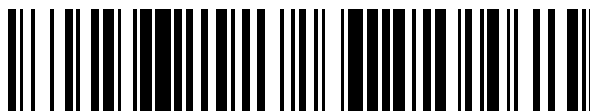


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 475 765**

51 Int. Cl.:

A23L 1/30 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

A61L 2/00 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2011** **E 11737894 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014** **EP 2595496**

54 Título: **Péptido antimicrobiano, formas ramificadas del mismo y su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas**

30 Prioridad:

23.07.2010 EP 10170639

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

11.07.2014

73 Titular/es:

SETLANCE S.R.L. (100.0%)
Via Florentina, 1
53100 Siena, IT

72 Inventor/es:

PINI, ALESSANDRO;
FALCIANI, CHIARA y
BRACCI, LUISA

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 475 765 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptido antimicrobiano, formas ramificadas del mismo y su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a un péptido con actividad antimicrobiana fuerte contra bacterias Gram negativas y Gram positivas y cepas de *Candida*, con todos los aminoácidos de la secuencia peptídica que están en configuración D. El péptido es particularmente resistente a la proteólisis cuando se sintetizan en la forma tetra ramificada donde

10 secuencias peptídicas idénticas se unen entre sí por un andamiaje molecular apropiado. Esta forma hace al péptido particularmente adecuado para aplicaciones clínicas.

Antecedentes de la técnica

15 La emergencia cada vez mayor de bacterias resistentes a multifármacos es un asunto global, en general en aquellos países donde los antibióticos se usan ampliamente en clínicas. Un número de patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, algunos enterococos, *Pseudomonas aeruginosa* y muchas otras bacterias desarrollan resistencia contra los antibióticos más tradicionales así como también contra aquellos de nueva generación (Wenzel y Edmond 2000). Por lo tanto se vuelve cada vez más importante desarrollar nuevos

20 antibióticos. Esta demanda insta a la comunidad de investigadores y a las compañías farmacéuticas a considerar agentes antimicrobianos nuevos. Los péptidos antimicrobianos se consideran unas de las mejores alternativas para antibióticos tradicionales que generalmente causan la selección de bacterias resistentes (Hancock y Sahl, 2006). Los péptidos más antimicrobianos son componentes de la inmunidad innata de los animales, que incluyen humanos, plantas y hongos (Zaslhoff, 2002). Usualmente ellos consisten de 6-50 residuos aminoácidos y tienen una carga neta positiva.

25 Los péptidos catiónicos interactúan selectivamente con membranas bacterianas aniónicas y con otras estructuras cargadas negativamente tales como LPS y ADN. Las membranas eucarióticas, en su capa externa, normalmente se cargan menos negativamente que la de las bacterias, y, de forma diferente a la membrana bacteriana, ellas además se estabilizan por moléculas de colesterol. Estas diferencias son la base de la especificidad de los péptidos catiónicos. El mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos catiónicos se debe por consiguiente a su aglutinación específica a

30 las membranas bacterianas, que provoca la permeación celular y, en algunos casos, la inhibición de las vías metabólicas.

Muchos estudios después, dirigidos a la identificación y caracterización de secuencias peptídicas antimicrobianas mediante el estudio de su mecanismo de acción, su toxicidad para células eucarióticas y su eficacia terapéutica cuando se administran en forma tópica o en forma sistémica. Desafortunadamente, hasta ahora dos problemas principales

35 dificultaron el desarrollo de fármacos peptídicos antimicrobianos. El primero es que la selectividad de los péptidos antimicrobianos naturales es generalmente demasiado baja para bacterias y ellos parecen ser muy tóxicos para células eucarióticas, particularmente eritrocitos, lo que genera un alto nivel de hemólisis. El segundo se relaciona a la vida media generalmente corta de los péptidos in vivo. Estas son las razones principales por las que solo pocos péptidos catiónicos alcanzaron el mercado en los últimos 10 años (la polymixina y la daptomicina son ejemplos exitosos).

40

Hace pocos años, los investigadores comenzaron a concentrarse en la identificación de secuencias peptídicas novedosas de origen no natural, seleccionadas en el laboratorio mediante diseño racional o tamizaje de librerías combinatoriales. La intención fue encontrar péptidos con mejores propiedades biológicas en términos de toxicidad

45 general y especificidad para bacterias y vida media mejorada para el desarrollo de fármacos.

