

ANTIBACTERIANOS ALTERNATIVO A LOS ANTIBIÓTICOS, CON ALTA ESPECIFICIDAD FRENTE A ESCHERICHIA COLI

P PATENTED TECHNOLOGY

CONTACT DETAILS:

Relaciones con la Empresa
Oficina de Transferencia de Resultados de la Investigación-OTRI
Universidad de Alicante
Tel.: +34 96 590 99 59
Email: areaempresas@ua.es
<http://innoua.ua.es>

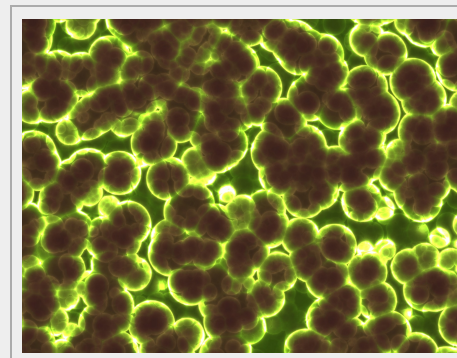
ABSTRACT

El grupo de investigación de “**Microbiología Molecular**” de la **Universidad de Alicante** ha modificado una serie de **proteínas fágicas (Poll-N y UK-C)** que presentan una especificidad exclusiva frente a la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*), pero no frente a otras bacterias Gram-negativas (G-).

Por estos motivos, su uso como **antimicrobiano específico frente a E. coli** es potencialmente interesante, especialmente en el caso de alimentos, cosméticos o aguas contaminadas. Igualmente, sería de utilidad en el tratamiento de enfermedades (infecciones) producidas por *E. coli*.

La presencia de una cola de histidinas añadida a estas proteínas fágicas no sólo **facilita su purificación**, sino que también mejora su **eficiencia de lisis**, sin necesidad de tratamientos de permeabilización de las células.

Se buscan empresas interesadas en la **explotación comercial** de la tecnología mediante acuerdos de licencia y/o cooperación técnica.



INTRODUCTION

Las endolisinas son enzimas producidas por bacteriófagos (virus que infectan bacterias). La función biológica de estas endolisinas es hidrolizar enlaces en la pared celular bacteriana al finalizar el ciclo reproductivo del virus, provocando así la lisis celular y la consiguiente liberación de los nuevos bacteriófagos producidos durante su etapa intracelular. Para poder acceder a su diana en la pared celular, estas enzimas necesitan de la participación de otras proteínas, denominadas holinas, que forman poros en la membrana citoplasmática.

Las endolisinas (junto con las holinas) son una de las familias de proteínas más conocidas. Debido a su capacidad de lisar bacterias, **las endolisinas se han propuesto como agentes antibacterianos alternativos al empleo de antibióticos**, ya que el uso de estos últimos ha dado lugar a la aparición de resistencias, disminuyendo de manera considerable su eficacia.

Adicionalmente, el amplio espectro de actuación de muchos **antibióticos** puede dar lugar a **efectos secundarios** durante el tratamiento de infecciones, tales como la alteración de la microbiota natural del paciente al afectar a diferentes especies además del agente causal.

En el caso de bacterias Gram-positivas (G+), el uso de las endolisinas como agente antibacteriano está ampliamente desarrollado. Sin embargo, en el grupo concreto de las bacterias **Gram-negativas (G-)** tiene **varias limitaciones**. En primer lugar, debido a **problemas de accesibilidad** a su diana en la pared celular por la presencia de una membrana lipídica externa (ME). En segundo lugar, hay muy **poca variabilidad en la composición de la pared celular** de las distintas especies de G-, comprometiendo la **especificidad**.

Para paliar el primer problema se podría emplear un **tratamiento permeabilizante de la ME** o **añadir a la endolisina colas policatiónicas** (de aminoácidos con carga neta positiva) que ayuden a vencer las repulsiones electrostáticas debidas a la red de cargas negativas de la superficie celular.

Mientras que, para solucionar el problema de la especificidad, se pueden **emplear proteínas modulares, con un dominio catalítico y otro de unión a la pared celular**. Sin embargo, las proteínas modulares descritas para G- son menos numerosas que para G+ y, además, su mayor tamaño puede dificultar su purificación y manipulación.

