cryptococcus neoformans, Cryptococcus laurentii, Cryptococcus albidus и Cryptococcus gattii, и патогенные виды Trichosporon, такие как Trichosporon ovoides, Trichosporon inkin, Trichosporon asahii, Trichosporon mucoides, Trichosporon asteroides и Trichosporon cutaneum (все ранее рассматривались под общим названием Trichosporon beigelii) и Trichosporon dermatis, Trichosporon dohaense и Trichosporon loubieri. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения Blad применяется против патогенов, которые могут вызывать инвазивные грибковые инфекции (ИГИ), которые, как правило, определяются как системная, генерализованная и висцеральная грибковая инфекция, которая часто является тяжелой и/или угрожающей жизни (в отличие от поверхностных, местных, неопасных, самоизлечивающихся грибковых заболеваний). Особенно предпочтительные вызывающие ИГИ грибки включают виды Candida, Aspergillus или Alternaria, как указано выше, предпочтительно, C. albicans, A. fumigatus или A. alternata, наиболее предпочтительно, C. albicans или A. fumigatus.

Специалист в данной области техники при помощи стандартных методов сможет определить подходящую концентрацию, с которой антимикробный полипептид, включающий (или в основном состоящий из) Blad (или его активный вариант), будет применяться в качестве антимикробного препарата в любых конкретных условиях. Предпочтительно, например, Blad применяется в концентрации по меньшей мере 1 мкг/мл, по меньшей мере 5 мкг/мл, по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 20 мкг/мл, по меньшей мере 50 мкг/мл или по меньшей мере 100 мкг/мл и до 500 мкг/мл, до 600 мкг/мл, до 1 мг/мл, до 2,5 мг/мл, до 5 мг/мл или до 10 мг/мл. Предпочтительно выбранная концентрация Blad составляет от 10 мкг/мл до 5 мг/мл, более предпочтительно от 50 мкг/мл до 2,5 мг/мл, более предпочтительно от 100 мкг/мл до 1 мг/мл и еще более предпочтительно от 100 мкг/мл до 600 мкг/мл (например, около 250 мкг/мл). Авторами настоящего изобретения были получены доказательства (см. примеры 4 и 5) того, что Blad является нетоксичным для организма хозяина в концентрации до, по меньшей мере, 400 мкг/мл.

Авторами настоящего изобретения неожиданно было обнаружено, что сочетание Blad с хелатирующим агентом (например, ЭДТА) дает синергический антимикробный эффект. Таким образом, предпочтительно использовать хелатирующий агент для улучшения антимикробного действия полипептида, включающего (или в основном состоящего из) Blad (или его активный вариант), и использование такого хелатирующего агента может снижать концентрацию указанного антимикробного полипептида, необходимую для достижения определенного уровня антимикробного действия. Хелатирующий агент (также известный как хелант, хелатор или комплексообразующий агент) представляет собой любое химическое соединение, которое связывает ион металла с образованием нековалентного комплекса и уменьшает активность иона. Подходящие хелатирующие агенты включают полиаминокарбоксилаты, такие как ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) и ЭГТА (этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота). Предпочтительно, в качестве хелатирующего агента используется ЭДТА, предпочтительно в концентрации по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 50 мкг/мл или, по меньшей мере 100 мкг/мл и до 500 мкг/мл, до 1 мг/мл, до 5 мг/мл, до 10 мг/мл или до 20 мг/мл. Предпочтительно ЭДТА используется в концентрации от 0,1 мг/мл до 1 мг/мл.

Результаты

Антимикробный полипептид, включающий (или в основном состоящий из) Blad (или его активный вариант), может применяться для подавления роста патогенного для человека/животного микроорганизма (означает, что он обладает микробоостатическим действием) или уничтожения указанного микроорганизма (означает, что он обладает микробицидным действием). Специалист в данной области техники будет способен определить подходящую дозу и/или концентрацию для достижения желаемого подавления роста или уничтожения микроорганизма в каждом конкретном случае.

Предпочтительно, при использовании в качестве микробоостатического агента антимикробный полипептид уменьшает скорость роста на 10%, более предпочтительно на 50%, более предпочтительно на 75%, более предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95%, более предпочтительно на 98%, более предпочтительно на 99% и еще более предпочтительно на 99,9% по сравнению с эквивалентными условиями без использования антимикробного полипептида. Наиболее предпочтительно, антимикробный полипептид предотвращает любой рост микроорганизма.

Предпочтительно, при использовании в качестве микробицидного агента антимикробный полипептид уничтожает 10% популяции микроорганизмов, более предпочтительно 50% указанной популяции, более предпочтительно 75% указанной популяции, более предпочтительно 90% указанной популяции, более предпочтительно 95% указанной популяции, более предпочтительно 98% указанной популяции, более предпочтительно 99% указанной популяции и еще более предпочтительно 99,9% указанной популяции по сравнению с эквивалентными условиями без использования антимикробного полипептида. Наиболее предпочтительно, антимикробный полипептид уничтожает всю популяцию микроорганизма.

При применении для предупреждения или лечения инфекции внутри или снаружи человека или животного антимикробный полипептид предпочтительно используется в терапевтически эффективном количестве, то есть, другими словами, количестве, которое обеспечивает такой уровень подавления роста и/или уничтожения микроорганизма, при котором достигается клинически определяемый уровень предупреждения или устранения инфекции. Предпочтительно терапевтически эффективное количество антимикробного полипептида является нетоксичным для человека или животного. Предполагается, что указанное терапевтически эффективное количество антимикробного полипептида является терапевтически эффективным при введении в составе композиции, содержащей антимикробный полипептид.

Авторами настоящего изобретения неожиданно было обнаружено, что при аналогичных концентрациях (по массе) Blad является примерно таким же эффективным, как амфотерицин B, и более эффективным, чем флуконазол, в отношении C. albicans и A. fumigatus (по показателю фунгицидной и фунгистатической активности). Это является поразительным результатом, учитывая, (i) что Blad обладает намного большей молекулярной массой по сравнению с относительно небольшими органическими молекулами амфотерицина B и флуконазола, и (ii) нетоксичную и съедобную природу Blad для людей и других животных.

Медицинское применение и способы

Авторами настоящего изобретения предложена композиция, содержащая антимикробный полипептид, включающий Blad или его активный вариант, для применения в способе терапевтического или профилактического лечения организма человека или животного. В связи с этим, авторами также предложен способ лечения человека или животного, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антимикробного полипептида, включающего Blad или его активный вариант.