En el laboratorio de los inventores, se identificaron las secuencias peptídicas no naturales, las que mostraron una actividad antimicrobiana fuerte especialmente contra bacterias Gram negativas (Pini y otros, 2005; Pini y otros, 2007; Pini y otros, 2010). La última versión mejorada de estos péptidos se llamó M33 (secuencia KKIRVRLSA; documento WO 2010/038220 A1) y se probó in vitro para su capacidad de neutralizar LPS bacteriano e in vivo para su actividad

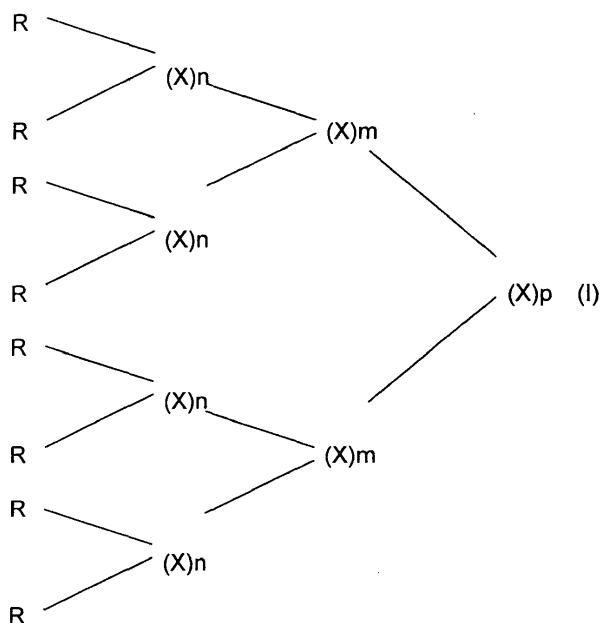
50 antibacteriana y antiinflamatoria en sepsis de modelos animales (Pini y otros, 2010). El péptido M33 pareció selectivo para bacterias Gram negativas con una ligera actividad contra solo dos cepas del *Staphylococcus aureus* Gram positivo. El péptido M33 se usó y describió en Pini y otros, 2010 y en WO2010/038220A1 siempre con aminoácidos en configuración L (L-M33). Sorprendentemente, la síntesis de la misma secuencia peptídica con todos los aminoácidos en configuración D (D-M33) produjo no solo una mejor actividad para algunas bacterias Gram negativas sino además una fuerte actividad contra un panel de bacterias Gram positivas y hongos para los que el L-M33 no fue activo para nada. Este resultado es completamente inesperado, en que la sustitución de L aminoácido con su configuración D se conoce que incrementan la estabilidad peptídica pero el efecto en la selectividad no fue predecible.

55

60 Descripción de la invención

Es un objetivo de la presente invención la secuencia peptídica KKIRVRLSA caracterizado porque todos los aminoácidos están en configuración D (de aquí en adelante referido como D-M33), ya sea en la forma lineal (es decir monomérica) o multimerizada (es decir dendrímica o ramificada) en un esqueleto de poliacrilamida, en un esqueleto de unidades de

dextrano o en un esqueleto de unidades de etilenglicol, o, preferentemente, en un andamiaje que sigue la Fórmula general (I)

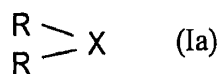


5

en la cual R es el péptido reivindicado en la reivindicación 1 y descrito anteriormente; X es al menos una molécula bifuncional (en configuración R o S si es asimétrica), y:

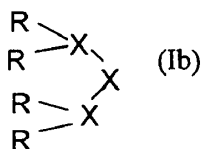
10

$m=n=0$ y $p=1$, donde el péptido es un dímero de la Fórmula (Ia);

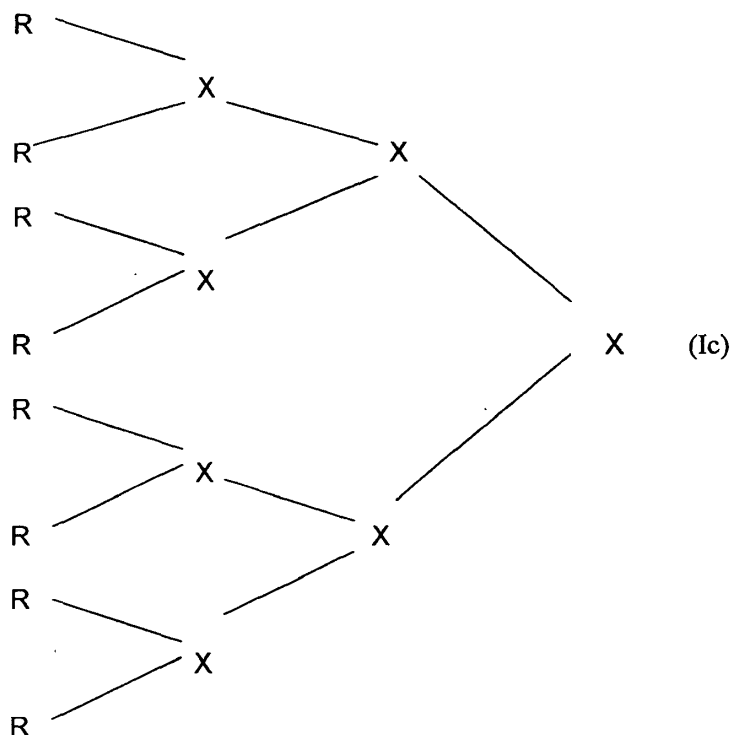


15

o $m=1$, $p=1$ y $n=0$, donde el péptido es un tetrámero de la Fórmula (Ib);



o $m=n=p=1$, donde el péptido es un octámero de la Fórmula (Ic).



