

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 860**

51 Int. Cl.:

C07K 1/06

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2012 PCT/CN2012/000079**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012 WO12142855**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2012 E 12774269 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2735570**

54 Título: **Péptido antibiótico y método de su preparación, y aplicación del mismo**

30 Prioridad:

18.04.2011 CN 201110095737

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

04.04.2018

73 Titular/es:

**JIANGSU PROTELIGHT PHARMACEUTICAL & BIOTECHNOLOGY CO., LTD (50.0%)
CHEN, Mingxia D2, 6 Dongsheng West Road
Jiangyin, Jiangsu 214437, CN y
CHEN, YUXIN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHEN, YUXIN;
CHEN, MINGXIA;
HUANG, YIBING;
LI, YANG;
WANG, YONG;
QU, LILI y
WANG, WENREN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 661 860 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 antibiótico y método de su preparación, y aplicación del mismo

5 **Campo tecnológico**

La presente invención pertenece al campo de la tecnología de los polipéptidos, en especial, se refiere a un nuevo péptido antimicrobiano.

10 **Técnica anterior**

El antibiótico, el medicamento que es resistente a los microorganismos patógenos, es la principal clase de medicamentos antibacterianos y antiinflamatorios. Los antibióticos, la sustancia producida por las bacterias, los hongos u otros microorganismos en su vida, con la capacidad de inhibir o matar microorganismos patógenos como bacterias, hongos, espiroquetas, micoplasmas y clamidias, pueden curar enfermedades. Otros antibióticos son tratamientos para tumores malignos. Se aplican fármacos antibióticos con numerosas variedades ampliamente a diferentes tipos de enfermedades infecciosas. El extenso uso clínico de los antibióticos clásicos ha conducido a la aparición creciente de muchas cepas resistentes de bacterias de relevancia médica. Además, solo se han introducido tres nuevas clases estructurales de antibióticos (la oxazolidinona, la linezolidina, las estreptograminas y el lipopéptido-daptomicina) en la práctica médica en los últimos 40 años. Por lo tanto, el desarrollo de una nueva clase de antibióticos tiene una gran importancia. Los péptidos antimicrobianos catiónicos podrían representar una nueva clase de antibióticos. Aunque no se ha establecido por completo el modo exacto de acción de los péptidos antimicrobianos catiónicos, todos los péptidos anfipáticos catiónicos interactúan con las membranas, y la membrana citoplasmática es la diana principal de los péptidos antimicrobianos, donde la acumulación de péptidos antimicrobianos en la membrana puede causar una mayor permeabilidad y pérdida de la función de barrera. Por lo tanto, resulta casi imposible desarrollar resistencia a estos péptidos con actividad en la membrana, porque esto requeriría cambios sustanciales en la composición lipídica de las membranas celulares de los microorganismos.

Dos clases principales de los péptidos antimicrobianos catiónicos son los péptidos α -helicoidales y de lámina β . La clase de lámina β incluye péptidos cíclicos restringidos en esta configuración por enlaces disulfuro intramoleculares, por ejemplo, defensinas y protegrinas, o por un enlace covalente en sentido N-terminal a C-terminal, por ejemplo, gramicidina S y tirocidinas. A diferencia de los péptidos de lámina β , los péptidos α -helicoidales son moléculas más lineales que existen principalmente como estructuras desordenadas en medios acuosos y se convierten en hélices anfipáticas tras la interacción con las membranas hidrófobas, por ejemplo, cecropinas, magaininas y melittinas.

Hoy en día, la mayoría de los péptidos antimicrobianos descubiertos se purifican directamente de organismos. Los ejemplos como Magainina de la epidermis del sapo y Melittina del cuerpo de la abeja, todos consisten en aminoácidos L.

Los péptidos antimicrobianos obtenidos directamente de organismos son exclusivos de otros organismos, por lo tanto, difícilmente se pueden aplicar a los seres humanos. En concreto, esta clase de péptidos antimicrobianos es muy perjudicial para los seres humanos. Muchos de los péptidos antimicrobianos no pueden convertirse en fármacos debido a esta toxicidad. Además, algunos péptidos que consisten en aminoácidos L son susceptibles de ser hidrolizados para perder actividad por la proteasa, por lo que su eficacia se ve gravemente restringida. S. C. Park *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1778 (2008), pág. 229-241, desvelan el péptido antimicrobiano HP (2-29) y sus análogos derivados de *Helicobacter pylori*.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un péptido antimicrobiano con Ac-Phe-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Ser-Lys-Leu-Trp-Asn-Trp-Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 1). Preferentemente, dicho péptido antimicrobiano en el que Trp de la secuencia de aminoácidos está sustituido por Leu. Preferentemente, dicho péptido antimicrobiano que comprende enantiómeros L completos y enantiómeros D completos. Un método de síntesis de péptidos en fase sólida para sintetizar dicho péptido antimicrobiano del método tecnológico anterior incluye las siguientes etapas:

- 1) tomar resina de amidas, aminoácido protegido con Fmoc, reactivo de acoplamiento y álcali orgánico como materias primas iniciales; el conjugado de resina amida-aminoácido protegido con Fmoc se prepara en disolvente orgánico protegido.
- 2) Se utiliza el método en fase sólida para acoplar aminoácidos conectados secuencialmente que comprendan grupos protectores uno por uno, y se sintetiza el péptido lineal con su cadena lateral totalmente protegida.
- 3) Se conecta el último aminoácido del extremo N del péptido a la resina y se retiran los grupos protectores Fmoc, y se lleva a cabo la modificación química adecuada.
- 4) Se añade reactivo de cizalla para separar el péptido de la resina, y, tras la liofilización al vacío, se genera un péptido en bruto.

Preferentemente, ese péptido purificado se prepara en una columna de cromatografía de fase inversa C₄, C₈ o C₁₈ usando un gradiente AB lineal de HPLC a un caudal de 0,5-5 ml/min, en el que la fase móvil A es TFA acuoso del 0,01 al 0,5 % y B es TFA del 0,01 al 0,5 % en acetonitrilo.

5 Más preferentemente, la pureza del péptido se verifica mediante RP-HPLC analítica como se describe a continuación: las series se realizan en una columna C₄, C₈ o C₁₈ usando un gradiente AB y un caudal de 0,1-5 ml/min, en el que la fase móvil A es TFA acuoso del 0,01 al 0,5 % y B es TFA del 0,01 al 0,5 % en acetonitrilo.

10 Los péptidos antimicrobianos de la invención se pueden aplicar para preparar una composición terapéutica para inhibir la infección microbiana tal como agentes antibacterianos. Si se prepara en agentes antibacterianos, en este caso, el intervalo de dosis de péptido antimicrobiano en dicho agente antibacteriano es: de 0,1 a 50 mg/kg en inyección, de 0,1 a 50 mg/kg en líquido oral, 1/10.000 - 10 %/porción de agentes aplicados externamente, 1/10.000 - 10 %/porción de gotas para los ojos, y 1/10.000 - 1 %/porción de loción.

15 Los péptidos antimicrobianos de la invención tienen potentes actividades antimicrobianas y son útiles contra bacterias, hongos, virus y protozoos. En general, los péptidos son eficaces en el contexto de cualquier organismo que tenga un componente celular o estructural de una membrana de bicapa lipídica. Estos péptidos son compuestos eficaces para su uso en medicina humana y/o veterinaria, o como agentes en aplicaciones agrícolas, de ciencia alimentaria o industriales.

20 A partir de numerosos estudios de estructura y eficacia sobre péptidos antimicrobianos tanto naturales como sintéticos, los presentes inventores descubrieron que algunas características físicas son vitales para la actividad antimicrobiana. Estas características incluyen el número de carga adecuado en valores de pH suaves, la presencia de residuos hidrófobos y alcalinos, una naturaleza anfipática que segrega restos básicos e hidrófobos, y una estructura secundaria inducible o preformada (α -helicoidal o lámina β).

25 La presente invención proporciona un péptido antimicrobiano con una secuencia de aminoácidos Ac-Phe(F)-Lys(K)-Lys(K)-Leu(L)-Lys(K)-Lys(K)-Leu(L)-Phe(F)-Ser(S)-Lys(K)-Leu(L)-Trp(W)-Asn(N)-Trp(T)-Lys(K)-NH₂ (SEQ ID NO: 1).

30 La presente solicitud también desvela un método de tratamiento de infecciones microbianas que comprende administrar al paciente un compuesto peptídico antimicrobiano de la invención. En la práctica clínica, las infecciones microbianas implican infecciones causadas por uno o más patógenos como una bacteria, un virus, un hongo o un protozoo, por ejemplo, infección causada por dos tipos diferentes de bacterias, etcétera. Sin embargo, el ensayo clínico es para el proceso de infección y determinación del plan terapéutico, que es relativamente laborioso. La presente invención está destinada a tratar infecciones causadas por patógenos complicados y resistentes a fármacos mediante un tipo de administración (péptidos antimicrobianos).

40 La presente divulgación sintetiza PL-13 y análogos peptídicos con la tecnología de diseño de péptidos *de novo* en fase sólida. Estos péptidos poseen una potente actividad antibacteriana y antifúngica, a la vez que tienen una baja toxicidad para las células humanas. En la composición de la secuencia, estos péptidos (que pueden estar compuestos de 13 a 17 aminoácidos homólogos, mostrados en la información del listado de secuencias del Ejemplo 1) comparten una homología de aminoácidos superior al 85 % con PL-13.

45 Por tanto, la molécula peptídica de la presente invención está en cierta estructura secundaria (por ejemplo, estructura helicoidal) en un entorno hidrófobo. Los presentes inventores han usado la espectroscopía de dicroísmo circular (CD) para controlar la estructura α -helicoidal en trifluoroetanol al 50 % (una imitación del entorno hidrófobo de la membrana citoplasmática).

50 Los péptidos antimicrobianos preferidos de la presente invención que son análogos helicoidales con actividades biológicas potenciales tienen muy poca estructura alfa-helicoidal en medio benigno (un medio no desnaturizante como tampón PO₄ 50 mM que contiene KCl 100 mM, pH 7) controlado por espectroscopia de dicroísmo circular. Esta propiedad estructural puede tener importancia en mecanismos de péptidos antimicrobianos, por ejemplo: a) de reducción de la polimerización de la molécula en medio benigno, en concreto, la capacidad de autoasociación; b) permitir que el péptido penetre más fácilmente a través de la pared celular para alcanzar la membrana del microbio. Además, la alteración de la estructura α -helicoidal en medio benigno no tiene ningún impacto en la atracción del péptido (cargado positivamente) hacia la superficie de la pared celular (con carga negativa) del microbio, pero la falta de estructura puede disminuir la afinidad del péptido (interacciones hidrófobas entre los grupos hidrófobos en la superficie de la pared celular y la superficie hidrófoba del péptido) para esta superficie que permite que el péptido pase más fácilmente a través de la pared celular y entre en la región interfacial de la membrana donde el péptido es paralelo a la superficie de la membrana. En el presente documento, el péptido puede ser inducido por el entorno hidrófobo de la membrana a su estructura alfa-helicoidal. En esta estructura alfa-helicoidal, los presentes inventores tienen la hipótesis de que la cara no polar del péptido puede interactuar con la hidrofobicidad de la membrana, y sus grupos polares y con carga positiva de la cara polar pueden interactuar con la cabeza polar de los fosfolípidos (cargados negativamente) en la superficie de la membrana.

Un péptido antimicrobiano tiene una carga neta positiva y es anfipático/anfifílico cuando está en una estructura alfa-helicoidal. Por ejemplo, el péptido alfa-helicoidal tiene una cara no polar o una superficie hidrófoba en un lado de la molécula, y una superficie polar y cargada positivamente en el otro lado de la molécula; es decir, la molécula es anfipática.