Авторами настоящего изобретения также предложена композиция, содержащая антимикробный полипептид, включающий Blad или его активный вариант, для применения в способе или предупреждения инфекции, вызванной микроорганизмом, внутри или на человеке или животном. В связи с этим, авторами также предложены:

способ предупреждения или лечения инфекции, вызванной микроорганизмом, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антимикробного полипептида, включающего Blad или его активный вариант; и

применение композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антимикробного полипептида, включающего Blad или его активный вариант, в производстве лекарственного средства для предупреждения или лечения инфекции, вызванной микроорганизмом, внутри или на человеке или животном.

Указанная композиция может быть введена при помощи инъекции (например, внутрикожно, подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутрикостно и внутрибрюшинно), трансдермальной доставки частиц, ингаляции, а также местно, перорально или через слизистую оболочку (например, назально, сублингвально, вагинально или ректально).

Предпочтительно указанная композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Такая фармацевтическая композиция может быть приготовлена в виде обычного фармацевтического препарата. Это может быть сделано с помощью стандартных приемов и методов фармацевтической химии, применяемых для изготовления лекарственных препаратов, которые доступны специалистам в данной области техники. Например, антимикробный полипептид, включающий Blad (или его активный вариант), может быть объединен с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями для получения жидкого препарата. Вспомогательные вещества, такие как увлажняющие или эмульгирующие агенты, pH-буферизирующие вещества и тому подобное, также могут присутствовать.

Носителями, разбавителями и вспомогательными веществами, как правило, являются фармацевтические агенты, которые могут вводиться, не вызывая чрезмерной токсичности, и которые сами по себе не вызывают иммунный ответ у индивида, получающего композицию. Фармацевтически приемлемые носи-

тели включают без ограничений жидкости, такие как вода, солевой раствор, полиэтиленгликоль, гиалуроновая кислота, глицерин и этанол. В них также могут быть включены фармацевтически приемлемые соли, например, соли неорганических кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты, сульфаты и тому подобное; и соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты, бензоаты и тому подобное. Также предпочтительно, хотя и необязательно, чтобы препарат содержал фармацевтически приемлемый носитель, который служит в качестве стабилизатора, особенно предпочтительно для композиции, содержащей полипептид, такой как Blad. Примеры подходящих носителей, которые также действуют как стабилизаторы для полипептидов, включают без ограничений фармацевтические категории декстрозы, сахарозы, лактозы, трегалозы, маннита, сорбита, инозита, декстрана и тому подобное. Другие подходящие носители включают без ограничений крахмал, целлюлозу, фосфаты натрия или кальция, лимонную кислоту, винную кислоту, глицин, высокомолекулярные полиэтиленгликоли (ПЭГ) и их комбинации.

После приготовления композиция может быть доставлена субъекту in vivo с помощью различных известных способов и методов. Например, жидкие препараты могут выпускаться в виде предназначенных для инъекций растворов, суспензий или эмульсий и вводиться путем парентеральной, подкожной, внутрикожной, внутримышечной, внутривенной, внутрикостной и внутрибрюшинной инъекции с использованием обычной иглы и шприца или с использованием системы для струйного впрыскивания жидкости. Жидкие препараты также могут наноситься местно на глаза, кожу, волосы или слизистые оболочки (например, сублингвально, вагинально или ректально), или выпускаться в виде мелкодисперсно разбрызгиваемого раствора, подходящего для респираторного или ингаляционного введения. Другие способы введения включают пероральное введение, суппозитории и способы активной или пассивной трансдерамльной доставки. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения антимикробный полипептид входит в состав композиции, изготовленной в виде местной примочки, крема для рук, раствора глазных капель, шампуня или кондиционера.

Субъектом, нуждающимся в антимикробном полипептиде, может быть любой отдельный человек или животное. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения антимикробный полипептид может применяться для предупреждения инфекции у субъектов, подверженных особому риску оказаться не в состоянии избавиться от микробной инфекции без медицинского вмешательства, таких как молодые люди (например, индивид моложе 16 лет, например, индивид моложе 5 лет, 3 лет, 2 лет, 1 года, б месяцев или 1 месяца), пожилые люди (например, индивид старше 70 лет, например, индивид старше 80 лет или 90 лет), субъекты с ослабленной иммунной системой (например, субъекты с первичным иммунодефицитом, субъекты с приобретенным иммунодефицитом (например, больные СПИД) и субъекты с иммунной системой, ослабленной в результате лечения, такого как химиотерапия или прием иммуносупрессивных лекарственных препаратов), тяжелобольные субъекты или субъекты, которые могут особенно часто контактировать с источником патогенных микроорганизмов (например, медицинские работники).

Другое антимикробное применение и способы

Авторами настоящего изобретения предложено применение композиции, содержащей антимикробный полипептид, включающий Blad или его активный вариант, для уничтожения или подавления роста микроорганизма, который является патогенным для человека или животного, на участке, который не находится снаружи или внутри организма человека или животного. В связи с этим, авторами также предложен способ уничтожения или подавления роста микроорганизма, который является патогенным для человека или животного, на участке, который не находится снаружи или внутри организма человека или животного, указанный способ включает введение в указанное местонахождение композиции, содержащей эффективное количество антимикробного полипептида, включающего Blad или его активный вариант. Указанное эффективное количество представляет собой количество, которое обеспечивает такой уровень подавления роста и/или уничтожения микроорганизма, при котором достигается определяемый уровень предупреждения или устранения микробной колонизации. Предпочтительно, эффективное количество антимикробного полипептида является нетоксичным для человека или животного. Предполагается, что указанное эффективное количество антимикробного полипептида является эффективным при введении в составе композиции, содержащей антимикробный полипептид.