5 El grupo X comprende preferentemente al menos dos grupos amino funcionales, los que preferentemente se suministran por diaminoácidos tales como ornitina, norlisina, aminoalanina o ácido diaminopropiónico, ya sean solos o unidos a residuos aminoácídicos diferentes por un enlace peptídico, particularmente β -ala.

10 Alternativamente, el grupo X se selecciona de un grupo que consiste de ácido aspártico, propilenglicol, ácido succínico, un diisocianato, o N,N-bis(3-aminopropilo)-glicina (BAPG) u otra poliamina dendrimerica o moléculas poliacídicas.

Los andamiajes basados en poliamina dendrimerica de acuerdo con la invención pueden prepararse al seguir los procedimientos descritos en Tam, 1988; Tam y otros, 2002, Falciani y otros, 2005; Stasko y Schoenfisch, 2006; Rudovský y otros, 2006, los que se incorporan en la presente invención como referencia.

15 Es un objetivo adicional de la invención el péptido como se describe anteriormente para uso médico, preferentemente como un medicamento antibacteriano.

20 Es un objetivo adicional de la invención una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente aceptable y eficaz del péptido como se describe anteriormente. La composición puede estar en la forma de una solución inyectable para administración sistémica, preferentemente en la forma de una solución inyectable para usar como agente desintoxicante para la neutralización de LPS, aún preferentemente en la forma de colirio, enjuague bucal, ungüento, aerosol, o solución para administración tópica.

25 Es un objetivo adicional de la invención un preparado desinfectante y/o detergente con actividad antibacteriana que comprende el péptido de la invención.

Es un objetivo adicional de la invención el uso del péptido de la invención como un conservante para la preparación de productos alimenticios y/o de productos cosméticos y/o de productos homeopáticos.

30 Es otro objetivo de la presente invención el uso de tal péptido como agente antimicrobiano para aplicaciones médicas, veterinarias y agronómicas.

35 El péptido de la invención es ventajoso en comparación con los péptidos M6 o L-M33 ya descritos, en EP 1 789 436 B1 y en documento WO 2010/038220 A1, respectivamente, por su mejor eficacia contra Gram negativas y especialmente por su actividad contra bacterias Gram positivas como se muestra en las siguientes tablas. Esta característica crucial, junto con su actividad antimicrobiana muy esperanzadora, hace al péptido D-M33 un candidato óptimo para el desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram positivas.

40 La invención se describirá ahora mediante ejemplos no limitantes con referencia a las siguientes figuras:

FIGURA 1

Fórmula del péptido (L o D) M33 tetra ramificado donde los grupos amino funcionales son aminoácidos lisina.

5 FIGURA 2

10 Efecto de L-M33, D-M33 tetra ramificados e Indolicidina monomérica en la hemólisis de eritrocitos humanos. Las figuras muestran la actividad hemolítica de los tres péptidos en eritrocitos humanos evaluada por medio de la resistencia osmótica del eritrocito del método Parpart en NaCl. El porcentaje de hemólisis se calcula por medio de una curva de calibración obtenida mediante la incubación de eritrocitos con incrementos en las concentraciones de NaCl. Luego de 30 min de incubación, L-M33 y D-M33 (a la máxima concentración probada) solo presentaron una actividad hemolítica débil (<5%). El péptido antimicrobiano natural Indolicidina pareció más hemolítico. El porcentaje de hemólisis de sangre no tratada luego de 19 horas (control) es muy limitado (< 1%).

15 FIGURA 3

Perfil de HPLC del péptido tetra ramificado D-M33 incubado en suero humano a 0 h (Fig. 3A) y 24 h (Fig. 3B). El tiempo de retención de D-M33 se indica por una flecha.

20 FIGURA 4

25 Actividad antibacteriana in vivo del péptido D-M33 tetra ramificado. Los ratones Balb-c (20 g) se inyectaron de forma intraperitoneal con una cantidad letal de células TG1 de *E. coli* (1×10^9 ufc). La línea continua (Ctr) indica los ratones inyectados solo i.p. con bacterias y no con D-M33. La línea irregular indica los ratones inyectados i.p. con bacterias y una inyección sencilla de péptido D-M33 10 mg/Kg 1 hora más tarde.

$$P < 0.05.$$

30 FIGURA 5

35 Actividad antibacteriana in vivo del péptido D-M33 tetra ramificado. Los ratones Balb-c (20 g) se inyectaron de forma intraperitoneal con una cantidad letal de células USA 300 de *S. aureus* (5×10^6 ufc) mezcladas en una solución de mucina 7%. La línea control (Ctr) indica los ratones inyectados i.p. solo con bacterias y no con D-M33. La línea D-M33 indica los ratones inyectados i.p. con bacterias y una inyección sencilla de péptido D-M33 25 mg/Kg 1 hora más tarde. $P < 0.05$.