Ciertos análogos peptídicos se estudian mediante el establecimiento del perfil de temperatura en la RP-HPLC de 5 a 80 °C, para evaluar la capacidad de autoasociación de las moléculas en solución. La capacidad de autoasociarse puede ser otro parámetro importante para medir las actividades antimicrobianas y hemolíticas del péptido. En general, se encuentra que una alta capacidad de autoasociarse en solución se correlaciona con una débil actividad antimicrobiana y una potente actividad hemolítica de los péptidos. Los estudios biológicos mostraron que la fuerte actividad hemolítica de los péptidos, en general, se correlacionaba con una alta hidrofobicidad, alta anfipaticidad y alta helicidad. En la mayoría de los casos, los péptidos sustituidos con aminoácidos D poseen una mejor actividad antimicrobiana media en comparación con los diastereómeros L. Al reemplazar el resto de aminoácido hidrófobo o hidrófilo en la cara no polar o polar de estas moléculas anfipáticas con una serie de aminoácidos D y L seleccionados, los presentes inventores demostraron además que este método se puede usar para el diseño racional de otros péptidos antimicrobianos con actividades mejoradas.

El péptido PL-13 preferido y su péptido PL-18 enantiómero D de la presente invención comprenden la siguiente secuencia de aminoácidos.

Tabla 1. Péptido y secuencia de aminoácidos

Nombre del péptido	Secuencia del producto	Secuencia con código de una letra
PL-13	Ac-Phe-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Ser-Lys-Leu-Trp-Asn-Trp-Lys-NH ₂	Ac-F _L -K _L -K _L -L _L -K _L -K _L -L _L -F _L -S _L -K _L -L _L -W _L -N _L -W _L -K _L -NH ₂
PL-18	D-Ac-Phe-Lys-Lys-Leu-Lys-Lys-Leu-Phe-Ser-Lys-Leu-Trp-Asn-Trp-Lys-NH ₂	Ac-F _D -K _D -K _D -L _D -K _D -K _D -L _D -F _D -S _D -K _D -L _D -W _D -N _D -W _D -K _D -NH ₂

En el presente documento, en el código de una letra, un subíndice D que sigue a un resto de aminoácido denota que el resto es un resto de aminoácido D; de manera similar, un subíndice L denota un resto de aminoácido L. En el nombre del péptido, una D inicial (no en subíndice) denota todos los aminoácidos D del péptido excepto donde se especifique. Ac denota Nα-acetilo y NH₂ denota Cα-amida.

El péptido antimicrobiano anteriormente mencionado y su composición pueden prepararse como cualquier vehículo o agente médicamente biológico para tratar pacientes con infección.

Para el fármaco a granel de la presente divulgación, se prefiere una dosis que varíe de 0,01 a 50 mg.

Los excipientes usados para la preparación de la inyección de la presente divulgación incluyen ácido etilendiaminotetraacético sódico, Tween-80, manitol, glicerol y propilenglicol.

Los excipientes usados para la preparación del agente sólido oral de la presente divulgación incluyen celulosa microcristalina, LHPC, polivinilpirrolidona, aerosol, almidón, dextrina, sacarosa, lactosa, polvo de talco, estearato de magnesio, carboximetilalmidón de sodio, PVPP, almidón pregelatinizado, etcétera.

Los excipientes usados para la preparación del agente aplicado externamente de la presente divulgación incluyen manitol, polisorbato 80, polietilenglicol, estearato de polioxilo (40), glicerol, carbómero, trietanolamina, alcohol, polivinilpirrolidona, ácido tartárico, bicarbonato de sodio, alcohol polivinílico, benzoato de sodio, celulosa microcristalina, hidroxipropilmetilcelulosa, etcétera.

Los excipientes usados para la preparación del agente líquido oral de la presente divulgación incluyen alcohol, etilparabeno, hidroxibenzoato de metilo, polisorbato 80, benzoato de sodio, ácido sórbico, miel, sacarosa, bisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, ácido ascórbico, tiocarbamida, EDTA disódico, ácido fosfórico, ácido cítrico, glicerol, lactosa, etcétera.

La composición de materias primas anteriormente mencionada puede combinarse con excipientes médicos comunes proporcionales para preparar un tipo de formulación que comprenda inyección, comprimidos, cápsulas, gránulos, líquido oral, pomada, pomada de crema, gel, colirio, aerosol, parche, plástico y loción con métodos convencionales en este campo. En los siguientes ejemplos, se muestran la preparación y la tecnología de formulaciones comunes.

El intervalo de dosis del péptido antimicrobiano en dichos agentes antimicrobianos es: de 0,1 a 50 mg/kg en inyección, de 0,1 a 50 mg/kg en agentes orales, 1/10.000 - 10 %/porción de agentes aplicados externamente, 1/10.000 - 10 %/porción de gotas para los ojos, y 1/10.0000 - 1 %/porción de loción.

Breve descripción de las figuras anexas

La Fig. 1 ilustra PL-13 como una rueda/redes helicoidales y sus secuencias de aminoácidos.

La Fig. 2 ilustra los resultados gráficos de los espectros de dicroísmo circular (CD) del péptido y sus análogos.

La Fig. 3 ilustra los perfiles de temperatura de RP-HPLC del péptido y sus análogos.

La Fig. 4 ilustra los perfiles de temperatura de RP-HPLC normalizados del péptido y sus análogos.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La invención se puede demostrar además mediante los siguientes ejemplos específicos.

Ejemplo 1: Información de secuencia de péptidos antimicrobianos relacionados derivados de PL-12

En este estudio, se selecciona a PL-12, un péptido antimicrobiano α -helicoidal anfipático de 15 restos que comprende la secuencia Ac-FKRLEKLFSKIWNWK-NH₂ con una cara polar y no polar, como el péptido precursor nativo. Su cara polar consiste en 7 restos hidrófilos (tres restos de lisina, una arginina, un glutamato, una serina y una asparagina) y un resto hidrófobo (un triptófano). Por el contrario, la cara no polar consiste en 6 restos hidrófobos (dos leucinas, una isoleucina, dos fenilalaninas y un triptófano) y un resto hidrófilo (una lisina).

Se obtienen análogos de péptido PL-13 en serie por medio de la sustitución de aminoácidos (Fig. 1). La Fig. 1 ilustra PL-13 como una rueda/redes helicoidales y sus secuencias de aminoácidos. Se muestran los restos de la cara no polar/hidrófoba (restos encuadrados) y los restos hidrófilos de la cara no polar/hidrófoba (restos rodeados por un círculo) y los restos hidrófobos de la cara hidrófila (restos encuadrados con un hexágono). La cara hidrófila se indica como un arco abierto, mientras que la cara hidrófoba se muestra como un arco cerrado en la rueda helicoidal. Ac denota N α -acetilo y NH₂ denota C α -amida. Los restos de aminoácidos se indican mediante códigos de una letra, que sirven como base para la realización de modificaciones adicionales y la obtención de un grupo de péptidos antimicrobianos relacionados con la misma actividad. Tanto PL-12 como PL-13 se componen de aminoácido L. Los presentes inventores diseñan los péptidos enantiómeros PL-17 y PL-18 (estando ambos compuestos de aminoácido D). Por consiguiente, PL-17 y PL-18 son completamente opuestos a los correspondientes PL-12 y PL-13 en la estereoquímica.

PL-23 y PL-24 son dos de los análogos peptídicos creados basándose en la sustitución de diferentes aminoácidos cargados. Se generan variando la naturaleza del resto cargado seleccionado para sustituir aminoácidos de secuencia de PL-13. El aminoácido seleccionado para la sustitución es preferentemente un aminoácido cargado y, en particular, es un aminoácido con una carga neta positiva. Los restos cargados incluyen Lys, Arg, Orn, His, ácido diaminobutírico y ácido diaminopropiónico. Cabe señalar que Orn tiene un grupo delta/ δ -amino en lugar de un grupo épsilon/ ϵ -amino en Lys, es decir, la cadena lateral es más corta en un átomo de carbono; el ácido diaminobutírico es un átomo de carbono más corto que Orn; es decir, tiene un grupo gamma/ γ -amino; el ácido diaminopropiónico es dos átomos de carbono más corto que Orn, es decir, tiene un grupo beta/ β -amino. PL-34 y PL-35 son enantiómeros D de los dos péptidos anteriores.

PL-25 a 27 se generan mediante múltiples sustituciones de PL-13. La actividad de un péptido con múltiples sustituciones (por ejemplo, dos sustituciones) en diferentes sitios del péptido de la invención puede seguir siendo eficaz. Para un péptido generado en particular mediante múltiples sustituciones, dichas múltiples sustituciones pueden ser al menos tan eficaces como una sola sustitución en el centro de la cara no polar. Considerando la composición de los aminoácidos de la secuencia peptídica y, en particular, la importancia que tiene el aminoácido hidrófobo en la actividad biológica, los presentes inventores insisten en que el péptido que comparte el porcentaje de similitud superior al 85 % con PL-13 en la composición de aminoácidos posee una gran actividad biológica. PL-36 a 38 son enantiómeros de los dos péptidos anteriores.

PL-28 a 30 son dos péptidos más cortos que el péptido de la invención generado mediante el truncamiento del resto N-terminal y el resto C-terminal. Este péptido generado mediante la eliminación de uno o dos restos de un extremo o dos extremos de PL-13, conserva casi la misma actividad antibacteriana que PL-13, ya que comparte el porcentaje de similitud superior al 85 % con PL-13 en la composición de los aminoácidos. PL-39 a 41 son enantiómeros de los dos péptidos anteriores.

Los restos hidrófobos de la superficie de los péptidos constituyen la cara hidrófoba global de los péptidos mediante interacción hidrófoba. La cara no polar de PL-13 consiste en F1, L4, L7, F8, L11, W14 y K15. Del mismo modo, la cara polar se compone de K2, K3, K5, K6, S9, K10, W12 y N13. Se combinan los restos de aminoácidos que constituyen PL-13, en especial, los restos hidrófobos (combinación de restos hidrófobos de la cara no polar y restos polares de la cara polar, o combinación de los restos de la cara no polar o los restos de la cara polar que no cambian esencialmente la anfipaticidad de la molécula) de modo que el péptido resultante sigue siendo biológicamente activo. PL-31 a 33 son partes de la secuencia (se seleccionan dos restos cualquiera para el intercambio de sitio), y este tipo de combinación hace que PL-31 a 33 compartan un 100 % de homología con PL-13 en la composición de restos para que tengan casi la misma actividad antibacteriana que PL-13. PL-42 a 44 son enantiómeros de los dos péptidos anteriores.