В этих вариантах осуществления изобретения предполагается, что антимикробный полипептид применяется в качестве дезинфицирующего средства для предотвращения роста и/или уничтожения патогенного микроорганизма на изделии, которое принимается внутрь или непосредственно помещается на или в человека или животное, или поверхности, которая нуждается в дезинфекции (например, поверхности, которая может прямо или опосредованно вступать в контакт с человеком или животным), так, что происходит снижение риска:

(i) инфицирования человека или животного указанным патогенным микроорганизмом; или

(ii) контакта человека или животного с токсином, выделяемым патогенным микроорганизмом.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения антимикробный полипептид применяется внутри или снаружи пищевого продукта для предотвращения роста патогенного для человека/животного микроорганизма снаружи или внутри этого пищевого продукта или для уничтожения патогенного для человека/животного микроорганизма, уже присутствующего снаружи или внутри этого пи-

щевого продукта. Таким образом, антимикробный полипептид может применяться для уменьшения риска инфицирования человека или животного патогенным микроорганизмом или попадания внутрь организма человека или животного токсина, выделяемого патогенным микроорганизмом, в результате употребления этого пищевого продукта. В этих вариантах осуществления изобретения особенно предпочтительным является, чтобы указанный патогенный микроорганизм был способен вызывать пищевое отравление (например, непосредственно или через выделение токсина). Предполагается, что термин "пищевой продукт" означает любое жидкое или твердое вещество, предназначенное для употребления с целью питания или получения удовольствия. Композиция, содержащая антимикробный полипептид, может, например, быть смешана с другими компонентами пищевого продукта в процессе приготовления этого пищевого продукта или может, например, быть нанесена на поверхность пищевого продукта (например, в виде жидкой пленки или мелких капель). Конкретные пищевые продукты, рассматриваемые в этих вариантах осуществления изобретения, включают воду, безалкогольные напитки, такие как фруктовые соки, алкогольные напитки, сырое мясо, приготовленное мясо птицы, яйца, молоко, сливки, мороженое, сыр, сырые овощи и фрукты, пищевые продукты, подвергшиеся технологической обработке (особенно целесообразно для L. monocytogenes, V. cholerae, патогенных видов Staphylococcus, патогенных видов Salmonella и патогенных видов Campylobacter), и орехи и углеводистые пищевые продукты, такие как хлеб, рис и картофель (особенно целесообразно для патогенных видов Aspergillus).

В альтернативных предпочтительных вариантах осуществления изобретения антимикробный полипептид применяется внутри или снаружи медицинского устройства или инструмента, - любого устройства, расположенного снаружи или внутри организма с целью осуществления диагностической, терапевтической или хирургической функции, - такого как искусственная ткань организма, кардиостимуляторы, стенты, каркасы, клапаны, термометры, шприцы, инъекционные иглы, управляющая аппаратура, вентиляторы, сердечные дефибрилляторы, аппараты искусственного кровообращения, приборы для ЭЭГ и ЭКГ, ультразвуковые устройства, сверла, пилы, ножи, скальпели, щипцы, ножницы, зажимы и шовный материал и тому подобное. Таким образом, антимикробный полипептид может применяться для предотвращения заражения организма при контакте с устройством или инструментом во время медицинских процедур.

В альтернативных предпочтительных вариантах осуществления изобретения антимикробный полипептид применяется в отношении поверхности, которая нуждается в дезинфекции (например, поверхности, которая может прямо или опосредованно вступать в контакт с человеком или животным). Поверхность, на которую может быть нанесен антимикробный полипептид, может находиться в условиях, в которых:

(a) проводится медицинское обследование, диагностика или лечение;

(b) готовятся или иным образом обрабатываются или хранятся продукты питания;

(c) осуществляется личное мытье и/или санитарная обработка; и/или

(d) находится лицо, подверженное особому риску (i) заражения инфекцией микроорганизма; и/или

(ii) быть не в состоянии избавиться от микробной инфекции без медицинского вмешательства (примеры таких лиц описаны выше).

Примеры таких поверхностей включают любые поверхности внутри промышленных пищекомбинатов и полки/места для размещения товаров в продовольственных супермаркетах.

Поверхностью, на которую может быть нанесен антимикробный полипептид, может быть пол или стена здания (или его комнаты) или поверхность предмета внутри указанных комнаты или здания. Конкретные рассматриваемые здания включают стационарные лечебные учреждения и другие здания системы здравоохранения, школы и другие детские учреждения, здания учреждений по уходу за пожилыми людьми, рестораны и другие учреждения общественного питания, места приготовления, обработки и/или хранения пищевых продуктов (например, рынки, продовольственные склады, супермаркеты и промышленные пищекомбинаты) и частные жилища. Конкретные рассматриваемые комнаты включают все комнаты в учреждениях здравоохранения, особенно операционные, отделения экстренной медицинской помощи, палаты интенсивной терапии и палаты для пациентов, а также кухни, ванные комнаты, туалеты, столовые и помещения для приготовления/обработки пищи.

Примеры

В следующих примерах BLAD обозначает существующий в природе Blad-содержащий гликоолигомер, включающий полипептид Blad массой 20 кДа, очищенный по методике, описанной в Ramos et al. (1997) Planta 203(1): 26-34: см. разделы "Растительный материал и условия выращивания" и "Очистка белков" в параграфе "Материалы и методы" этого документа.

Определения.

МИК - минимальная ингибирующая концентрация: наименьшая концентрация антимикробного препарата, которая подавляет видимый рост микроорганизма.

МФК/МБК - минимальная фунгицидная/бактерицидная концентрация (или минимальная летальная концентрация): наименьшая концентрация антимикробного препарата, необходимая для уничтожения 99,9% первичного инокулума после 24 часов при стандартизированном наборе условий.

Кривые время-эрадикация - определение "уничтожения" изолята в течение времени одним или не-

сколькими антимикробными агентами в контролируемых условиях известно как метод время-эрадикация. Этот метод основан на бульонной культуре, где скорость уничтожения определенного количества инокулума определяется путем выборочного контроля количества организма (не препарата) и пробирок и колб, содержащих антимикробный агент, через определенные промежутки времени и определения количества выживших колоний (КОЕ/мл) путем посева каждого образца на чашку с агаризованной средой.

Пример 1. Бактерицидное действие BLAD.

МИК и МБК BLAD в отношении различных видов бактерий (с использованием среды Мюллера-Хинтона)

Виды бактерий	МИК (мкг/мл)	МБК (мкг/мл)
Pseudomonas aeruginosa	32-256	128-256
Listeria monocytogenes	8	>512
Bacillus subtilis	4	>512
Staphylococcus aureus	8	>512
Salmonella thyphimurium	64	128

Кривые время-эрадикация для BLAD и (A) Listeria monocytogenes и (B) Pseudomonas aeruginosa: см. фиг. 1.

Для L. monocytogenes и P. aeruginosa бактериостатическая концентрация BLAD составляет 100 мкг/мл, а бактерицидная - 250 мкг/мл.

Зона подавления BLAD в отношении (A) Staphylococcus aureus, (B) Bacillus subtilis, (C) Pseudomonas aeruginosa и (D) Listeria monocytogenes: см. фиг. 2.