FIGURA 6

40 Perfiles de HPLC de péptidos tetra ramificados L-M33 (A) y D-M33 (B) luego de la incubación con la proteasa Aureolisina derivada de *S. aureus*. L-M33 parece degradarse luego de solo 1 hora de incubación con la enzima (ver picos resaltados en A). D-M33 no mostró degradación luego de 24 horas de incubación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 *Síntesis del péptido*

50 El péptido monomérico se sintetizó como amida peptídica mediante un sintetizador automático (MultiSynTech, Witten, Alemania) en una resina Rink Amide MBHA (Nova Biochem) con el uso de la sustancia química 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) y la activación de O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato/1,3-diisopropiletilamina. Las moléculas de péptido ramificadas (MAPs) se sintetizaron en resina Wang Fmoc₄-lys₂-lys-βala. Los grupos de protección de cadena lateral fueron tritilo para Gln, ter-butoxicarbonilo para Lys, 2,2,4,6,7-pentametilidihidrobenzofurano-5-sulfonilo para Arg, y ter-butilo éter para Ser. Los péptidos se clivaron después de la resina y desprotegieron con ácido trifluoroacético que contiene agua y triisopropilsilano (95/2.5/2.5). Los péptidos crudos se purificaron mediante cromatografía de fase reversa en una columna Vydac C18. El intercambio de contra ión TFAcetato-acetato se realiza en una resina de intercambio iónico (AG1-X8 acetato, Biorad) y los péptidos se liofilizan y aíslan como péptido CH₃COO⁻. La identidad y pureza de los productos finales se confirmó mediante espectrometría de masa (MS) MALDI-TOF Ettan™ (Amersham Biosciences).

60 La estructura de un péptido M33 tetra ramificado como se describe anteriormente se reporta en la Figura 1.

Actividad antibacteriana de péptidos tetra ramificados

65 La concentración inhibidora mínima (MIC) se determinó mediante un ensayo de microdilución estándar como se recomienda por el Comité Nacional para Entándares de Laboratorios Clínicos (NCCLS) con el uso de caldo de cultivo Mueller-Hinton (MH) suplementado con catión (Oxoid Ltd. Basingstoke, UK) y un inóculo bacteriano de 5×10^4 ufc por

pocillo, en un volumen final de 100 µl. Los resultados se registraron mediante inspección visual luego de 24 h de incubación a 37°C.

Los péptidos MICs se determinaron contra cepas de especies bacterianas diversas, que incluyen patógenos Gram negativos y Gram positivos (Tabla 1 y 2). La actividad de D-M33 tetra ramificado se mantuvo contra cepas MDR con varios mecanismos de resistencia (tales como beta lactamasas de amplio espectro y carbapenemasas), que incluyen cepas MDR de *P. aeruginosa* de pacientes con CF. La actividad antimicrobiana de D-M33 tetra ramificado pareció ligeramente mejor con respecto al L-M33 tetra ramificado para cepas MDR de *Pseudomonas* y una cepa de *Klebsiella* y sensiblemente mejor respecto a L-M33 tetra ramificado para las dos cepas de *Staphylococcus aureus* reportadas en

Tabla 1.

Tabla 1

Especies de bacteria y cepas	Características y resistencias	L-M33 (µM)	D-M33 (µM)
<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	cepa de referencia	1.5	0.7
<i>P. aeruginosa</i> VenM rugosa 05/04/2005^	FQ ^r AG ^r ESC ^r NEM ^r	3	0.7
<i>P. aeruginosa</i> OGB6-1^	FQ ^r AG ^r ESC ^r NEM ^r (MBL/IMP-13)	1.5	0.7
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13833	cepa de referencia	1.5	0.7
<i>Klebsiella pneumoniae</i> FIPP	FQ ^r AG ^r ESC ^r NEM ^r (KPC-3)	1.5	3
<i>E.coli</i> ATCC 25922*	cepa de referencia	1.5	1.5
<i>E.coli</i> W03BG0025*	FQ ^r AG ^r ESC ^r (ESBL/CTX-M-15)	0.7	1.5
<i>Enterobacter cloacae</i> W03AN0041	ESC ^r (ESBL/SHV-12)	0.7	3
<i>Acinotobacter baumannii</i> RUH 134	Cepa de Referencia, Clon europeo II	1.5	3
<i>Acinotobacter baumannii</i> RUH 875	Cepa de Referencia, Clon europeo II	1.5	3
<i>Staphylococcus aureus</i> MU 50 ATCC 700699	Cepa de Referencia, resistente a vancomicina	6	3
<i>Staphylococcus aureus</i> 3851	Vancomicina intermedia	6	0.7

Las cepas probadas incluyeron ya sean cepas de referencia (indicadas) o aislados clínicos (en general que muestran un fenotipo MDR); los rasgos de resistencia relevantes y los mecanismos de resistencia se indican: FQ^r, resistente a fluoroquinolonas; AG^r, resistente a aminoglicósidos (gentamicina, amikacina, y/o tobramicina); ESC^r, resistente a cefalosporinas de amplio espectro; NEM^r, resistencia a carbapenemos (imipenemo y/o meropenemo), ESBL, β-lactamasa de amplio espectro; MBL, metalo-β-lactamasa

^Aislados clínicos de pacientes con Fibrosis Quística

La concentración inhibidora mínima de D-M33 tetra ramificado se probó por consiguiente contra un panel de bacterias Gram positivas y hongos para los que el L-M33 tetra ramificado no fue activo a concentraciones por debajo de 24 µM (Tabla 2). Sorprendentemente, el D-M33 tetra ramificado es activo contra todos los microorganismos probados, con la mejor eficacia (0.35 µM) para las cepas de *S. epidermidis* y una cepa de *S. capitis*. La MIC de 0.35 µM nunca se reportó para L-M33 tetra ramificado contra bacterias Gram negativas.