Tabla 2. Sumario de la información del listado de secuencias parcial

SEQ ID NO:	Nombre del péptido	Posición del aminoácido														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Enantiómero A		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	
1	PL-12	F	K	R	L	E	K	L	F	S	K	I	W	N	W	K
2	PL-13	F	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	W	N	W	K
3	PL-23	F	K	K	L	K	K	K	F	S	K	L	W	N	W	K
4	PL-24	F	K	K	L	K	K	R	F	S	K	L	W	N	W	K
5	PL-25	L	K	K	L	K	K	L	L	S	K	L	W	N	W	K
6	PL-26	F	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	L	N	L	K
7	PL-27	L	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	L	N	L	K
8	PL-28	F	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	W	N		
9	PL-29			K	L	K	K	L	F	S	K	L	W	N	W	K
10	PL-30		K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	W	N	W	
11	PL-31	W	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	W	N	F	K
12	PL-32	F	K	K	F	K	K	L	L	S	K	L	W	N	W	K
13	PL-33	F	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	K	N	W	W
Enantiómero B		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
14	PL-17	F	K	R	L	E	K	L	F	S	K	I	W	N	W	K
15	PL-18	F	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	W	N	W	K
16	PL-34	F	K	K	L	K	K	K	F	S	K	L	W	N	W	K
17	PL-35	F	K	K	L	K	K	R	F	S	K	L	W	N	W	K
18	PL-36	L	K	K	L	K	K	L	L	S	K	L	W	N	W	K
19	PL-37	F	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	L	N	L	K
20	PL-38	L	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	L	N	L	K
21	PL-39	F	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	W	N		
22	PL-40			K	L	K	K	L	F	S	K	L	W	N	W	K
23	PL-41		K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	W	N	W	
24	PL-42	W	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	W	N	F	K
25	PL-43	F	K	K	F	K	K	L	L	S	K	L	W	N	W	K
26	PL-44	F	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	K	N	W	W

Ejemplo 1-1: Análogos peptídicos generados mediante el alargamiento de PL-13

- 5 Los análogos peptídicos de la presente invención se generan añadiendo uno o dos restos de aminoácidos en el extremo N o el extremo C de los péptidos. PL-46, generado mediante la adición de un resto hidrófobo en la cara hidrófoba (N-terminal) de PL-13, aumentó la cara hidrófoba del péptido; y PL-47 se genera mediante la adición de un resto hidrófilo a PL-46. Este cambio de longitud conservó más del 85 % de similitud de los aminoácidos, e hizo que los análogos peptídicos poseyeran actividad biológica similar a la de PL-13.

10

Tabla 3. Secuencias peptídicas generadas mediante el alargamiento de dos extremos de PL-13

Nombre del péptido	Posición del aminoácido																		
	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Enantiómero A			L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L			
PL-13			F	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	W	N	W	K		
PL-46		L	F	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	W	N	W	K		
PL-47	K	L	F	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	W	N	W	K		
PL-48			F	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	W	N	W	K	K	
PL-49			F	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	W	N	W	K	K	S
Enantiómero B			D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D			
PL-18			F	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	W	N	W	K		
PL-51		L	F	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	W	N	W	K		
PL-52	K	L	F	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	W	N	W	K		
PL-53			F	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	W	N	W	K	K	
PL-54			F	K	K	L	K	K	L	F	S	K	L	W	N	W	K	K	S

Ejemplo 1-2: Análogos peptídicos con sustituciones hidrófobas similares

- 5 Otros péptidos de la invención se generan realizando sustituciones sencillas de restos de aminoácidos con una hidrofobicidad relativamente similar. Se generan sustituciones de hidrofobicidad sencillas con cadenas laterales de hidrofobicidad similar, y tienen actividad biológica.

Tabla 4. Restos de aminoácidos usados para las sustituciones de aminoácido homólogo

Restos de PL-13	Restos sustituidos
Leu	Ile, Val, norleucina, norvalina
Phe	Trp, Tyr, Leu, Ile, Val, norleucina, norvalina
Trp	Phe, Tyr, Leu, Ile, Val, norleucina, norvalina

Ejemplo 2: Preparación de PL-13 y péptidos antimicrobianos relacionados y ensayo de parámetros relevantes

15 Todos los péptidos de la presente invención se generan mediante síntesis que se llevan a cabo mediante síntesis de péptidos en fase sólida usando química Fmoc-t-butiloxycarbonilo y resina de MBHA (4-metilbenzidrilamina) (0,97 mmol/g). Sin embargo, se entiende en la técnica que existen otros dispositivos de síntesis de péptidos adecuados o que se podría llevar a cabo la síntesis de péptidos manual para producir los péptidos de la presente invención. Se purifican los péptidos en bruto mediante cromatografía preparativa en fase inversa (RP-HPLC) usando una columna Zorbax 300 SB-C₈ (250 x 9,4 mm de DI; tamaño de partícula de 6,5 µm, tamaño de poro de 300 Å; Agilent Technologies) con un gradiente AB lineal (acetonitrilo al 0,2 %/min) a un caudal de 2 ml/min, en la que la fase móvil A es TFA acuoso al 0,1 % y B es TFA al 0,1 % en acetonitrilo. La pureza de los péptidos se verifica mediante RP-HPLC analítica como se describe a continuación. Los péptidos se caracterizan además mediante espectrometría de masas por electronebulización y análisis de aminoácidos.

25 **RP-HPLC analítica de péptidos** - los péptidos se analizan en un cromatógrafo líquido de la serie Agilent 1200 (Little Falls, DE). Las series se realizan en una columna Zorbax 300 SB-C₈ (150 x 4,6 mm de DI, tamaño de partícula 5 µm, tamaño de poro 300 Å) de Agilent Technologies usando gradiente AB lineal (acetonitrilo al 1 %/min) y un caudal de 1 ml/min, en el que el disolvente A es TFA acuoso al 0,05 %, pH 2 y el disolvente B es TFA al 0,05 % en acetonitrilo.

30 En los estudios descritos a continuación, se usa el péptido de 15 restos que tiene la secuencia Ac-FKRLEKLFSKIWNWK-NH₂ (PL-12) como marco para estudiar los efectos de la hidrofobicidad/hidrofilidad, anfipaticidad y helicidad del péptido mediante una o más sustituciones de aminoácidos en actividades biológicas. Estos estudios demuestran i) la importancia del parámetro de autoasociación peptídica en péptidos antimicrobianos

α -helicoidales; ii) que estas sustituciones mejoran la actividad antimicrobiana, disminuyen la toxicidad y mejoran la especificidad antimicrobiana mientras que mantienen una actividad de amplio espectro para los hongos, las bacterias gram-negativas y gram-positivas.

5 *Caracterización de la estructura helicoidal:* las elipticidades molares residuales medias de los péptidos se determinan mediante espectroscopía de dicroísmo circular (CD), usando un espectropolarímetro Jasco J-720 (Jasco, Easton, MD), a 25 °C en condiciones benignas (KH₂PO₄/K₂HPO₄ 50 mM/KCl 100 mM, pH 7), así como en presencia de un disolvente inductor de hélice α , 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) (KH₂PO₄/K₂HPO₄ 50 mM/KCl 100mM, tampón pH 7/TFE al 50 %). Se carga una dilución de factor de dilución de 10 de una solución madre 500 μ M del péptido en una
10 celda de sílice fundida de 0,02 cm, y se explora su elipticidad molar residual media de 190 a 250 nm. Los valores de las elipticidades molares residuales medias del péptido a una longitud de onda de 222 nm se usan para estimar la cantidad relativa de α -helicidad de los péptidos.

15 Para determinar la estructura secundaria de los péptidos en diferentes entornos, se miden los espectros de dicroísmo circular (CD) de los análogos peptídicos bajo un pH y fuerza iónica fisiológicamente relacionados (KCl 100 mM, PO₄ ac. 50 mM, pH 7 lo que se conoce como condiciones benignas) y también en TFE al 50 % para imitar el entorno hidrófobo de la membrana. Los espectros de CD de los análogos peptídicos se miden en condiciones benignas (KCl 100 mM, KH₂PO₄/K₂HPO₄ 50 mM, pH 7, denominado tampón KP) y también en trifluoroetanol (TFE) al 50 % para imitar el entorno hidrófobo de la membrana. Como se muestra en la Fig. 2, el péptido precursor, PL-12, es solo parcialmente helicoidal en el tampón KP. Sin embargo, en presencia de TFE al 50 %, los tres péptidos L son estructuras α -helicoidales completamente plegadas con elipticidades molares y helicidad similares. Como era de esperar, los péptidos D mostraron espectros que son imágenes especulares exactas en comparación con sus enantiómeros L, con elipticidades molares residuales medias equivalentes, pero de signo contrario tanto en tampón
20 KP benigno como en TFE al 50 % (Tabla 5).

25

Tabla 5. Datos biofísicos de análogos peptídicos

Péptido ^a	Hidrofobicidad ^b		Tampón benigno		TFE al 50 %	
	t _{R5} (min)	t _{R80} (min)	[θ] ₂₂₂ ^c	% de hélice ^d	[θ] ₂₂₂ ^c	% de hélice ^d
PL-40	33,16	30,94	1.700	6,0	19.950	70,7
PL-34	34,76	32,75	2.350	8,3	22.000	78,0
PL-26	35,66	33,49	-2.700	9,6	-24.650	87,4
PL-18	35,75	33,37	2.300	8,2	22.700	80,5
PL-13	35,75	33,37	-2.350	8,3	-22.750	80,7
PL-17	38,04	36,10	3.400	12,1	26.300	93,3
PL-12	38,04	36,10	-3.350	11,9	-26.450	93,8
PL-43	41,64	40,52	3.950	14,0	27.150	96,3
PL-51	42,59	41,35	4.750	16,8	28.200	100,0

a. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos se muestran en la Tabla 2 y en la Tabla 3.

b. Los péptidos están ordenados por orden creciente de hidrofobicidad, es decir, por orden creciente de tiempo de retención (t_R) en RP-HPLC a pH 2 y a temperaturas de 5 °C.

c. Las elipticidades molares residuales medias, [θ]₂₂₂, (grado.cm².dmol⁻¹) a longitud de onda de 222 nm se miden a 25 °C en condiciones benignas (KCl 100 mM, PO₄ 50 mM, pH 7,0) en tampón que contiene TFE al 50 % mediante espectroscopía de dicroísmo circular. Los valores negativos de elipticidad molar residual media indican las hélices a mano derecha, y los valores positivos indican las hélices a mano izquierda.

d. El contenido helicoidal (en porcentaje) de un péptido con respecto al valor de elipticidad molar residual media (100 %) del péptido PL-15 en presencia de trifluoroetanol al 50 % (TFE).

Los espectros de CD de análogos peptídicos se muestran en la Fig. 2. 2.

30 La Fig. 2 ilustra los resultados gráficos de los espectros de dicroísmo circular (CD) de péptidos a pH 7,4 y a 25 °C, en PO₄ ac. 50 mM que contiene KCl 100 mM, en el que el tampón KP (KH₂PO₄ 50 mM, K₂HPO₄, KCl 100 mM, pH 7,4) imita el entorno hidrófilo, y el tampón KP-TFE (1:1 [vol/vol]) imita el entorno hidrófobo de la membrana celular. La figura anterior representa los espectros de CD de los péptidos en tampón benigno sin TFE, mientras que la siguiente figura representa los espectros de CD obtenidos en presencia de TFE al 50 %. Los símbolos usados son:
35 cuadrado relleno para PL-40, círculo relleno para PL-34, triángulo superior relleno para PL-26, triángulo inferior relleno para PL-18, cuadrado vacío para PL-13, círculo vacío para PL-17, triángulo superior vacío para PL-12, triángulo inferior vacío para PL-43 y pentágono relleno para PL-51.

El comportamiento de retención de RP-HPLC se ha usado con frecuencia para representar la hidrofobicidad peptídica global. Está bien documentado que la formación de un dominio de unión hidrófobo debido a la estructura secundaria del péptido puede afectar las interacciones peptídicas con matrices de fase inversa, habiéndose observado este efecto especialmente para los péptidos anfipáticos α -helicoidales. Debido a este dominio de unión preferido, los péptidos α -helicoidales anfipáticos son considerablemente más retentivos que los péptidos no anfipáticos de la misma composición de aminoácidos. Además, las condiciones de cromatografía características de la RP-HPLC (fase estacionaria hidrófoba, disolvente de elución no polar) pueden inducir y estabilizar la estructura helicoidal en polipéptidos potencialmente helicoidales de una manera similar a la del disolvente TFE inductor de hélice. Por lo tanto, cualquier diferencia en la hidrofobicidad eficaz a través de sustituciones de aminoácidos se puede controlar fácilmente a través de las diferencias consiguientes en el tiempo de retención de la RP-HPLC.