Рост всех тестируемых видов бактерий на среде PCA в возрастающей степени подавлялся с увеличением количества BLAD на обработанных дисках с 20 мкг (нижние правые диски) до 100 мкг (нижние левые диски) и до 200 мкг (верхние диски) (время инкубации - 24 часа, эффект наблюдался в течение нескольких дней).

Пример 2. Фунгицидное действие BLAD.

МИК и МФК BLAD в отношении видов Candida (с использованием среды RPMI)

Виды *Candida*	МИК (мкг/мл)	МФК (мкг/мл)
Candida albicans	16-32	256
Candida dubliniensis	32-64	256
Candida glabrata	1-2	>512
Candida lusitaneae	32-64	>512
Candida parapsilosis	32	>512
Candida tropicalis	16-32	>512

МИК и МФК BLAD в отношении видов Candida (с использованием картофельно-декстрозной питательной среды (PDB) с pH 7,5)

Виды *Candida*	МИК (мкг/мл)	МФК (мкг/мл)
Candida albicans	2-4	4-8
Candida dubliniensis	2-4	8
Candida glabrata	2	16-64
Candida lusitaneae	2-4	8-32
Candida parapsilosis	2-4	64
Candida tropicalis	4	4-16

МИК и МФК BLAD в отношении различных мицелиальных грибков (с использованием среды RPMI)

Виды грибков	МИК (мкг/мл)	МФК (мкг/мл)
Виды *Alternaria*	64	>512
Aspergillus fumigatus	32	>512
Aspergillus niger	32-64	>512
Botrytis cinerea	128	512
Colletotrichum acutatum	64	>512
Colletotrichum gloesporioides	64	>512
Fusarium oxysporum	64	>512

Примечание - МИК для Cryptococcus neoformans составила 0,25-1,0 мкг/мл.

Кривая время-эрадикация (A) и кривая роста (B) для BLAD и Candida albicans на среде PDB: см. фиг. 3.

Для C. albicans фунгистатическая концентрация BLAD составляет 10 мкг/мл, а фунгицидная - 100 мкг/мл.

Кривая роста для BLAD и Candida albicans на среде PDB с pH 7: см. фиг. 4.

Для C. albicans фунгистатическая концентрация BLAD и амфотерицина B составляет 10 мкг/мл. Флуконазол в концентрации 100 мкг/мл только откладывает рост.

Зона подавления BLAD (A и B) и амфотерицина B или флуконазола (C) в отношении Candida albicans: см. фиг. 5.

Рост C. albicans на картофельно-декстрозном агаре (PDA) с pH 7,5 в возрастающей степени подавлялся с увеличением количества BLAD на обработанных дисках с 20 мкг (A, нижний диск) до 50 мкг (B, нижний диск), до 100 мкг (B, верхний диск) и до 200 мкг (A, верхний диск) (инкубация в течение 3 суток). Это выгодно отличается от подавления, достигнутого при использовании 20 мкг амфотерицина B (C, верхний диск) и 25 мкг флуконазола (C, нижний диск).

Зона подавления BLAD в отношении Cryptococcus neoformans на средах PDA (A) и PDA с pH 7,5 (B) (3 суток инкубации): см. фиг. 6.

Рост C. neoformans подавлялся на обеих средах по мере увеличения количества BLAD на обработанных дисках, хотя с большей эффективностью на среде PDA. I - верхние диски 200 мкг, нижние диски 10 мкг; II - верхние левые диски 50 мкг, верхний правый диск 20 мкг, нижний диск 100 мкг.

Зона подавления BLAD в отношении Aspergillus fumigatus на средах Мюллера-Хинтона (правило M44-A) (A), PDA (B) или PDA с pH 7,5 (C) (3 суток инкубации): см. фиг. 7.

Рост A. fumigatus подавлялся на всех средах по мере увеличения количества BLAD на обработанных дисках, хотя с большей эффективностью на среде PDA с pH 7,5. I - верхние диски 200 мкг, нижние диски 10 мкг; II - верхние левые диски 50 мкг, верхний правый диск 20 мкг, нижний диск 100 мкг.

Зона подавления BLAD (A и B) и амфотерицина B или флуконазола (C) в отношении Aspergillus fumigatus на среде PDA с pH 7,5 (6 суток инкубации): см. фиг. 8.

Рост A. fumigatus подавлялся на среде PDA с pH 7,5 по мере увеличения количества BLAD на обработанных дисках с 20 мкг (A, нижний диск) до 50 мкг (B, нижний диск) до 100 мкг (B, верхний диск) и до 200 мкг (A, верхний диск). Это выгодно отличается от подавления, достигнутого при использовании 10 мг амфотерицина B (C, верхний диск) и 100 мг флуконазола (C, нижний диск). Очень похожие результаты были получены для Trichosporon cutaneum (данные не приводятся).

Пример 3. Синергический эффект ЭДТА и BLAD в отношении бактерицидного/фунгицидного действия против патогенов человека.

Кривые время-эрадикация для BLAD и/или ЭДТА и (A) Listeria monocytogenes, (B) Pseudomonas aeruginosa и (C) Candida albicans: см. фиг. 9.

Ни BLAD в концентрации 10 мкг/мл, ни ЭДТА в концентрации 0,1 мг/мл не подавляют рост L. monocytogenes, но комбинация этих двух веществ в данных концентрациях является бактериостатической. BLAD в концентрации 50 мкг/мл или ЭДТА в концентрации 1 мг/мл подавляют рост P. aeruginosa (т.е. обе концентрации являются бактериостатическими), но комбинация этих двух веществ в данных концентрациях является бактерицидной. BLAD в концентрации 10 мкг/мл или ЭДТА в концентрации 0,1 мг/мл подавляют рост C. albicans (т.е. обе концентрации являются фунгистатическими), но комбинация этих двух веществ в данных концентрациях является фунгицидной.

Пример 4. Изучение кожной токсичности BLAD у морских свинок.

Конфиденциальное исследование было выполнено на факультете ветеринарной медицины Технического университета Лиссабона для Агрономического института в период с 18 июля 2006 г. по 1 августа 2006 г. с использованием руководства ОЭСР по тестированию химических веществ № 402, Острая кожная токсичность. Исследование было проведено в соответствии с нормами надлежащей лабораторной практики и благополучия животных.

Острую кожную токсичность BLAD оценивали после воздействия разовой дозы на морских свинок, которые получили широкое признание в качестве подходящих животных для изучения кожной токсичности. BLAD наносили на безволосый участок кожи животных, разделенных на две группы по 10 животных каждая, в дозе 200 мкг/мл и 400 мкг/мл соответственно. После экспозиции животные находились под наблюдением в течение 15 дней, во время которых фиксировали массу тела, заболеваемость и смертность.