Tabla 2

Especies de bacteria y cepas	Características y resistencias	MIC D-M33 (µM)
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	cepa de referencia	6
<i>S. pneumoniae</i> 47C12	aislado clínico, no resistente	12
<i>S. pneumoniae</i> 47D22	aislado clínico, resistente a macrólidos, tetraciclina, cotrimosazol	6
<i>S. agalactiae</i> ATCC	cepa de referencia	1.5

Especies de bacteria y cepas	Características y resistencias	MIC D-M33 (µM)
13813		
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	cepa de referencia	0.35
<i>S. epidermidis</i> 4761/1	aislado clínico, no resistente	0.35
<i>S. epidermidis</i> 6154	aislado clínico, no resistente	0.35
<i>S. capitis</i> ATCC 27840	cepa de referencia	0.35
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	cepa de referencia	3
<i>S. aureus</i> 3851	aislado clínico, resistente intermedio a vancomicina	1.5
<i>S. aureus</i> Fi-Fran	aislado clínico, no resistente	1.5
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	cepa de referencia	0.7
<i>E. faecalis</i> FI74B4 VSE	aislado clínico, no resistente	0.7
<i>E. faecium</i> FI81B1 VRE	aislado clínico, resistente a vancomicina	0.7
<i>E. faecium</i> FI81B2 VSE	aislado clínico, no resistente	0.7
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	cepa de referencia	12
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	cepa de referencia	1.5
<i>C. albicans</i> 9833	aislado clínico, resistente al itraconazol	24
<i>C. tropicalis</i> 6597	aislado clínico, resistente al flucanazol, itraconazol, voriconazol y 5'-fluorocitosina	12
<i>C. krusei</i> A TCC 6268	cepa de referencia	6

Actividad hemolítica del péptido D-M33 tetra ramificado

La hemólisis de eritrocitos humanos frescos se determinó con el uso del método de Parpat, que se resume como sigue. Se elaboró una curva de calibración mediante la suspensión de eritrocitos humanos frescos en amortiguador fosfato (pH 7.4, fosfato sódico 110 mM) con varias concentraciones de NaCl e incubó por 30 min a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 500 × g por 5 minutos, y la hemoglobina liberada se controló mediante la medición de la absorbancia de los sobrenadantes a 540 nm. La absorbancia obtenida con 0.1% NaCl correspondió a 100% de lisis y con 1% NaCl, a 0% lisis. Los péptidos disueltos en PBS se añadieron a la solución de eritrocitos humanos a concentraciones diversas. La suspensión resultante se incubó de forma separada a 37°C por 2 h y 24 h. La liberación de la hemoglobina se controló mediante la medición de la absorbancia del sobrenadante a 540 nm luego de la centrifugación y el porcentaje de hemólisis se calculó con el uso de la curva de calibración.

Una característica muy importante es que, contrario a los péptidos más anticobianos descritos hasta ahora, el D-M33 tetra ramificado muestra un insignificante grado de hemólisis (Fig. 2), que sugiere su posible uso además a través de administraciones sistémicas.

Estabilidad del péptido

Se incubaron 8 µl de una solución de péptidos 1-mg/ml a 37°C con 20 µl de suero humano (Fig. 3) o plasma. Muestras retiradas a tiempo 0 (Fig. 3A) y después de 24 h (Fig. 3B) se precipitaron con 200 µl de metanol, centrifugaron por 1 min a 10 000 g y diluyeron con 800 µl de 0.1% TFA en agua. Estas soluciones se analizaron por HPLC usando una columna C18. Los controles para el tiempo de retención peptídico en la mezcla cruda se obtuvieron mediante la adición de la misma concentración de péptidos tetra ramificados a sobrenadantes de plasma o suero tratados con metanol y centrifugados como anteriormente, corriendo la mezcla inmediatamente. El análisis por MS del sobrenadante de las soluciones crudas se realizó en un espectrómetro de masa MALDI TOF ETTAN. Los resultados se reportaron en la Figura 3.

Actividad antibacteriana in vivo

El péptido D-M33 tetra ramificado se analizó para su actividad antibacteriana en ratones infectados con cantidades letales de la bacteria Gram negativa *E. coli* o la bacteria Gram positiva *S. aureus*.

El número más pequeño causante de infección letal del 100% (LD100) luego de la inyección intraperitoneal (i.p.) fue 1.5×10^9 con *E. coli* y 5×10^6 con *S. aureus*. La LD100 bacteriana mató a los ratones en 15-24 horas. Los ratones Balb-c se infectaron con la LD100 de bacteria y trataron 1 hora más tarde por administración i.p. con el péptido.