Además, los presentes inventores usaron el establecimiento del perfil de temperatura durante la RP-HPLC para determinar la capacidad de autoasociación de diversos análogos de PL-13 que se produciría a través de la interacción de las caras no polares de estas hélices α de péptidos anfipáticos. Se usó TFE acuoso al 50 % en acetonitrilo y condiciones hidrófobas en la columna de fase inversa (fase estacionaria hidrófoba y disolvente orgánico hidrófobo en la fase móvil), ya que el entorno hidrófobo de una columna de fase inversa también podría inducir una estructura α -helicoidal. Desde su introducción, la técnica de establecimiento del perfil de temperatura de la RP-HPLC se ha aplicado a varios tipos de moléculas, incluyendo los péptidos de lámina β cíclicos, las hélices α monoméricas y las hélices α que se dimerizan, así como las hélices α que se dimerizan para formar superenrollamientos. Aunque los péptidos se eluyen de una columna de fase inversa principalmente mediante un mecanismo de adsorción/desorción, incluso un péptido unido fuertemente a una fase estacionaria hidrófoba se repartirá entre la matriz y la fase móvil cuando el contenido de acetonitrilo sea suficientemente alto durante la elución en gradiente. En resumen, el mecanismo se basa en cuatro supuestos: (i) a baja temperatura, del mismo modo que un péptido α -helicoidal anfipático puede dimerizarse en una solución acuosa (a través de su cara hidrófoba no polar), se dimerizará en solución durante la división en cromatografía de fase inversa; (ii) a temperaturas más altas, el equilibrio monómero-dímero favorece al monómero a medida que se altera el dímero; (iii) a temperaturas suficientemente altas, solo está presente el monómero en la solución; e (iv) el péptido se une siempre en su forma helicoidal monomérica a la fase estacionaria hidrófoba, es decir, el dímero solo puede estar presente en solución y se requiere la alteración del dímero para volver a unirse a la matriz de RP-HPLC.

Se emplea un péptido de control (péptido C) diseñado para presentar una estructura secundaria despreciable, es decir, un enrollamiento aleatorio, como un péptido patrón para el establecimiento del perfil de temperatura durante la RP-HPLC con el fin de controlar la dimerización del péptido. Con la secuencia de Ac-ELEKGGLEGEKGGKELEK-amida, presentó claramente una estructura secundaria despreciable, este péptido de 18 restos está incluso en presencia de las fuertes propiedades de inducción de hélice alfa de trifluoroetanol al 50 % (TFE) y a la baja temperatura de 5 °C ($[\theta]_{222} = -3,950$). Dado que el péptido C es un péptido monomérico aleatorio en medios acuosos e hidrófobos, su comportamiento de retención en el intervalo de temperaturas de 5 a 80 °C solo representa efectos de temperatura generales sobre el comportamiento de retención de los péptidos, es decir, una disminución lineal en el tiempo de retención de los péptidos al aumentar la temperatura debido a una mayor difusividad de solutos y una mayor transferencia de masa entre las fases estacionaria y móvil a temperaturas más altas. Por lo tanto, tras la normalización de los tiempos de retención del péptido C, el comportamiento de retención de los péptidos solo representa la capacidad de autoasociación del péptido. Cabe señalar que cuanto mayor es el valor de PA, mayor es la capacidad de autoasociación. El orden de la capacidad de autoasociación de los péptidos de los tres pares de enantiómeros peptídicos es idéntico al orden de la hidrofobicidad del péptido. Además de la reducción en el tiempo de retención debido a los efectos generales de la temperatura señalados anteriormente, también se producirá la destrucción de la hélice α al aumentar la temperatura, dando lugar a tiempos de retención reducidos a medida que los péptidos se convierten en enrollamientos cada vez más aleatorios.

Los datos de los tiempos de retención para los péptidos se muestran en la Tabla 6, que registra los tiempos de retención a 5 °C, los tiempos máximos de retención y los tiempos de retención a 80 °C durante el establecimiento del perfil de temperatura. Las temperaturas de 5 a 80 °C son los límites de temperatura superior e inferior del perfil de temperatura en la RP-HPLC, que representan la polimerización de los péptidos a 5 °C y la monomerización de péptidos a 80 °C debido a la desnaturalización de los péptidos por la alta temperatura y la disociación de los polímeros. Los tiempos de retención máximos representan los puntos de umbral en los que los péptidos se transforman totalmente de la forma polimérica a la monomérica.

Tabla 6. Hidrofobicidad relativa y capacidad de autoasociación de análogos peptídicos durante el establecimiento del perfil de temperatura de la RP-HPLC

Péptidos ^a	t_R (min) ^b			$\Delta t_R(X\text{-Péptido C})(\text{min})^c$		
	5 °C	Máx	80 °C	5 °C	80 °C	P_A (min) ^d
PL-40	33,16	33,16	30,94	10,60	11,01	0,55
PL-34	34,76	34,76	32,75	12,20	12,82	0,81
PL-26	35,66	35,66	33,49	13,10	13,56	0,68

PL-13	35,75	35,75	33,37	13,19	13,45	0,56
PL-18	35,75	35,75	33,37	13,19	13,45	0,56
PL-17	38,02	38,04	36,10	15,46	16,19	0,93
PL-43	41,64	41,97	40,52	19,08	20,60	1,65
PL-51	42,59	42,96	41,35	20,02	21,42	1,63
Cf	22,56	22,56	19,91			

a. indica los tiempos de retención de diferentes péptidos medidos mediante RP-HPLC a 5 °C y 80 °C, y los tiempos máximos de retención de los péptidos durante el cambio de temperatura.

b. indica la diferencia en el tiempo de retención del péptido en comparación con el del péptido de control C a diferentes temperaturas (5 °C y 80 °C), que representa la hidrofobicidad relativa de los análogos peptídicos.

c. P_A indica el parámetro de asociación de cada péptido durante el establecimiento del perfil de temperatura de la RP-HPLC, que es la diferencia en el tiempo de retención máximo de ($t_{R^1}-t_{R^5}$ para los análogos peptídicos) - ($t_{R^1}-t_{R^5}$ para el péptido de control C)) dentro del intervalo de temperaturas, y ($t_{R^1}-t_{R^5}$) es la diferencia en el tiempo de retención de un péptido a una temperatura específica (t) en comparación con el de la temperatura de 5 °C.

d. El péptido C es un control de enrollamiento aleatorio, cuyo comportamiento de retención durante la RP-HPLC puede reflejar la variación del sistema de RP-HPLC causada por el cambio de temperatura. Se usa para descartar el efecto que la variación del estado de la columna cromatográfica causada por el que tiene el cambio de temperatura en el tiempo de retención del péptido. Por lo tanto, solo se refleja el cambio en la propiedad física de los péptidos a diferentes temperaturas.

La capacidad de los péptidos D para autoasociarse está determinada por el establecimiento del perfil de temperatura de la RP-HPLC. Como era de esperar, los enantiómeros del péptido L y D son idénticos en cuanto a las características de comportamiento en este intervalo de temperaturas, debido a la adopción de una estructura secundaria idéntica, una cara hidrófoba idéntica y una propiedad hidrófoba idéntica al interactuar con la matriz de fase inversa.

Con frecuencia, se han utilizado los tiempos de elución durante la RP-HPLC como una medida de la hidrofobicidad relativa de los análogos peptídicos. Por lo tanto, puede considerarse que los datos del tiempo de retención en la Tabla 6 reflejan la diferencia de hidrofobicidad entre los análogos peptídicos. Los datos del tiempo de retención de los análogos peptídicos en la Tabla 6 se comparan con los del péptido PL-13 nativo a 5 °C y 80 °C, respectivamente, para visualizar más fácilmente la variación en la hidrofobicidad de los análogos peptídicos.

La Fig. 3 muestra los perfiles variables del tiempo de retención de los péptidos durante la RP-HPLC de 5 °C a 80 °C. Como se ha mencionado anteriormente, la autoasociación de los péptidos depende de la temperatura. Los péptidos existen en un equilibrio dinámico de transformación mutua entre el polímero y el monómero durante la división de la RP-HPLC. A bajas temperaturas, los péptidos tienden a existir como más dímeros o polímeros (autoasociación). En general, la autoasociación se produce con la interacción hidrófoba de la cara hidrófoba de los péptidos, lo que debilita la capacidad de combinación del polímero y la fase estacionaria hidrófoba, dando lugar a un tiempo de retención bajo. Con el aumento de la temperatura, el equilibrio de la transformación mutua entre el polímero y el monómero se desplaza hacia la forma monomérica. La mayor concentración en la solución de monómero durante la división aumenta la velocidad de activación para la combinación de péptido y columna cromatográfica, y, por lo tanto, aumenta el tiempo de retención. Cabe señalar que el aumento de la temperatura también introduce otros efectos generales en el tiempo de retención debido a la menor viscosidad de la fase móvil y a un aumento significativo en la transferencia de masa entre la fase estacionaria y la fase móvil. Estos efectos disminuyen el tiempo de retención al aumentar la temperatura de forma lineal, como se muestra para el tiempo de retención del péptido de control C de enrollamiento aleatorio. Por el contrario, para los péptidos polimerizados, a una temperatura dada, los polímeros se alteran y se convierten en monómeros, y como la capacidad de combinación de los monómeros y la fase estacionaria hidrófoba es fuerte, el tiempo de retención alcanza el valor máximo. Por encima de esta temperatura crítica, se observará una disminución en el tiempo de retención de los péptidos al aumentar la temperatura debido a la baja viscosidad de la fase móvil, el aumento en la transferencia de masa y la desnaturalización de las moléculas peptídicas causadas por la alta temperatura. El comportamiento de retención del péptido patrón C de enrollamiento aleatorio introducido mediante el establecimiento del perfil de temperatura en la RP-HPLC se utiliza para reflejar la variación del estado de la columna cromatográfica mientras varía la temperatura. De esta forma, se descarta el efecto que tiene la variación del estado de la columna cromatográfica sobre el comportamiento de retención del péptido. Los datos del tiempo de retención de los péptidos a cada temperatura se distribuyen en la Fig. 3 con desventajas que a 5 °C se normalizan con relación al perfil de temperatura del péptido patrón C de enrollamiento aleatorio, y se normalizan con relación al tiempo de retención a 5 °C, presentándose esto último como una línea discontinua en la Fig. 4.

Se observa que los análogos peptídicos del presente estudio mostraron una capacidad de autoasociación variable espectacular en la solución (Fig. 4). Los valores máximos del cambio de los tiempos de retención ($t_{R^1}-t_{R^5}$ para el péptido) - ($t_{R^1}-t_{R^5}$ para el péptido C)) en la Fig. 4 se definen como el parámetro de autoasociación del péptido (PA)

para cuantificar la capacidad de asociación de los análogos peptídicos en solución.

La Fig. 3 ilustra los perfiles de temperatura de la RP-HPLC del péptido antimicrobiano y sus análogos. Condiciones: RP-HPLC, columna de Agilent Zorbax 300 SB-C₈ (150 x 4,6 mm, 5- μ m, 300 Å), elución de gradiente lineal al 1 % a un caudal de 1 ml/min, donde el eluyente A es TFA al 0,1 % acuoso y el eluyente B es TFA al 0,1 % en acetonitrilo. Se emplea un péptido de control (péptido C), un enrollamiento aleatorio, como un péptido patrón. Los datos de retención se han recogido en incrementos de 5 °C dentro del intervalo de temperaturas de 5 °C a 80 °C. Los símbolos usados son: cuadrado relleno para PL-40, círculo relleno para PL-34, triángulo superior relleno para PL-26, triángulo inferior relleno para PL-18, círculo vacío para PL-17, triángulo inferior vacío para PL-43, pentágono relleno para PL-51 y pentágono vacío para el péptido C.