Материалы и методы

1. Материалы.

Исследуемый препарат: BLAD был получен с концентрацией 5 мг/мл (желтоватая непрозрачная жидкость, 0-4°C) и хранился при температуре -80°C.

Животные: морские свинки альбиносы; линия Dunkin Hartley (HsdPoc: DH) от Harlan Iberica, Barcelona.

Количество используемых животных: 30; масса тела: 400-449 гр; возраст: 6 недель.

Условия содержания: животные были помещены по отдельности в полиэтиленовые коробки со стерилизованными древесными опилками (Lignocel).

Условия окружающей среды:

a) Фотопериод: циклы свет/темнота в течение 12 ч через 12 ч.

b) Контролируемые условия среды: средняя температура 19/22°C и средняя влажность 60%.

Адаптация: животные находились в экспериментальных условиях окружающей среды в течение семи дней до начала эксперимента.

Корм: поддерживающий рацион для грызунов Global Diet 2014, поставляемый Harlan Iberica, Barcelona; вода неограниченно.

2. Методы.

Нанесение: животных брили за 48 ч до начала испытания, и только тех животных, у которых отсутствовали повреждения на коже, отбирали для дальнейшего исследования. Аликвоту, равную 1 мл (с концентрацией или 200 мкг/мл или 400 мкг/мл), наносили на побритую кожу каждого животного.

Дизайн исследования: 30 животных, принимающих участие в исследовании, были разделены на четыре группы: две группы по десять животных каждая и две группы по пять животных каждая. Группу из десяти животных подвергали воздействию BLAD с концентрацией 200 мкг/мл (опытная группа 1) и другую группу из десяти животных подвергали воздействию BLAD с концентрацией 400 мкг/мл (опытная группа 2). Две группы из пяти животных служили в качестве контроля: на кожу животных одной группы наносили воду (аликвота объемом 1 мл), в то время как другая группа не подвергалась никакому воздействию, но с ней обращались как со всеми другими группами.

Оценка результатов: лосле экспозиции животных ежедневно осматривали в течение 15 дней, чтобы зафиксировать какие-либо признаки нездоровья или даже смерть. При оценке заболеваемости особое внимание уделяли возможному появлению повреждений на коже в месте нанесения и возможным признакам общей токсичности, таким как изменения нормальной модели поведения. Массу тела определяли индивидуально перед началом эксперимента и в конце периода испытаний.

Результаты.

Ни при каких концентрациях BLAD не были отмечены признаки каких-либо физических изменений на участке кожи, на который осуществлялось нанесение, а также изменения в питьевом/пищевом или общем поведении. Любые неблагоприятные побочные реакции или смерть отсутствовали после нанесения BLAD. Увеличение массы тела было одинаковым во всех группах (и соответствовало ожидаемому увеличению у развивающихся животных такого молодого возраста).

Заключение.

BLAD в концентрациях до 400 мкг/мл (и возможно выше) не обладает кожной токсичностью.

Пример 5. Изучение пероральной токсичности BLAD у белых крыс.

Конфиденциальное исследование было выполнено на факультете ветеринарной медицины Технического университета Лиссабона для Агрономического института с использованием руководства ОЭСР по тестированию химических веществ № 401, Острая пероральная токсичность. Исследование было проведено в соответствии с нормами надлежащей лабораторной практики и благополучия животных.

Острую пероральную токсичность BLAD оценивали после воздействия разовой дозы на крыс, которые получили широкое признание в качестве подходящих животных для изучения пероральной токсичности. BLAD вводили путем принудительного кормления животным, разделенным на две групп по 10 животных каждая, в дозе 200 мкг/мл и 400 мкг/мл соответственно. После экспозиции животные находились под наблюдением в течение 15 дней, во время которых фиксировали массу тела, заболеваемость и смертность. После периода наблюдения животных умерщвляли и подвергли некропсии.

Материалы и методы

1. Материалы.

Исследуемый препарат: BLAD был получен с концентрацией 5 мг/мл (желтоватая непрозрачная жидкость, 0-4°C) и хранился при температуре -80°C.

Животные: Rattus norvegicus, линия Wistar Hannover, приобретенные виварием факультета ветеринарной медицины Лиссабона у Harlan Iberica, Barcelona.

Количество используемых животных: 30; масса тела: 250-300 гр; возраст: 10 недель.

Условия содержания: животные были помещены по отдельности в полиэтиленовые коробки со стерилизованными древесными опилками (Lignocel).

Условия окружающей среды.

a) Фотопериод: циклы свет/темнота в течение 12 ч через 12 ч.

b) Контролируемые условия среды: средняя температура 19/22°C и средняя влажность 60%.

Адаптация: животные находились в экспериментальных условиях окружающей среды в течение семи дней до начала эксперимента.

Корм: поддерживающий рацион для грызунов Global Diet 2014, поставляемый Harlan Iberica, Barcelona; вода неограниченно.

2. Методы.

Введение: аликвоту, равную 1 мл (с концентрацией или 200 мкг/мл, или 400 мкг/мл), вводили путем

пероральной (рото-пищеводной) интубации, широко известной как принудительное кормление. Введение проводили при помощи металлического зонда, подходящего для используемого вида животных. Перед введением препарата животных подвергали голодной выдержке в течение 18 ч и кормили через 3 ч после введения.

Дизайн исследования: 30 животных, принимающих участие в исследовании, были разделены на четыре группы: две группы по десять животных каждая и две группы по пять животных каждая. Группу из десяти животных подвергали воздействию BLAD с концентрацией 200 мкг/мл (опытная группа 1) и другую группу из десяти животных подвергали воздействию BLAD с концентрацией 400 мкг/мл (опытная группа 2). Две группы из пяти животных служили в качестве контроля: животные одной группы получали воду (аликвоту объемом 1 мл), в то время как другая группа не подвергалась никакому воздействию, но с ней обращались как со всеми другими группами.

Оценка результатов: после введения животных ежедневно осматривали в течение 15 дней, чтобы зафиксировать какие-либо признаки нездоровья или даже смерть. Массу тела определяли индивидуально перед началом эксперимента и в конце периода испытаний. После периода наблюдения животных умерщвляли (путем удушения в атмосфере, насыщенной углекислым газом) для последующего вскрытия.

Результаты.