Por los motivos anteriormente expuestos, derivados de la problemática que en general afecta al empleo de endolisinas en G-, **existe pues la necesidad de proporcionar proteínas con adecuada actividad lítica que no requieran tratamientos permeabilizantes, y que sean específicas de un grupo concreto de bacterias**.

TECHNICAL DESCRIPTION

El grupo de investigación de “Microbiología Molecular” de la **Universidad de Alicante** ha desarrollado una serie de **proteínas fágicas modificadas (Poll-N y UK-C) con actividad antibacteriana específica frente a E. coli** sin necesidad de tratamientos previos de permeabilización.

Los polipéptidos (proteínas) son una secuencia de aminoácidos que están unidos entre sí por enlaces peptídicos.

Los polipéptidos con actividad endolisina desarrollados, **Poll-N** y **UK-C**, comprenden, respectivamente:

- Una secuencia de aminoácidos según la **SEQ ID NO: 3**, o un derivado del mismo (deleción, adición, inserción y/o sustitución en esta secuencia aminoacídica), y una **cola policatiónica de aminoácidos (histidinas) en el extremo N-terminal**; y,
- Una secuencia de aminoácidos según la **SEQ ID NO: 4**, o un derivado del mismo (deleción, adición, inserción y/o sustitución en esta secuencia aminoacídica), y una **cola policatiónica de aminoácidos (histidinas) en el extremo C-terminal**.

Una vez clonadas, expresadas y purificadas, las proteínas resultantes (**Poll-N** y **UK-C**) presentan una **cola de histidina** en su extremo N-terminal o C-terminal, siendo por tanto diferentes a la original. Esta cola no sólo **facilita su purificación**, sino que también **favorece** el contacto de la endolisina con la superficie de la célula, mejorando así su **eficiencia de lisis**.

Los polipéptidos desarrollados pueden emplearse tanto como **agentes antimicrobianos frente a contaminaciones por E. coli**, así como en el **tratamiento de enfermedades (infecciones) producidas por E. coli**.

TECHNOLOGY ADVANTAGES AND INNOVATIVE ASPECTS

Las principales ventajas de los péptidos sintetizados, **Poll-N** y **UK-C**, son las siguientes:

- La presencia de la cola de histidina en los extremos N-terminal o C-terminal de los péptidos sintetizados **facilita su purificación** y mejora su **eficiencia de lisis**.
- Presentan una **alta especificidad** frente a la bacteria *E. coli*, ya que su acción lítica se limita a esta especie sin afectar a ninguna de las bacterias ensayadas pertenecientes a otras especies, incluso aquellas próximamente emparentadas.
- Comparadas con los antibióticos, se espera una **menor probabilidad de aparición de resistencias** frente a estos agentes.
- Se espera que su uso, como mucho, tenga **escasos efectos secundarios** durante el tratamiento de infecciones.
- **Formulación más sencilla**, ya que no se necesitan tratamientos previos de permeabilización de la membrana externa bacteriana, lo que a su vez facilita su **aplicación directa**.

ASPECTOS INNOVADORES DE LA TECNOLOGÍA

El principal aspecto innovador de las proteínas fágicas modificadas es que no necesitan de tratamientos previos de permeabilización de la ME. Además, la adición en los extremos de nucleótidos facilita su manipulación y posterior clonado en el

vector de expresión adecuado. Por último, otro aspecto innovador es la selección de una endolisina frente a *E. coli* cuya secuencia es significativamente diferente de otras.

CURRENT STATE OF DEVELOPMENT

La tecnología se encuentra desarrollada a escala laboratorio.

Se han testado las eficacias de las endolisinas Poll-N y UK-C purificadas mediante experimentos de "spot test" frente a distintas cepas bacterianas. En la *Figura 1* (para Poll-N) y la *Figura 2* (para UK-C) se muestra la aparición de zonas de inhibición del crecimiento producidas por la lisis.

Los resultados obtenidos demuestran que tanto Poll-N como UK-C son capaces de lisar de forma directa a la mayoría (92,5% para Poll-N y 91,2 % para UK-C) de cepas de *E. coli* testadas (159 en total).