La Fig. 4 ilustra los perfiles de temperatura de la RP-HPLC normalizados del péptido antimicrobiano y sus análogos. Perfiles de temperatura normalizados con respecto al comportamiento de retención del péptido de enrollamiento aleatorio C1. Columna y condiciones: véase la Fig. 3. El comportamiento de retención de los péptidos se normaliza con respecto al del péptido de enrollamiento aleatorio C1 a través de la expresión ($t_R^1 - t_R^5$ para péptidos) menos ($t_R^1 - t_R^5$ para C1), que se define como PA, es decir, la capacidad de autoagregación del péptido. t_R^1 representa los tiempos de retención a una temperatura específica de un péptido antimicrobiano o el péptido de enrollamiento aleatorio, y t_R^5 representa los tiempos de retención a 5 °C. Los símbolos usados son: cuadrado relleno para PL-40, círculo relleno para PL-34, triángulo superior relleno para PL-26, triángulo inferior relleno para PL-18, círculo vacío para PL-17, triángulo inferior vacío para PL-43, pentágono relleno para PL-51 y línea discontinua para el péptido C.

Ejemplo 3: Ensayo de sensibilidad de PL-13 y fármacos antifúngicos de péptido antimicrobiano en serie relacionados

1. Cepas bacterianas experimentales

(1) Cepas de ensayo: *Monilia albicans* (*Candida albicans*), *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus fumigatus* y *flavous*.

(2) Cepas de control de calidad: *Candida krusei* JLC30366 (ATCC6258).

2. Reactivos

Medio de agar de dextrosa de patata (PDA) de Difco Company.

Medio de caldo de dextrosa de patata (PDA) de Difco Company.

Medio líquido RPMI-1640 de Gibco BRL Company.

Ácido 3-*N*-morfolino-propanosulfónico (MOPS) de Baiao Biology Co., LTD.

3. Fármacos antifúngicos

Los péptidos antimicrobianos PL-13 sometidos a ensayo son suministrados por Jiangsu ProteLight Pharmaceutical & Biotechnology Co., LTD. Tanto el fármaco de control Fluconazol (FCZ) (adquirido en Shanghai Sanwei Pharmaceutical Corporation) como Itraconazol (ICZ) (adquirido en SIGMA) son polvos convencionales con una pureza superior al 99 %.

4. Procedimiento experimental

(1) Las cepas bacterianas que se conservan en la inclinación del PDA se inoculan respectivamente sobre la placa de PDA y el medio inclinado. La activación de las cepas bacterianas se realiza a un nivel de humedad del 60 % y 25 °C (para *Aspergillus*) o 37 °C (para *Candida*).

(2) Se usa una solución salina fisiológica madre al 0,9 % que comprende Tween-80 al 0,5 % para preparar la suspensión bacteriana para el experimento. Se utiliza el hemocitómetro para ajustar la concentración de la suspensión bacteriana a $1-3 \times 10^6$ UFC/ml (0,5 unidades McFarland) para hacer que la solución madre se conserve a -20 °C. Durante el ensayo de sensibilidad, se diluye el medio líquido RPMI-1640 1.000 veces hasta $1-3 \times 10^3$ UFC/ml.

(3) El líquido RPMI-1640 se utiliza como diluyente para diluir una solución madre de péptidos con factor de dilución de 10. De acuerdo con el resultado de los experimentos preliminares, la concentración inicial de péptidos se establece en 64 μ g/ml y la concentración terminal se establece en 0,125 μ g/ml, disminuyendo la concentración desde el primer orificio hasta el décimo. Se añaden 100 μ l de suspensión bacteriana a cada orificio de los 11 primeros orificios excepto el duodécimo con la concentración de $0,5-1,5 \times 10^3$ UFC/ml. El undécimo orificio se usa como orificio de control vivo, mientras que el duodécimo como control en blanco.

(4) El líquido RPMI-1640 se utiliza como diluyente para diluir una solución madre de FCZ e ICZ con factor de dilución de 10. La concentración inicial de FCZ se establece en 64 μ g/ml y la concentración final se establece en 0,125 μ g/ml, y la concentración de ICZ se establece en 16 μ g/ml, ajustándose la concentración final en

0,03 µg/ml. Lo mismo para otras operaciones.

5. Resultados

- 5 En la Tabla 7, se muestran los resultados antifúngicos de los tipos de péptidos.

Tabla 7. Concentración inhibidora mínima de los tipos de péptidos sometidos a ensayo (µg/ml)

	JLC 30366	JLC 30383	JLC 31379	JLC 31384	JLC 33659	JLC 33660	JLC 31512	JLC 30367	JLC 30506	JLC 30883	JLC 30784	JLC 40437
	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus flavous</i>	<i>Aspergillus flavous</i>
FCZ	16	8	0,5	0,25	0,25	0,25	1	2	>64	>64	>64	>64
ICZ	0,25	0,25	0,03	0,03	0,03	0,062 5	0,03	0,062 5	0,125	0,125	0,125	0,125
PL-12	8	16	4	8	16	16	32	32	32	32	>64	>64
PL-13	2	4	2	4	8	8	8	4	32	32	>64	>64
PL-23	4	8	2	8	16	16	32	32	64	64	>64	>64
PL-26	8	8	4	8	32	16	32	16	32	32	>64	>64
PL-30	4	8	2	8	16	16	32	32	64	32	>64	>64
PL-32	4	16	2	32	16	32	32	32	64	64	>64	>64
PL-17	8	8	2	2	4	4	8	4	32	32	>64	>64
PL-18	4	4	2	2	4	4	4	4	16	16	>64	>64
PL-34	8	8	4	4	16	16	32	32	>64	>64	>64	>64
PL-37	8	4	4	8	32	16	16	32	32	16	>64	>64
PL-40	4	8	2	8	16	16	32	8	64	32	>64	>64

Este experimento muestra que los péptidos antimicrobianos anteriores tienen una acción inhibitoria superior sobre *Candida micoderma*, mientras que tienen una acción inhibitoria inferior sobre *Aspergillus fumigatus*.

Ejemplo 4: Ensayo de sensibilidad de PL-13 y series de péptidos antimicrobianos relacionados

1. Cepas experimentales

Las cepas experimentales son 37 cepas patrón conservadas en laboratorio y bacterias aisladas clínicas, incluyendo bacterias resistentes a fármacos y bacterias de control de calidad que escogen *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603.

2. Medio de cultivo

El medio de cultivo de agar MH se adquiere en los Institutos Nacionales de Control de Alimentos y Fármacos. El medio de cultivo MH bouillon y el medio de infusión de cerebro-corazón son productos de American DIFCO Company.

3. Fármacos

Los péptidos antimicrobianos PL-13 sometidos a ensayo son suministrados por Jiangsu ProteLight Pharmaceutical & Biotechnology Co., LTD.

Como control, la levofloxacina es una sustancia patrón de los Institutos Nacionales de Control de Alimentos y Fármacos.

4. Procedimiento experimental

- (1) El ensayo de sensibilidad se realiza con el método de dilución de agar de factor de dilución de dos y el inoculador multipunto Denlay. Las bacterias de ensayo se cultivan con caldo de nutrientes e infusión de cerebro y corazón.
- (2) El fármaco se diluye con factor de dilución de dos en diferentes concentraciones con caldo MH tras la disolución y luego se coloca en la placa, respectivamente.
- (3) Tras la disolución, se inyecta el medio de cultivo de agar MH en la placa con fármaco cuantitativamente y se mezcla para hacer que la concentración final del fármaco sea de 0,03, 0,06, 0,125, ..., 128 µg/ml, respectivamente.
- (4) Tras la solidificación del medio de cultivo en la placa, se inoculan las bacterias de ensayo (10⁴ UFC/punto) mediante un inoculador multipunto y se cultivan durante 18 horas a una temperatura constante de 35 °C. Luego se observan los resultados.
- (5) La concentración más baja del fármaco en la placa que no mostró crecimiento bacteriano es la concentración inhibitoria mínima (CIM).

5. Resultados

En la Tabla 7, se muestra la actividad antimicrobiana de las muestras de PL-13 y el medicamento de control Levofloxacina contra 37 cepas de bacterias. Como se muestra en el presente documento, los péptidos antimicrobianos como PL-13 y Levofloxacina de control positivo tienen el mismo efecto de esterilización sobre las bacterias susceptibles comunes, pero para las bacterias resistentes a los fármacos, los péptidos antimicrobianos muestran una eficacia de esterilización superior.

Tabla 8. CIM de diferentes polipéptidos sometidos a ensayo (µM)

Cepas bacterianas	PL-12	PL-13	PL-26	PL-34	PL-17	PL-18	PL-34	PL-43	Levofloxacina
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	1,3	0,7	1,3	0,7	0,3	0,7	2,6	1,3	0,60
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	1,3	0,7	1,3	0,7	0,3	0,7	2,6	1,3	0,30
15	1,3	0,7	1,3	0,7	0,3	0,7	2,6	1,3	0,30
08-49(MSSA) <i>Staphylococcus aureus</i> susceptible a la metilina	0,7	2,7	1,3	1,3	0,7	0,7	5,3	0,3	0,30

ES 2 661 860 T3

08-52(MRSA) <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la metilina	1,3	2,7	1,3	0,7	5,3	2,7	3,3	3,3	76,92
(MRSE) <i>Staphylococcus epidermidis</i> resistente a la metilina ATCC12228	1,3	0,3	0,7	1,3	1,0	0,7	1,3	0,3	0,30
08-17 (MSSE) <i>Staphylococcus epidermidis</i> susceptible a la metilina	2,7	1,3	2,7	1,7	1,0	0,7	1,3	1,7	1,20
08-18 (MRSE) <i>Staphylococcus epidermidis</i> resistente a la metilina	1,3	0,7	2,7	6,7	1,0	0,7	1,3	6,7	55,49
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	1,3	5,3	5,3	0,3	5,3	5,3	1,7	1,7	1,20
HH22* (AME) Enzima modificadora de aminoglicósido	0,3	1,7	6,7	0,3	10,7	1,7	0,3	0,3	1,20
06-7	5,3	1,3	5,3	6,7	5,3	2,7	21,3	10,67	19,23
06-71 (VRE) Enterococos resistentes a la vancomicina	0,3	1,7	1,7	1,3	1,7	1,3	1,3	0,7	2,40
<i>Enterococcus faecium</i> 06-1	5,3	5,3	1,3	1,3	10,7	5,3	1,3	6,7	2,40
06-12 (VREF) Enterococos resistentes a la vancomicina	1,3	5,3	5,3	0,3	1,7	5,3	0,7	1,7	2,40
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,03	0,03	0,3	0,3	0,2	1,3	0,1	0,03	0,14
08-5 (ESBL) β -lactamasa de <i>Spectyrum</i> alargada	1,3	0,7	1,3	1,7	0,3	1,3	5,3	6,7	76,92
26	1,3	0,7	0,7	1,3	0,3	< 0,08	2,7	6,7	< 0,7
272 (TEM-88)	0,7	0,3	1,3	6,7	0,3	< 0,08	1,3	1,7	< 0,7
274 (TEM-15)	1,3	0,3	1,3	0,3	0,3	0,08	2,7	0,3	0,2
276 (TEM-52)	1,3	0,7	0,7	0,03	0,7	< 0,08	2,7	0,3	< 0,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCC27853	5,3	1,3	5,3	0,3	1,3	0,3	1,7	0,3	1,20
17	2,7	1,3	1,7	0,3	2,7	0,2	1,3	1,7	0,7
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC700603	2,7	0,7	5,3	0,7	2,7	0,3	2,7	0,3	1,2
08-2 (ESBL)	5,3	0,7	1,3	6,7	0,3	2,7	10,7	5,3	76,92
7	5,3	1,3	2,7	6,7	0,3	< 0,04	5,3	5,3	< 16
<i>Enterobacter cloacae</i> 45301	0,3	1,3	1,7	0,3	1,3	0,04	1,3	0,03	0,1
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 25001	0,03	3	6,7	1,3	1,3	1,7	1,3	0,3	0,1
<i>Enterobacter aerogenes</i> 45102	0,03	2,7	1,3	0,3	1,3	0,04	0,03	0,003	< 0,02
<i>Serratia marcescens</i> 41002	0,03	0,3	0,02	0,02	1,3	0,04	0,7	0,3	0,1
Cepas de <i>Shigella sonnei</i> 51592	2,7	0,7	1,3	0,04	0,3	0,04	2,7	0,3	0,1
<i>Shigella</i>	1,7	0,7	0,3	0,7	0,3	1,3	< 0,01	1,7	< 0,02
<i>Shigella flexneri</i>	2,7	0,7	1,3	0,3	0,3	0,0	2,7	0,7	0,1
<i>Salmonella typhimurium</i>	5,3	1,3	5,3	0,3	1,3	0,3	5,3	0,3	< 0,02