Ни при каких концентрациях BLAD не были отмечены признаки каких-либо физических изменений или изменений в питьевом/пищевом или общем поведении. Любые неблагоприятные побочные реакции или смерть отсутствовали после введения BLAD. Увеличение массы тела было одинаковым во всех группах (и соответствовало ожидаемому увеличению у развивающихся животных такого молодого возраста). Посмертный макроскопический осмотр органов грудной и брюшной полости не выявил в них никаких изменений.

Заключение.

BLAD в концентрациях до 400 мкг/мл (и возможно выше) не обладает пероральной токсичностью.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для профилактики или лечения инфекций человека или животного, вызванных патогенными грибами или бактериями, содержащая антимикробный полипептид, обладающий фунгицидным и бактерицидным действием и включающий последовательность Blad, представленную в SEQ ID NO:4, или его активный вариант, идентичный по меньшей мере на 70% последовательности SEQ ID NO: 4, либо фрагменту последовательности SEQ ID NO: 4 длиной по меньшей мере в 100 аминокислотных остатков, а также содержащая фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

2. Композиция по п.1, которая дополнительно содержит хелатирующий агент.

3. Композиция по п.1 или 2, где человек или животное имеют ослабленную иммунную систему или тяжелое заболевание.

4. Композиция по любому из пп.1-3, где бактерия является патогенным видом одного из следующих родов: Pseudomonas, Listeria, Bacillus, Staphylococcus и Salmonella.

5. Композиция по любому из пп.1-3, где гриб является патогенным видом одного из следующих родов: Candida, Aspergillus, Alternaria, Fusarium, Cryptococcus и Trichosporon.

6. Композиция по п.5, где гриб может являться возбудителем инвазивной грибковой инфекции, предпочтительно Candida albicans, Aspergillus fumigatus или Alternaria alternata.

7. Применение композиции по п.1 для уничтожения или подавления роста грибов или бактерий, патогенных для человека или животного.

8. Применение композиции по п.1 для дезинфекции от грибов или бактерий, патогенных для человека или животного, изделия для применения внутрь или наружно в отношении человека или животного, или поверхности, которая нуждается в дезинфекции.

9. Применение по п.8, где указанное изделие является пищевым продуктом или медицинским устройством или инструментом.

10. Применение по п.8, где указанная поверхность находится в том месте, где:

(a) проводится медицинское обследование, диагностика или лечение;

(b) готовятся или иным образом обрабатываются или хранятся продукты питания;

(c) осуществляются процедуры личной гигиены и/или санитарная обработка; и/или

(d) находится лицо, подверженное особому риску заражения инфекцией, вызванной грибами или бактериями, патогенными для человека или животного; и/или

(e) находится лицо, которое не в состоянии противостоять без медицинского вмешательства инфекции, вызванной грибами или бактериями, патогенными для человека или животного.

11. Применение по любому из пп.7-10, где указанная композиция дополнительно содержит хелатирующий агент.

12. Применение по любому из пп.7-11, где бактерия является патогенным видом одного из следующих родов: Pseudomonas, Listeria, Bacillus, Staphylococcus и Salmonella.

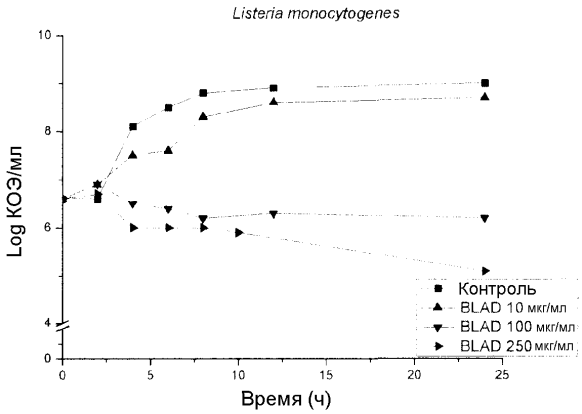
13. Применение по любому из пп.7-11, где гриб является патогенным видом одного из следующих

родов: Candida, Aspergillus, Alternaria, Fusarium, Cryptococcus и Trichosporon.

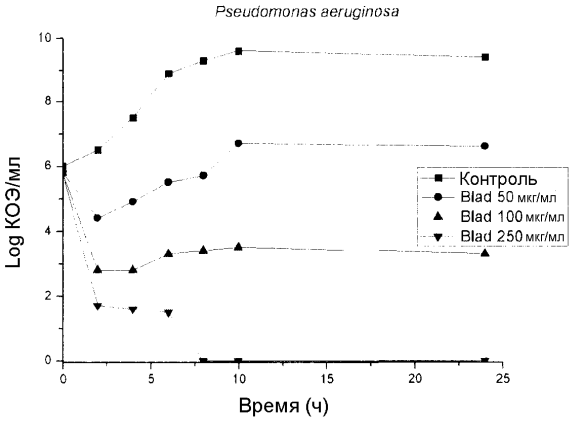
14. Применение по п.13, где гриб может являться возбудителем инвазивной грибковой инфекции, предпочтительно Candida albicans, Aspergillus fumigatus или Alternaria alternata.

15. Способ уничтожения или подавления роста грибов или бактерий, патогенных для человека или животного, включающий местную обработку композицией по п.1.