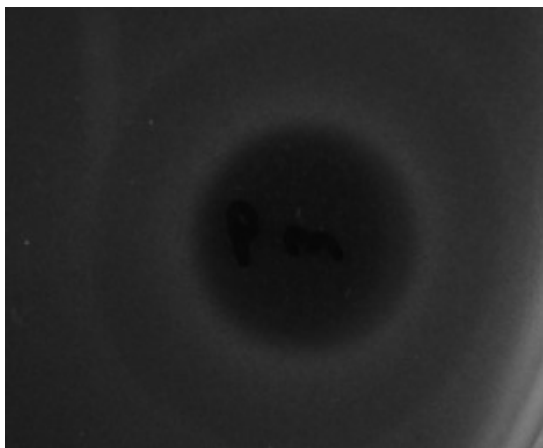


Figura 1. Resultado de un experimento de spot test realizado con Poll-N a una concentración de 16 µg/mL sobre una cepa de E. coli. El crecimiento bacteriano se observa como una capa gris sobre la superficie de la placa del medio de cultivo. La zona central oscura, donde se ha depositado la solución de la proteína, indica el efecto inhibitor del crecimiento producido por la endolisina.

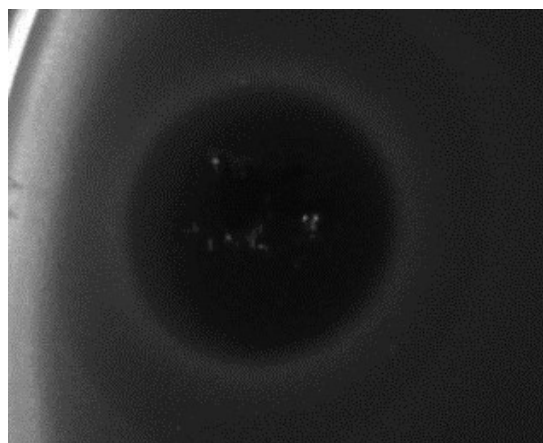


Figura 2. Resultado de un experimento de spot test realizado con UK-C a una concentración de 16 µg/mL sobre una cepa de E. coli. El crecimiento bacteriano se observa como una capa gris sobre la superficie de la placa del medio de cultivo. La zona central oscura, donde se ha depositado la solución de la proteína, indica el efecto inhibitor del crecimiento producido por la endolisina.

MARKET APPLICATIONS

La presente invención se encuadra en el campo general de la **ingeniería genética** y, en particular, se refiere a proteínas víricas que han sido modificadas mediante la adición de una cola policatiónica de aminoácidos en su extremo N-terminal o C-terminal, de tal forma que presentan actividad antibacteriana específica frente a E. coli sin necesidad de tratamientos previos de permeabilización de la envoltura.

Por tanto, los polipéptidos desarrollados pueden emplearse tanto como agentes antimicrobianos frente a E. coli (particularmente, en alimentos, cosméticos, aguas contaminadas con E. coli, etc.), así como en el tratamiento de enfermedades (infecciones) producidas por E. coli.

Esta tecnología tendría aplicación en empresas **biosanitarias, veterinarias, biotecnológicas o agroalimentarias** interesadas en aplicar tratamientos antimicrobianos alternativos a los antibióticos para controlar el crecimiento de E. coli.

COLLABORATION SOUGHT

Se buscan empresas interesadas en adquirir esta tecnología para su **explotación comercial** mediante:

- Acuerdos de licencia de la patente.
- Acuerdos de cooperación técnica (proyectos de I+D) para la utilización de la tecnología o aplicación en otros sectores.
- Acuerdos de subcontratación para asistencia técnica, formación, etc.

Tipo de empresa buscado:

- Empresas del **sector biotecnológico**.
- Empresas del **sector farmacológico**.

INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

Esta tecnología se encuentra protegida mediante **solicitud de patente**.

- Título de la patente: "Proteínas víricas con actividad antibacteriana frente a E. coli".
- Número de solicitud: P201930890.
- Fecha de solicitud: 10 de octubre de 2019.

MARKET APPLICATION (4)

Agroalimentación y Pesca
Biología Molecular y Biotecnología
Farmacéutica, Cosmética y Oftalmológica
Medicina y Salud