<i>Typhoid bacillus</i> H901	5,3	1,3	2,7	0,3	0,7	0,3	5,3	0,7	< 0,02
<i>Feilaoti citrobacter</i> 48001	5,3	1,3	2,7	1,7	2,7	0,3	1,3	0,3	0,1
<i>Proteus vulgaris</i> 56	0,3	0,3	6,7	1,7	5,3	5,3	1,3	0,3	< 0,007

Ejemplo 5: Resultados del ensayo de actividad hemolítica de PL-13

1. Procedimiento experimental

(1) Se diluyen las muestras en serie con PBS estéril a 1.000, 500, 250, 125, 64, 32, 16, 8, 4 µg/ml por turno y se extienden en placas de 96 pocillos, 100 µl por orificio.

(2) Se usó agua destilada como control positivo, PBS estéril como control negativo y orificio en blanco con 200 µl de solución de PBS añadida. Cada concentración anterior se realiza por triplicado.

(3) Se toman 3 ml de sangre entera de voluntarios sanos y se lavan con PBS estéril tres veces para preparar una suspensión de glóbulos rojos al 2 % de concentración nueva. Luego, se añaden 100 µl de suspensión de glóbulos rojos en cada orificio y se cultivan durante 4 horas a 37 °C en la incubadora. Tras la centrifugación en una centrifugadora con filtro de placas, se recoge el líquido sobrenadante y se mide la absorbancia (valor de DO) a una longitud de onda de 570 nm. Luego, se compara la eficiencia hemolítica de estas concentraciones.

(4) De acuerdo con el patrón de los documentos, el valor de DO que es superior a 0,1 es la concentración hemolítica.

2. Resultados

Resultados del ensayo de actividad hemolítica de PL-13 y otros péptidos antimicrobianos (mostrados en la Tabla 9).

Tabla 9. Resultados del ensayo de actividad hemolítica de los polipéptidos sometidos a ensayo (n = 3)

Concentración de péptidos antimicrobianos (µg/ml)	positivo	PL-13	PL-17	PL-26	PL-34	negativo	en blanco
1.000	0,416	0,310	0,339	0,327	0,317	0,093	0,059
500	0,406	0,220	0,152	0,121	0,135	0,074	0,037
250	0,402	0,184	0,082	0,089	0,087	0,070	0,052
125	0,400	0,117	0,078	0,075	0,073	0,077	0,053
62,5	0,394	0,090	0,065	0,068	0,061	0,077	0,059
31,25	0,392	0,065	0,063	0,057	0,054	0,071	0,044
15,625	0,380	0,059	0,056	0,047	0,041	0,088	0,047
7,8125	0,371	0,043	0,033	0,020	0,032	0,071	0,044

Los resultados muestran que los péptidos antimicrobianos PL-13, 17, 26, 34 casi tienen la misma velocidad de hemólisis, lo que demuestra que todas las formas farmacéuticas referidas en la presente invención tienen poca toxicidad hemolítica y, por tanto, tienen un brillante futuro de desarrollo.

Ejemplo 6: Ensayo antiinfeccioso del agente de aplicación externa PL-13/PL-18 en la piel

1. Cepas experimentales *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 y *Staphylococcus aureus* ATCC25923

2. Sistema experimental

Hay 50 ratones ICR macho con un peso de 20 ± 2 g. De acuerdo con su peso, se dividen aleatoriamente en 5 grupos de 10 ratones: grupo de control infectado negativo, grupo de control positivo de Bactroban, grupo de crema a concentración del 1 %, grupo de crema a concentración del 1 ‰ and y grupo de sustancia base en blanco. Cada grupo se cría en la misma caja de plástico. Se marcan sus partes en blanco, cabezas, cuellos, lomos y colas con el método de marcaje de ácido pícrico. Todos los ratones son criados con alimentos normales para animales en alojamientos para animales normales, y pueden beber agua libremente. La alternancia de la luz y la oscuridad se realiza cada 12 horas.

3. Agente aplicado externamente en la piel

Hay preparado del 1 % de concentración, del 1 ‰ de concentración, y preparado de la sustancia base en blanco (suministrada por Jiangsu ProteLight Pharmaceutical & Biotechnology Co., LTD.) y Bactroban (suministrado por SK&F).

4. Procedimiento experimental

(1) Se inoculan las cepas de bacterias que se conservan en nitrógeno líquido en placas de MHB y se cultivan durante la noche a 37 °C.

(2) Se inoculan las cepas sólidas en medio líquido MHB y se cultivan durante la noche con agitación a la velocidad de 220 rpm a 37 °C.

(3) Se diluye la suspensión bacteriana cultivada durante la noche a 5×10^6 UFC/ml y se aplica en reserva.

(4) Modelización de la piel: se afeita el lomo de los ratones y se depila con pasta depilatoria. Tras retirar el cabello, se raspan con papel de lija de 0,3 mm de longitud hasta el sangrado y se inyectan 0,1 ml de suspensión bacteriana con la concentración de 5×10^6 UFC/ml por vía subcutánea.

(5) Administración: se aplica a todos los grupos, a excepción del grupo de control infectado negativo, respectivamente, crema diferente con la dosis de 0,1 ml una vez, respectivamente, por la mañana y por la tarde durante 7 días.

(6) Tras 7 días, se recogen los órganos viscerales, la sangre y la piel infectada de los ratones mediante un método aséptico para contar las bacterias viables.

5. Resultados

Los resultados del recuento viable de los órganos viscerales y la sangre se muestran en la Tabla 10-11.

Tabla 10. El efecto del agente PL-13/18 aplicado externamente sobre la infección de la piel causada por *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (UFC/placa n = 10)

Grupos	Número de animales	Sangre entera	Piel (1:10)	Hígado (1:5)	Bazo (1:5)
Control infectado	10	304	35.925	157	70
Bactroban	10	12	1.032	12	16
PL-13 al 1 %	10	8	852	10	6
PL-13 al 1‰	10	11	1.005	12	14
PL-18 al 1%	10	16	997	9	8
PL-18 al 1‰	10	12	1.051	11	15
Control de sustancia base en blanco	10	224	25.280	121	27

Tabla 11. El efecto del agente PL-13/18 aplicado externamente sobre la infección de la piel causada por *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 (UFC/placa n = 10)

Grupos	Número de animales	Sangre entera	Piel (1:10)	Hígado (1:5)	Bazo (1:5)
Control infectado	10	129	10.762	87	34
Bactroban	10	28	439	23	15
PL-13 al 1 %	10	10	369	12	5
PL-13 al 1‰	10	18	425	10	17
PL-18 al 1%	10	16	276	17	5
PL-18 al 1‰	10	19	425	8	13
Control de sustancia base en blanco	10	94	9.802	50	30

Todos los resultados mencionados anteriormente indican que el agente aplicado externamente PL-13 y PL-18 son eficaces para inhibir la infección de la piel causada por *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

30 Ejemplo 7: Ensayo terapéutico de inyección de PL-18 en animales con infección generalizada

1. Animales experimentales

Hay 30 ratones ICR machos y 30 hembras con un peso que varía de 18 g a 22 g. De acuerdo con su peso, se dividen aleatoriamente en 6 grupos de 10 ratones: grupo de control en blanco, grupo de control negativo, grupo de control positivo de Levofloxacin, grupo de dosis alta de PL-13, grupo de dosis media de PL-13 y grupo de dosis baja de PL-13. Cada grupo se cría en la misma caja de plástico. Con el método de marcaje con trinitrofenal, todos los ratones son criados con alimentos normales para animales en alojamientos para animales normales, y pueden beber agua libremente. La alternancia de la luz y la oscuridad se realiza cada 12 horas.

2. Cepas infectadas: *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

3. Fármaco antiinfeccioso

5 Inyecciones de polvo liofilizado de PL-18 (suministradas por Jiangsu ProteLight Pharmaceutical & Biotechnology Co., LTD.), inyección de clorhidrato de levofloxacina y cloruro sódico (suministrada por Yangtze River Pharmaceutical Group) e inyección de cloruro sódico al 0,9 % (suministrada por Chifeng Rongjitang Pharmaceutical CO., Ltd.)

4. Procedimiento experimental

- 10 (1) La preparación de la suspensión bacteriana es la misma que la anterior.
 (2) Se diluye la suspensión de *Pseudomonas aeruginosa* cultivada durante la noche a 1×10^9 UFC/ml. Se diluye la suspensión de *Staphylococcus aureus* cultivada durante la noche a 1×10^8 UFC/ml. Todos se aplican en reserva.
 15 (3) Excepto el grupo de control en blanco, se inyectan en cada ratón 0,2 ml de suspensión de *Pseudomonas aeruginosa* con la concentración de 1×10^9 UFC/ml o 0,2 ml de suspensión de *Staphylococcus aureus* con la concentración de 1×10^8 UFC/ml por vía intraperitoneal para crear el modelo.
 (4) Administración: se inyectan los fármacos de acuerdo con el peso inmediatamente después de que el modelo esté listo. Se inyectan en todos los grupos excepto el grupo en blanco y el grupo negativo infectado diferentes dosis de diferentes inyecciones a través de la vena caudal dos veces al día sucesivamente durante tres días, y se observan durante catorce días.
 20 (5) Se observa la muerte de los animales y se registra su tiempo de supervivencia.