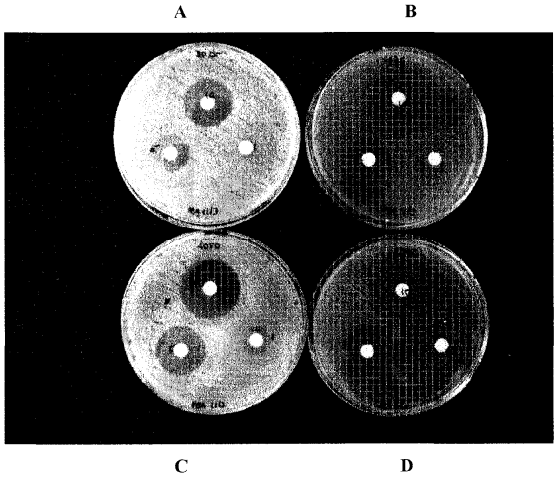
A



B

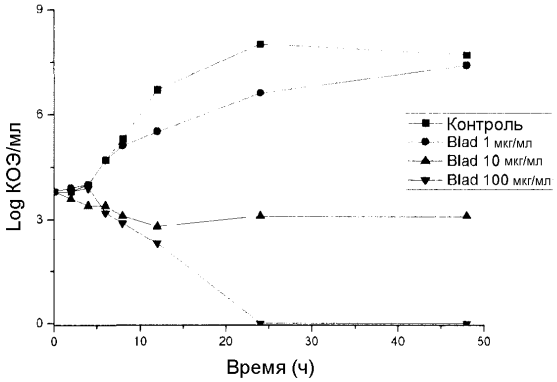


Фиг. 1

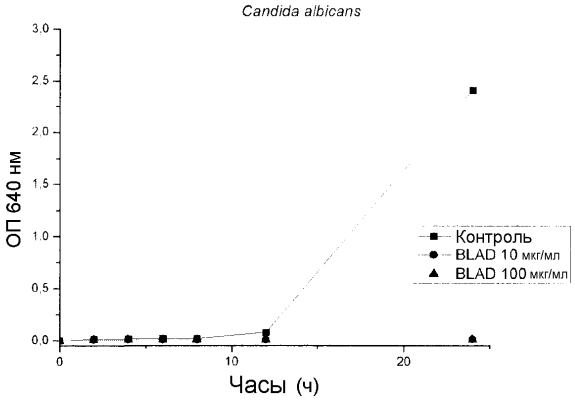


Фиг. 2

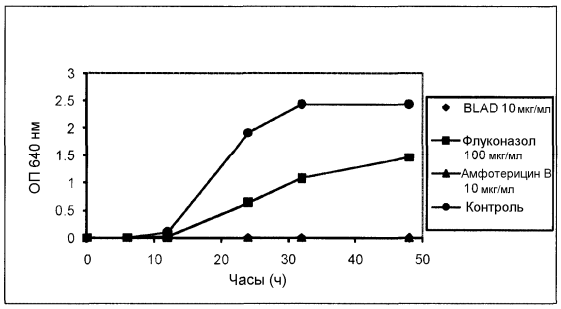
A



B

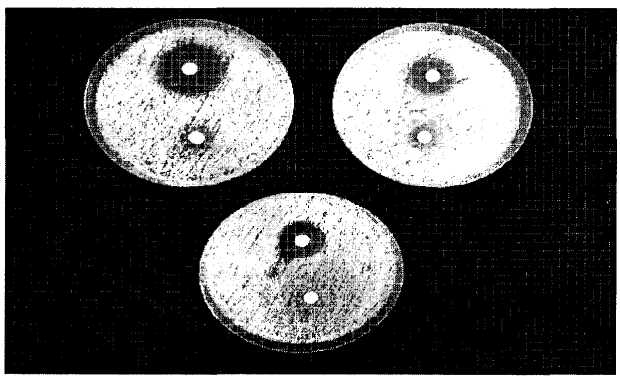


Фиг. 3



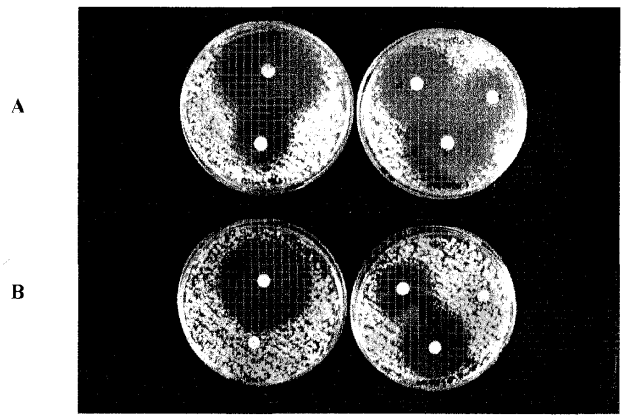
Фиг. 4

A B

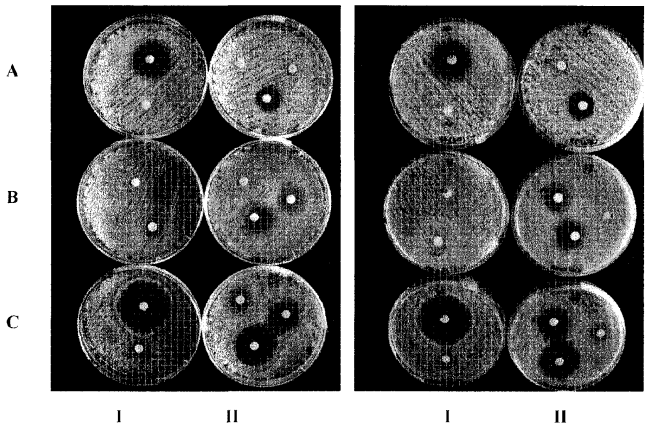


C

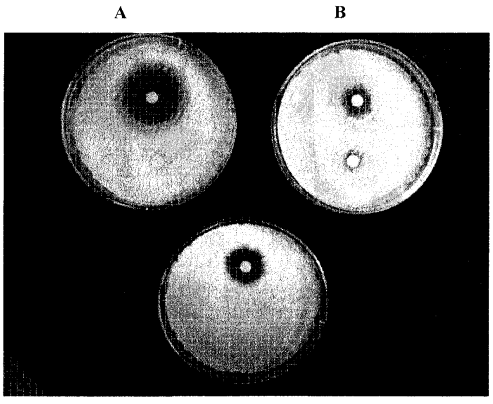
Фиг. 5



Фиг. 6

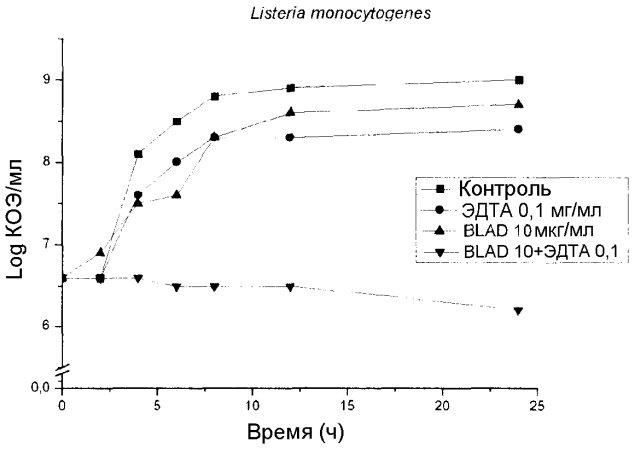


Фиг. 7

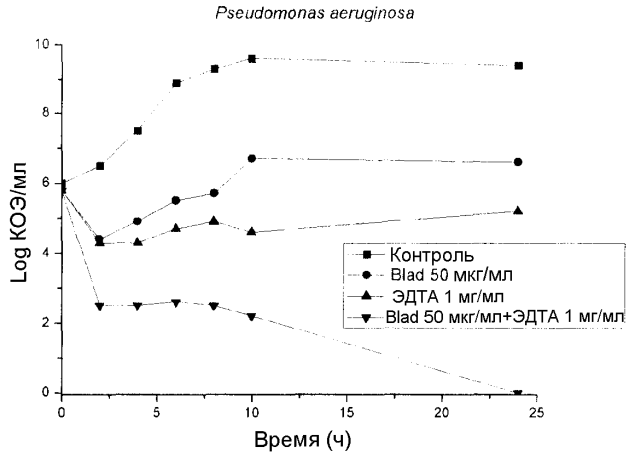


Фиг. 8

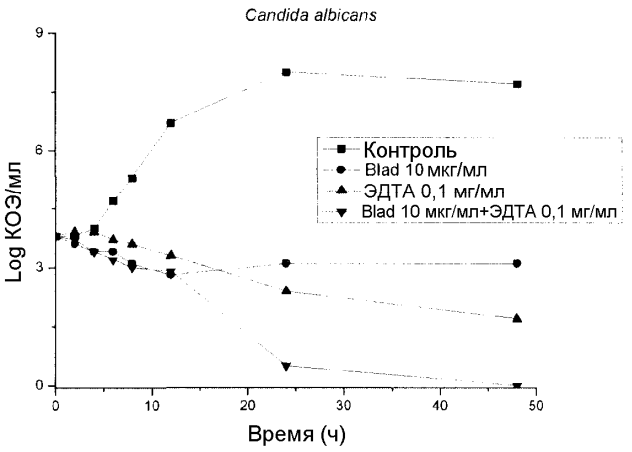
A


Listeria monocytogenes
Log КОЭ/мл
Время (ч)
Контроль
ЭДТА 0,1 мг/мл
BLAD 10 мкг/мл
BLAD 10+ЭДТА 0,1

B


Pseudomonas aeruginosa
Log КОЭ/мл
Время (ч)
Контроль
Blad 50 мкг/мл
ЭДТА 1 мг/мл
Blad 50 мкг/мл+ЭДТА 1 мг/мл

C


Candida albicans
Log КОЭ/мл
Время (ч)
Контроль
Blad 10 мкг/мл
ЭДТА 0,1 мг/мл
Blad 10 мкг/мл+ЭДТА 0,1 мг/мл

Фиг. 9

```
   1 gatggcgatg aatgaacact gcgtttgctg gctttgatga aaatcgagtg caacctaata
  61 taatcaaata tgggtaagat gagagtgagg tttccaacgt tagtgttggt actaggaata
 121 gtattcctca tggcagtgtc aattggtatt gcttatggag aaaaagatgt gctaaagagt
 181 catgagaggc ctgaggaaag agaacaagag gagtggcaac ctaggagaca acgacctcaa
 241 agtagaaggg aagagagaga gcaagagcaa gagcagggtt ctccctcata cccacgcagg
 301 cagagtggtt atgagaggag acaataccat gagaggagtg agcagaggga agagagagag
 361 caagaacaac aacaaggttc tccctcatac tcacgtagac aaaggaaccc ttatcacttc
 421 agctctcaaa gattccaaac tctttacaaa aataggaatg gcaaaatccg tgtgctcgag
 481 aggtttgacc aaagaaccaa tagacttgag aatctccaaa actaccgcat tgttgagttc
 541 caatcaaaac ctaacactct cattctccct aaacactctg atgctgacta cgtcctcgtt
 601 gtactcaatg gtagagccac aatcacgata gtaaaccctg atagaagaca agcatataac
 661 cttgagtatg gcgatgctct cagaatccca gctggctcaa cttcatatat ccttaacccg
 721 gatgacaacc agaagcttag agtagtcaag ctcgcaatac ccatcaacaa tcctggctac