Siguiente a la infección con bacteria, el D-M33 protegió de señales de sepsis y muerte (sobrevivencia de 7 días) al 100% de los animales cuando se administró en una dosis sencilla a una concentración de 10 mg/Kg para *E. coli* (Fig. 4) y 25 mg/Kg para *S. aureus* (Fig. 5). El D-M33 no produjo señales aparentes de toxicidad en animales tratados i.p. con una dosis de péptido de 100 mg/Kg (no mostrado), 10 veces la dosis reportada en la Figura 4 y 4 veces la dosis de la Fig. 5.

Estabilidad del péptido a proteasas bacterianas

El D-M33 demostró ser más estable a proteasas bacterianas que el L-M33. La Figura 6 muestra la incubación de ambos péptidos con la proteasa Aureolisina de *S. aureus*, la que parece particularmente activa contra L-M33 e inactiva contra D-M33 dentro de 24 horas.

Bibliografía

- Bracci L, y otros, 2003, J Biol Chem, 278: 46590-5
 Cornaglia G, y otros, 2000, Clin Infect Dis, 31: 1119-25
 Falciani C y otros, 2005, Chem Biol, 69:216-21
 Falciani C, y otros, 2007, Chem Biol Drug Des, 69: 216-21
 Hancock RE y Sahl HG, 2006, Nat Biotechnol 24: 1551-7
 Pini A, y otros, 2005, Antimicrob Agents Chemother, 49: 2665-72
 Pini A, y otros, 2007, J Pept Sci, 13:393-9
 Pini A y otros, 2010, FASEB J. 24:1015-1022
 Stasko NA y Schoenfisch MH, 2006, J Am Chem Soc, 28:8265-71
 Tam JP, 1988, Proc Natl Acad Sci, 85:5409-13
 Tam JP y otros, 2002, Eur J Biochem, 269:923-32
 Wenzel RP y Edmond MB, 2000, N Engl J Med 343:1961-3
 Zasloff M. 2002, Nature, 415:389-95
 Rudovský J y otros, 2006, Bioconjug Chem, 17:975-87.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> SETLANCE S.R.L.

<120> Péptido antimicrobiano, formas ramificadas del mismo y su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas

<130> 1350PCT

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> péptido artificial

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

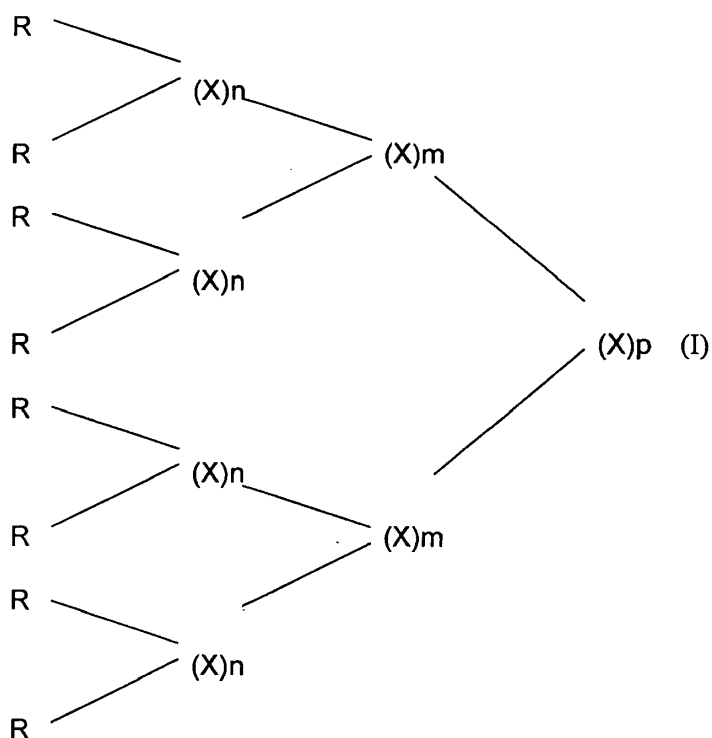
<223> aminoácidos en configuración D

<400> 1

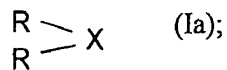
Lys Lys Ile Arg Val Arg Leu Ser Ala
 1 5

REIVINDICACIONES

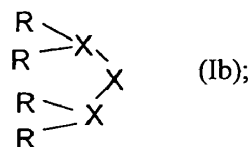
1. Un péptido antibacteriano que consiste de la secuencia de aminoácidos KKIRVRLSA, **caracterizado porque** todos los aminoácidos están en configuración D.
- 5 2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, dicho péptido que está en la forma de péptido lineal.
3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, dicho péptido está multimerizado en un esqueleto de poliacrilamida, en un esqueleto de unidades de dextrano o en un esqueleto de unidades de etilenglicol.
- 10 4. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, dicho péptido está multimerizado en un andamiaje que tiene la siguiente Fórmula (I)