5. Resultados experimentales

25 En las Tablas 12-13, se muestran los efectos de la inyección de PL-18 sobre el tiempo de supervivencia de los ratones con infección sistémica de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

30 **Tabla 12. Efecto de la inyección de PL-18 sobre el tiempo de supervivencia de los ratones con infección sistémica de *Pseudomonas aeruginosa* (n = 10)**

Grupos	Número de animales	Fármacos	Dosis (mg/kg)	Mortalidad de los ratones en diferentes días después de la infección					Tiempo medio de supervivencia (día)
				1	2	3	4	5	
Control en blanco	10	Solución salina normal	-	0	0	0	0	0	-
Control negativo	10	-	-	6	4	0	0	0	1,4
Levofloxacina	10	ofloxacina	30	4	2	0	0	0	6,4**
PL-18 (alta)	10	PL-18	5	0	1	2	2	0	8,6**
PL-18 (media)	10	PL-18	1	0	1	2	2	1	7,7**
PL-18 (baja)	10	PL-18	0,2	0	2	1	2	2	6,7**

Tabla 13. Efecto de la inyección de PL-18 sobre el tiempo de supervivencia de los ratones con infección sistémica de *Staphylococcus aureus* (n = 10)

Grupos	Número de animales	Fármacos	Dosis (mg/kg)	Mortalidad de los ratones en diferentes días después de la infección					Tiempo medio de supervivencia (día)
				1	2	3	4	5	
Control en blanco	10	Solución salina normal	-	0	0	0	0	0	-
Control negativo	10	-	-	7	3	0	0	0	1,3
Levofloxacina	10	ofloxacina	30	5	2	0	0	0	5,4**
PL-18 (alta)	10	PL-18	5	0	1	1	1	2	9,9**
PL-18 (media)	10	PL-18	1	1	2	1	1	1	7,3**
PL-18 (baja)	10	PL-18	0,2	1	2	1	2	1	6,3**

Nota: en comparación con el grupo de control negativo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

35 Se sabe por las Tablas 12 y 13 que, hasta el final del experimento, el número medio de días de supervivencia de los ratones entre dosis alta, media y baja del grupo de control de PL-18 y el grupo de control positivo de Levofloxacina y

el grupo de control negativo son significativamente diferentes ($p < 0,01$). Esto ilustra que el efecto antiinfeccioso de la dosis alta, media y baja de PL-18 es muy bueno. En comparación con el grupo de control de Levofloxacina, como es evidente, el grupo de PL-18 es superior al grupo de control positivo.

5 Ejemplo 8: Ensayo terapéutico de preparados orales de PL-34 en animales con infección sistémica

1. Animales experimentales

Hay 30 ratones ICR machos y 30 hembras con un peso que varía de 18 g a 22 g. De acuerdo con su peso, se dividen aleatoriamente en 6 grupos de 10 ratones: grupo de control positivo de Tinidazol, tres grupos de PL-34, grupo de control negativo y grupo de control en blanco. Los grupos de reactivo PL-34 son grupo de dosis alta, media y baja. Con el método de marcaje con trinitrofenal, todos los ratones son criados con alimentos normales para animales en alojamientos para animales normales, y pueden beber agua libremente. La alternancia de la luz y la oscuridad se realiza cada 12 horas.

2. Cepas infectadas: *Escherichia* y *Bacillus dysenteriae*

3. Fármaco antiinfeccioso

Preparado oral de PL-34 (proporcionado por Jiangysu ProteLight Pharmaceutical and Biotechnology Co., Ltd.), Tinidazol (Shandong Lukang Pharmaceutical Group Saite Co., Ltd.), inyección de cloruro sódico al 0,9 % (suministrado por Chifeng Rongjitang Pharmaceutical CO., Ltd.).

4. Procedimiento experimental

- (1) La preparación de la suspensión bacteriana es la misma que la anterior.
- (2) Se diluye la suspensión de *Escherichia* cultivada durante la noche a 1×10^7 UFC/ml. Se diluye la suspensión de *Bacillus dysenteriae* cultivada durante la noche a 1×10^5 UFC/ml. Todas ellas se aplican en reserva.
- (3) Excepto el grupo de control en blanco, se inyectan en cada ratón 0,2 ml de suspensión de *Escherichia* con la concentración de 1×10^7 UFC/ml o 0,2 ml de suspensión de *Bacillus dysenteriae* con la concentración de 1×10^5 UFC/ml por vía intraperitoneal para crear el modelo.
- (4) Administración: los fármacos se administran de acuerdo con el peso de los ratones justo después de que el modelo esté listo. Todos los grupos excepto el grupo en blanco y el grupo de control negativo infectado reciben, mediante alimentación forzada, diferentes dosis de fármacos tres veces al día sucesivamente durante siete días, y se observan durante catorce días.
- (5) Se observa la muerte de los animales y se registra su tiempo de supervivencia.

5. Resultados experimentales

Resultados experimentales del comprimido de PL-34 sobre el tiempo de supervivencia de los ratones con la infección sistémica de *Escherichia* y *Bacillus dysenteriae*. (Tablas 14-15)

Tabla 14. Efecto del comprimido de PL-34 sobre el tiempo de supervivencia de los ratones con infección sistémica de *Escherichia* (n = 10)

Grupos	Número de animales	Fármacos	Dosis (mg/kg)	Mortalidad de los ratones en diferentes días después de la infección						Tiempo medio de supervivencia (día)
				4	5	6	7	8	9	
Control en blanco	10	Solución salina normal	-	0	0	0	0	0	0	
Control negativo	10	-	-	1	2	2	3	1	1	6,4
Tinidazol	10	Tinidazol	80	1	2	2	1	1	2	7,5*
PL-34 (alta)	10	PL-34	30	0	2	1	0	1	1	10,3**
PL-34 (media)	10	PL-34	10	0	2	2	1	1	1	8,8**
PL-34 (baja)	10	PL-34	3	1	1	2	1	2	2	7,6*

45

Tabla 15. Efecto del comprimido de PL-34 sobre el tiempo de supervivencia de los ratones con infección sistémica de *Bacillus dysenteria* (n = 10)

Grupos	Número de animales	Fármacos	Dosis (mg/kg)	Mortalidad de los ratones en diferentes días después de la infección						Tiempo medio de supervivencia (día)
				4	5	6	7	8	9	
Control en blanco	10	Solución salina normal	-	0	0	0	0	0	0	-
Control negativo	10	-	-	2	2	2	3	1	0	5,9
Tinidazol	10	Tinidazol	80	2	1	2	2	1	1	7,0*
PL-34 (alta)	10	PL-34	30	1	1	2	2	2	1	7,4*
PL-34 (media)	10	PL-34	10	1	1	2	2	2	1	8,3**
PL-34 (baja)	10	PL-34	3	1	2	2	2	1	1	7,1*

Nota: en comparación con el grupo de control negativo * $p < 0,05$; **en comparación con el grupo de control negativo ** $p < 0,01$

5 Se sabe, a partir de las Tablas 14 y 15, que hasta el final del experimento, el número medio de días de supervivencia de los ratones son aparentemente diferentes entre todos los grupos de dosis de PL-34, el grupo de control positivo de Tinidazol y el grupo de control negativo ($p < 0,01$ o $0,05$). Esto demuestra que el preparado oral de PL-34 tiene un mejor efecto curativo en ratones contra la infección por *Escherichia* y la por bacilo de disentería.

10 Ejemplo 9: Experimento terapéutico de la inyección de PL-18 en animales con infección múltiple mixta

1. Animales experimentales:

15 Hay 60 ratones ICR machos y 60 hembras con un peso que varía de 18 g a 22 g. De acuerdo con su peso, se dividen aleatoriamente en 6 grupos de 20 ratones: grupo de control en blanco, grupo de control negativo, grupo de control positivo de Levofloxacina, grupo de dosis alta, media y baja de PL-18. Con el método de marcaje con trinitrofenal, todos los ratones son criados con alimentos normales para animales en alojamientos para animales normales, y pueden beber agua libremente. La alternancia de la luz y la oscuridad se realiza cada 12 horas.

20 2. Cepas infectadas: *Candida albicans* y *Escherichia*

3. Fármacos antiinfecciosos

25 Inyección de polvo liofilizado de PL-18 (suministrada por Jiangsu ProteLight Pharmaceutical & Biotechnology Co., LTD.), inyección de clorhidrato de levofloxacina y cloruro sódico (suministrada por Yangtze River Pharmaceutical Group) e inyección de cloruro sódico al 0,9 % (suministrada por Chifeng Rongjitang Pharmaceutical CO., Ltd.).

4. Procedimiento experimental

- 30 (1) La preparación de la suspensión bacteriana es la misma que la anterior.
 (2) Se diluye la suspensión de *Candida albicans* cultivada durante la noche a 1×10^6 UFC/ml con cloruro sódico y 5×10^5 UFC de las que se inyectan en la cavidad abdominal de cada ratón; la suspensión de *Escherichia* cultivada durante la noche se diluye a 2×10^8 UFC/ml y 1×10^7 UFC de las que se inyectan en la cavidad abdominal de cada ratón para obtener un modelo con infecciones mixtas.
 35 (3) El grupo de control en blanco recibe por inyección solución salina normal en su cavidad abdominal, al grupo de control positivo se inyecta Levofloxacina en su cavidad abdominal.
 (4) Administración: los fármacos se administran de acuerdo con el peso inmediatamente después de que el modelo esté listo. Se inyectan en todos los grupos excepto el grupo en blanco y el grupo de control negativo infectado diferentes dosis de diferentes inyecciones a través de la vena caudal dos veces al día sucesivamente durante tres días, y se observan durante catorce días.
 40 (5) Se observa la muerte de los animales y se registra su tiempo de supervivencia.

5. Resultado experimental

45 Resultado experimental de la inyección de PL-18 sobre el tiempo de supervivencia de los ratones con infección mixta múltiple de *Candida albicans* y *Escherichia*. (Tabla 16).

Tabla 16. Efecto de la inyección de PL-18 sobre el tiempo de supervivencia de los ratones con infección mixta múltiple de *Candida albicans* y *Escherichia* (n = 20)

Grupos	Número de animales	Fármacos	Dosis (mg/kg)	Mortalidad de los ratones en diferentes días después de la infección					Tiempo medio de supervivencia (día)
				1	2	3	4	5	
Control en blanco	20	Solución salina normal	-	0	0	0	0	0	-
Control negativo	20	-	-	8	7	3	2	0	2,0
Levofloxacina	20	ofloxacina	30	8	6	2	0	0	3,9*
PL-18 (alta)	20	PL-18	5	5	5	2	1	2	5,3**
PL-18 (media)	20	PL-18	1	5	4	3	2	0	5,7**
PL-18 (baja)	20	PL-18	0,2	4	4	5	2	2	4,4*

Nota: en comparación con el grupo de control negativo * $p < 0,05$; **en comparación con el grupo de control negativo ** $p < 0,01$.

5 El resultado experimental de las infecciones mixtas múltiples muestra que, durante la observación de catorce días, los 20 ratones del grupo de control negativo murieron en el transcurso de los cuatro días posteriores a la creación de estos modelos (20/20). Los ratones de los grupos de dosis alta, media y baja sobrevivieron con diferente número: el tiempo medio de supervivencia del grupo de dosis alta es de 5,3 días, el tiempo de supervivencia medio del grupo de dosis baja es de 4,4 días, el tiempo de supervivencia medio del grupo de dosis media es de 5,7 días, todos estos son superiores al grupo de control positivo de ofloxacina.

10 Se sabe, a partir de la Tabla 16, que el número medio de días de supervivencia de los ratones entre el grupo de dosis media de PL-18, el grupo de dosis alta de PL-18 y el grupo de control negativo son sumamente diferentes ($p < 0,01$). Esto demuestra que la dosis alta y media de PL-18 tienen un buen efecto en la resistencia a la infección mixta múltiple. Las diferencias en el tiempo medio de supervivencia de los ratones entre el grupo de PL-18 de baja dosis, el grupo de control con levofloxacina y el grupo de control negativo son significativas ($p < 0,05$). Esto demuestra que el grupo de PL-18 de dosis baja y el grupo de control con levofloxacina tienen el mismo efecto antiinfeccioso, pero, como es evidente, el grupo de dosis media es superior al grupo de dosis alta. En general, la inyección de PL-18 a dosis de 1 mg/kg tiene el mejor efecto curativo en los ratones con infección mixta múltiple.