 781 ttttatgatt tctatccatc gagtactaaa gaccaacaat cctacttcag tggcttcagc
 841 aggaacactt tagaggccac cttcaatact cgttatgaag agatacaaag gattatttta
 901 gggaatgagg atgagcaaga atatgaggaa caaaggcgtg ggcaagagca gagcgaccaa
 961 gacgaggggg tgatagtgat agtttcaaag aaacagatcc aaaaattgac aaaacacgct
1021 caatcttcat caggaaaaga caaaccctct gattctggcc ccttcaactt gagaagcaat
1081 gagcccatat attcaaacaa gtatgggaac ttctatgaaa tcactccaga tagaaaccct
1141 caagttcagg atttgaatat ctcctctacc tatataaaaa ttaacgaggg agctttgttg
1201 ttgccacact ataactcaaa ggccatatat gtagtcgtgg ttgatgaagg agaaggaaat
1261 tatgaactgg taggtattcg agatcaacaa cgacaacaag atgagcaaga agagaaagag
1321 gaagaagtga taaggtatag tgctagatta tcagaaggtg acatttttgt aattccagca
1381 ggttatccaa tttccatcaa tgcttcctca aatcttcgct tgcttggatt tggcatcaat
1441 gctgatgaaa accagaggaa tttcctcgca ggttctaaag acaatgtgat aaggcagtta
1501 gatagagcag tgaatgagct cacattccct ggttctgctg aagatattga gagattaatc
1561 aaaaaccaac aacagtctta ctttgcaaat ggtcagcctc aacaacaaca acaacaacaa
1621 agtgagaagg agggaaggcg tggaagaagg ggttcatctc ttccattttg agcacttttt
1681 actaagctgt tttaaaagct actatcatgt aagagctcat agtgagctac tgagagaata
1741 ataaaactaa agttggacct ttgtactaat aatgttaata aaaaaaaaaa a
```

Фиг. 10

```
   1 cgtagacaaa ggaaccctta tcacttcagc tctcaaagat tccaaactct ttacaaaaat
  61 aggaatggca aaatccgtgt gctcgagagg tttgaccaaa gaaccaatag acttgagaat
 121 ctccaaaact accgcattgt tgagttccaa tcaaaaccta acactctcat tctccctaaa
 181 cactctgatg ctgactacgt cctcgttgta ctcaatggta gagccacaat cacgatagta
 241 aaccctgata gaagacaagc atataacctt gagtatggcg atgctctcag aatcccagct
 301 ggctcaactt catatatcct taacccggat gacaaccaga agcttagagt agtcaagctc
 361 gcaataccca tcaacaatcc tggctacttt tatgatttct atccatcgag tactaaagac
 421 caacaatcct acttcagtgg cttcagcagg aacactttag aggccacctt caatactcgt
 481 tatgaagaga tacaaaggat tattttaggg aatgaggat
```

Фиг. 11