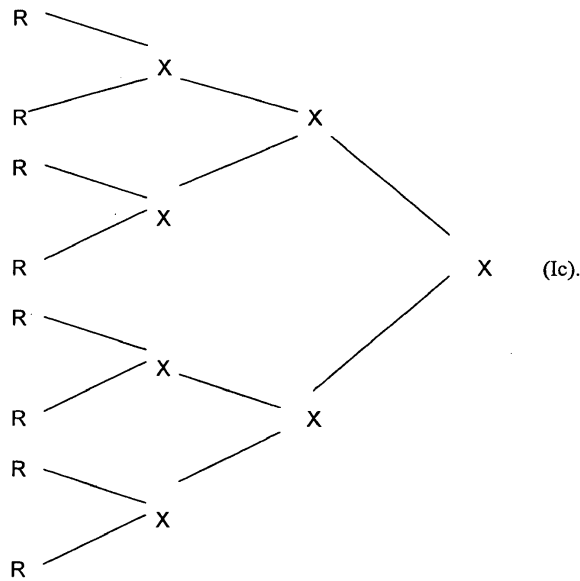
en la cual R es el péptido reivindicado en la reivindicación 1; X es al menos una molécula bifuncional, y:
 $m=n=0$ y $p=1$, donde el péptido es un dímero de la Fórmula (Ia)



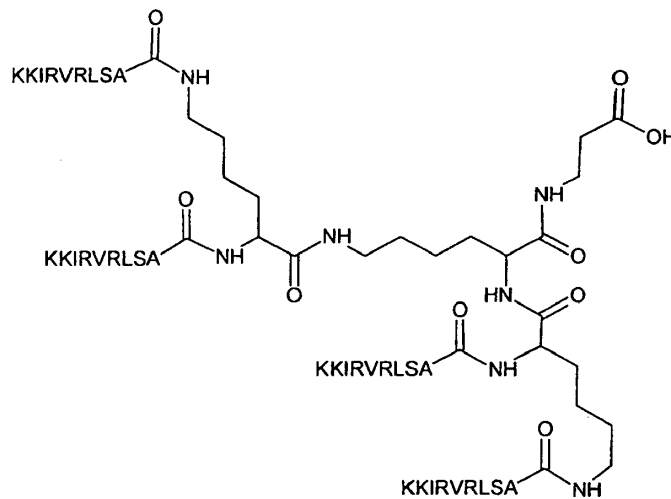
o
 $m=1$, $p=1$ y $n=0$, donde el péptido es un tetrámero de la Fórmula (Ib)



o
 $m=n=p=1$, donde el péptido es un octámero de la Fórmula (Ic)



- 5 5. El péptido multimerizado de acuerdo con la reivindicación 4, en donde X comprende al menos dos grupos amino funcionales.
6. El péptido de acuerdo con la reivindicación 5, en donde X es un aminoácido seleccionado de lisina, ornitina, norlisina, amino alanina o ácido diaminopropiónico, o un dipéptido que contiene uno de estos aminoácidos.
- 10 7. El péptido de acuerdo con reivindicación 6, en donde dicho péptido se representa por la siguiente fórmula química:



- 15 8. El péptido multimerizado de acuerdo con la reivindicación 4, en donde X se selecciona de ácido aspártico, ácido glutámico, propilenglicol, ácido succínico, un diisocianato, N,N-bis(3-aminopropilo)-glicina (BAPG).
- 20 9. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso médico.
10. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores como un fármaco antibacteriano.
- 25 11. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para usar en el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias Gram positivas.

- 5
- 10
- 12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1-8.
 - 13. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en la forma de solución inyectable para la administración sistémica, o en la forma de colirio, enjuague bucal, ungüento, o solución para administración tópica.
 - 14. Un preparado desinfectante y/o detergente con actividad antibacteriana que comprende al péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8.
 - 15. Uso del péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 como un conservante para alimento, cosmético o productos homeopáticos.

FIGURA 1

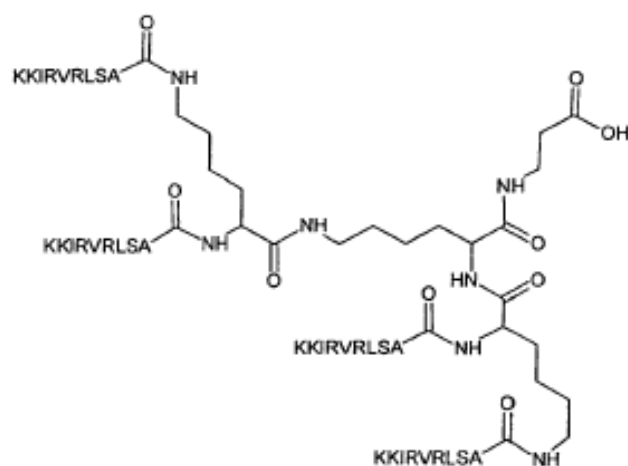


FIGURA 2

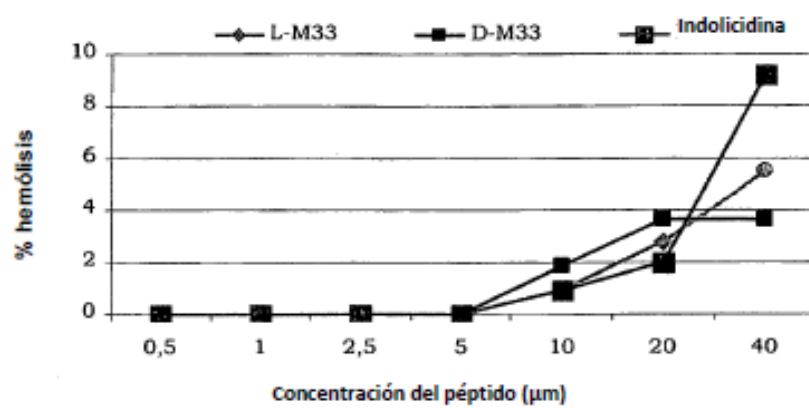


FIGURA 3

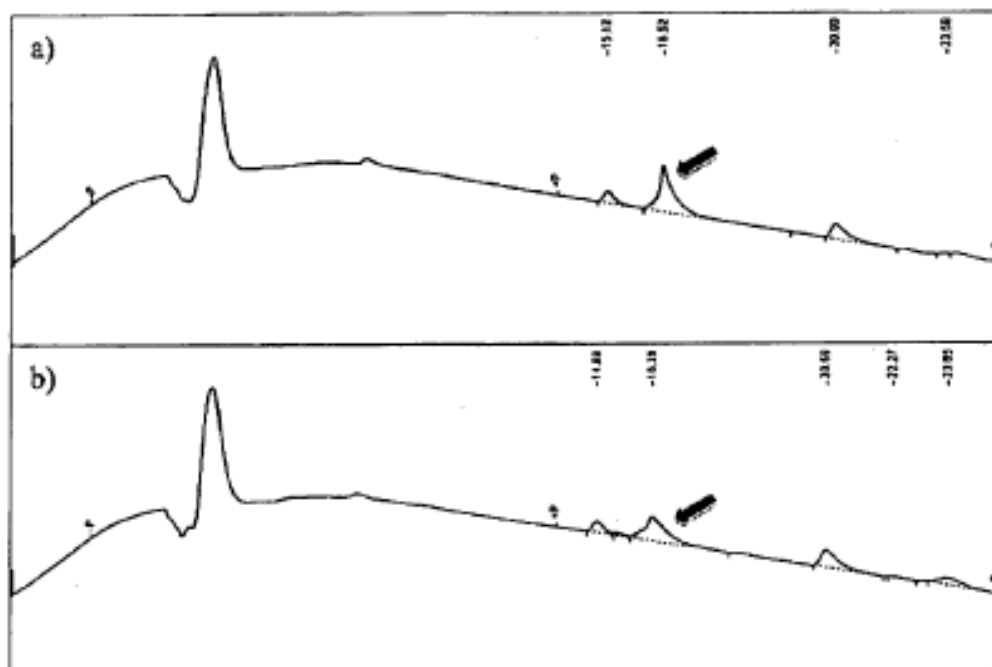


FIGURA 4

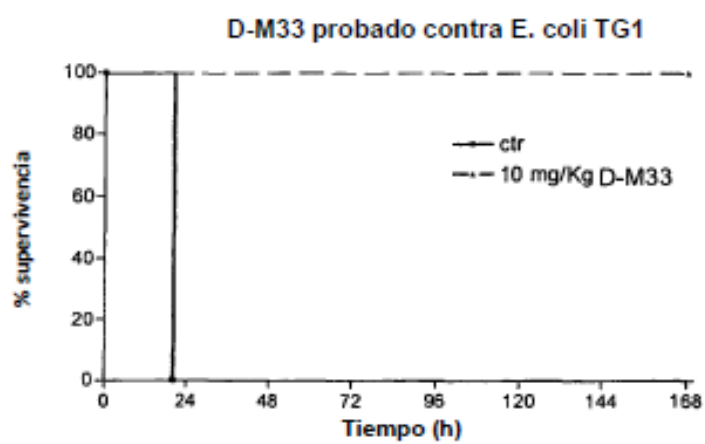


FIGURA 5

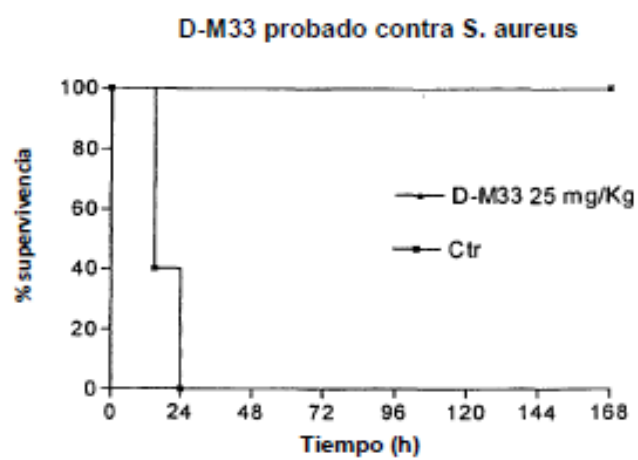


FIGURA 6