20 **Ejemplo 10: Técnica de preparación de inyección en agua de 1 mg/dosis (2 ml:1 mg) de PL-18 y series de péptidos antimicrobianos**

Ingredientes

PL-18 u otros péptidos antimicrobianos	1 g
Ácido etilendiamino-tetraacético disódico	3,5 g
Agua para inyección	2.000 ml
Producto final	1.000 dosis

25 Se añade un 60 % de agua para inyección a PL-18 u otros péptidos antimicrobianos, y se agita para disolverlos. Se agita y se disuelve el PL-18 prescrito u otros péptidos antimicrobianos en un 60 % del volumen total del agua prescrita para inyección. Se añade una aguja del 0,1 % de concentración con carbón activado a la solución, se calienta hasta 50 °C, se agita y se adsorbe durante treinta minutos, se filtra y se descarboniza, y se añade el resto del agua para inyección hasta el volumen total. Se esteriliza y se filtra. Tras comprobar la calidad de los productos intermedios, se introduce la solución en frascos. Se disponen los productos semiacabados de llenado en el armario de esterilización. La esterilización se realiza a 105 °C durante treinta minutos. Se envasan los productos esterilizados después de una inspección con luz cualificada para obtener los productos finales.

35 **Ejemplo 11: Preparación de 1 mg/dosis de inyección de polvo liofilizado de PL-18, etc.**

Ingredientes

PL-18 u otros péptidos antimicrobianos	1 g
Manitol	300 g
Agua para inyección	2.000 ml
Producto final	1.000 dosis

40 Se añade un 60 % de agua para inyección a manitol, y se agita para disolverlos. Se agita y se disuelve el manitol prescrito en un 60 % del volumen total del agua prescrita para inyección. A continuación, se agita y se disuelve PL-18 en la solución. Se añade una aguja del 0,05% de concentración con carbón activado a la solución, se agita y se adsorbe durante treinta minutos, se descarboniza y se filtra. Se añade el resto del agua para inyección a la solución. Mediante la esterilización y la filtración, se puede encontrar la materia extraña. Solo cuando se ha comprobado su

calidad, la solución se introduce en frascos y se liofiliza (método de congelación rápida). Se enciende la instalación del bloque en estado de vacío, se presiona el bloque con fuerza y se saca. Los frascos se cubren tras la fusión del polvo de tipo escarcha. Los frascos se envasan tras el examen visual cualificado.

5 **Ejemplo 12: Preparación de comprimido de 3 mg/unidad de PL-13 y series de péptidos antimicrobianos**

Ingredientes

PL-13 u otros péptidos antimicrobianos	3 g
Celulosa microcristalina	75 g
L-hidroxipropilcelulosa	75 g
Almidón de carboximetilo sódico	40 g
Polivinilpirrolidona	cantidad moderada
Alcohol	cantidad moderada
Estearato de magnesio	1 g
Producto acabado	1.000 comprimidos

10 Se mezclan 3 g de PL-13 u otros péptidos antimicrobianos, 75 g de excipiente de celulosa microcristalina, 75 g de L-hidroxipropilcelulosa y 30 g de almidón de carboximetilo sódico uniformemente. Se mezclan con PL-13 u otros péptidos antimicrobianos uniformemente con el método de incrementos iguales. Tomando la solución preparada de polividona al 5 % de concentración y alcohol al 50 % de concentración como adhesivo, se fabrican partículas con la técnica de granulación de pulverizado de fluidización. Se añaden 10 g de almidón de carboximetilo sódico y 1 g de
15 estearato de magnesio. Los productos finales se fabrican mezclando uniformemente y formando comprimidos.

Ejemplo 13: Técnica de preparación de pulverizado de 10 ml/frasco de PL-18 o series de péptidos antimicrobianos

20 **Ingredientes**

PL-18 u otros péptidos antimicrobianos	10 g
Hidrógeno-fosfato disódico	276 g
Ácido cítrico	129 g
Manitol	100 g
Agua para inyección	cantidad moderada
Producto final	1.000 frascos

Se añade PL-18 u otro péptido antimicrobiano al 40 % del volumen total de agua prescrita para inyección, y se agita para disolverlo. Se añaden manitol, fosfato disódico y ácido cítrico a la solución anterior, y se agitan para disolverlos.
25 Se añade el resto del agua para inyección a la solución para complementar el volumen. Se filtran con una membrana de filtro de 0,2 um y se prueba el producto intermedio. Tras comprobar su calidad, se introduce la solución en frascos. Tras una verificación completa, se envasan los frascos.

Ejemplo 14: Cápsula de 10 mg/píldora de PL-18 o series de péptidos antimicrobianos (0,3 g/píldora)

30 **Ingredientes**

PL-18 u otros péptidos antimicrobianos	10 g
Almidón	100 g
Goma arábica	90 g
Carboximetilcelulosa de sodio	90 g
Polvos de talco	7 g
Estearato de magnesio	3 g
Producto final	1.000 píldoras

35 Se tamizan las materias primas y los excipientes con malla 100, respectivamente. Se prepara pasta de almidón al 12 % de concentración de 10 g de almidón. Se mezclan uniformemente todas las materias primas y los excipientes, a excepción del polvo de talco y el estearato de magnesio, se añade pasta de almidón, se tamiza con malla 40 y se seca a una temperatura de entre 55 °C y 60 °C. Se tamizan las gotas secas con malla 40. Se mezclan con polvo de talco y estearato de magnesio uniformemente, y se disponen en cápsulas para obtener los productos finales.

40 **Ejemplo 15: Solución oral de 10 mg/frasco de PL-34, etc. (10 g/frasco)**

Ingredientes

PL-34 1	0 g
Sacarosa	2.000 g

Etilparabeno	100 g
Agua para inyección	10.000 g
Producto final	1.000 frascos

5 Se disuelve sacarosa en el 50 % del volumen total del agua prescrita para inyección. Se disuelven PL-34 u otros péptidos antimicrobianos en el 20 % del volumen total del agua prescrita para inyección, y se mezclan con solución de sacarosa uniformemente. Se disuelve etilparabeno en el 10 % del volumen total del agua prescrita para inyección que se ha calentado hasta 60 °C y se agita bien. Se añade a solución de sacarosa y se mezcla de manera uniforme. Se filtra y se esteriliza con una membrana microporosa de 0,2 µm. Tras comprobar su calidad, se introducen en frascos, obteniéndose los productos finales.

10 **Ejemplo 16: Pomada de 0,5 mg/g de PL-13 u otros péptidos antimicrobianos (5 g/unidad)**

Ingredientes

PL-13, etc.	0,1 g
Macrogol 4000	480 g
Macrogol 400	320 g
Azone	10 g
Tween 80	15 g
Agua para inyección	175 g
Producto final	1.000 g

15 Se calientan Macrogol 4000 y Macrogol 400 hasta 60 °C en un baño de agua controlado con termostato y se agitan bien. Se mezcla Azone con Tween 80 de manera uniforme, y luego se añaden a la solución de Macrogol para agitarla bien, y se conserva a temperatura ambiente. Se disuelve PL-13, etc. en agua para inyección, y se agita con la mezcla de Macrogol con el método de incrementos iguales. Tras comprobar su calidad, se introducen en frascos, obteniéndose los productos finales.

20 **Ejemplo 17: Crema de 1 mg/g de PL-18, etc. (5 g/unidad)**

Ingredientes

PL-18, etc.	1 g
Estearina	35 g
Ácido esteárico	120 g
Parafina líquida	60 g
Vaselina blanca	10 g
Lanolina	50 g
Trietanolamina	4 ml
Hidroxibenzoato etílico	1 g
Agua destilada	Cantidad moderada
Producto final	1.000 g

25 Se calientan los ingredientes prescritos de la fase oleosa (incluyendo estearina, ácido esteárico, parafina líquida, vaselina y lanolina) hasta 80 °C y se mantienen calientes. Se añaden las materias primas a los ingredientes de la fase acuosa (trietanolamina e hidroxibenzoato etílico disueltos en agua destilada), se agitan bien y se calientan hasta 80 °C. Se añade la mezcla de la fase oleosa a la mezcla de la fase acuosa, y se agitan, formándose una crema. Se conserva a temperatura ambiente y se usa para llenar tubos. Así se obtiene el producto final.

30 **Ejemplo 18: gel de 5 mg/unidad de PL-18, etc. (5 g/unidad)**

Ingredientes:

PL-18, etc.	1 g
Carbómero 940	10 g
Propilenglicol	200 g
Glicerol	100 g
Trolamina	cantidad moderada
Agua para inyección	680 g
Producto final	1.000 g

35 Se emulsionan por completo el glicerol, propilenglicol y carbómero 940 prescritos para humedecerlos. Se añaden 300 g de agua para inyección a la mezcla anterior para que se hinche. Se agita para mezclarlos uniformemente. Se añade trolamina a la mezcla para convertirla en gel. Se disuelven las materias primas prescritas en el resto del agua

para inyección, se añaden a la sustancia de gel y se agitan bien. Tras comprobar su calidad, se introducen en frascos. De este modo, se obtiene el producto final.

Ejemplo 19: gotas oftálmicas de 5 mg/frasco de PL-18, etc. (5 ml/frasco)

5 **Ingredientes:**

PL-18, etc.	1 g
Ácido etilendiamino-tetraacético disódico	0,2 g
Hidroxibenzoato etílico	0,15 g
Hidroxibenzoato metílico	0,1 g
Agua para inyección	994 ml
Producto final	1.000 ml

10 Se calienta el 20 % del agua prescrita para inyección hasta 60 °C, con la adición del hidroxibenzoato etílico y el hidroxibenzoato metílico prescritos. Se agitan para su disolución y se conservan a temperatura ambiente. Se disuelven las materias primas prescritas y ácido etilendiamino-tetraacético disódico en el 60 % del agua prescrita para inyección, y se agitan bien. Se mezclan con la solución de hidroxibenzoato etílico e hidroxibenzoato metílico, se dispone el resto del agua para inyección en la mezcla y se agita hasta que se mezcla bien. Se filtra y se esteriliza con la membrana microporosa. Tras comprobar su calidad, se introducen en frascos. De este modo, se obtiene el producto final.

15 **Ejemplo 20: Aerosol de 50 mg/frasco de PL-26, etc. (20 g/frasco)**

Ingredientes:

PL-26, etc.	2,5 g
Laurocapram	1 g
Tween 80	1,5 g
Hidroxibenzoato etílico	1 g
Agua para inyección	994 ml
Producto final	1.000 ml

20 Se disuelven las materias primas en un 60 % del agua prescrita para inyección y se agitan bien. Se disuelve hidroxibenzoato etílico en un 10 % del agua prescrita para inyección que se ha calentado hasta 60 °C. Se mezcla la solución de materias primas con la solución de hidroxibenzoato etílico. Se añade Laurocapram y Tween 80 uniformemente mezclados a la solución mezclada, y se añade agua para inyección hasta 1.000 ml. Tras comprobar su calidad, se introducen en frascos de pulverización. De este modo, se obtiene el producto final.

Ejemplo 21: Parche de 3 mg/unidad de PL-13, etc.

30 **Ingredientes:**

PL-13, etc.	3 g
Ácido poliacrílico	30 g
Glicerol	120 g
Aminoacetato de dihidroxialuminio	1,5 g
Ácido etilendiamino-tetraacético disódico	0,15 g
Ácido tartárico	1 g
Agua para inyección	220 g
Producto final	1.000 unidades

35 Se añade el ácido poliacrílico prescrito a glicerol, aminoacetato de dihidroxialuminio y edatamil disódico, y se extienden bien, a lo que se denomina A. Se agitan las materias primas y se disuelven en agua para inyección y ácido tartárico, y se añaden a A lentamente mientras se agita para hacer que se reticulan. Se extienden sobre la capa de soporte, se cubren con una membrana protectora y se solidifican durante veinticuatro horas a temperatura ambiente. Se cortan, obteniéndose los productos finales.

Ejemplo 22: Lavado de 0,5 mg/frasco de PL-13, etc. (50 ml/frasco)

40 **Ingredientes:**

PL-13, etc.	0,01 g
Mentol	1 g
Benzoato sódico	1 g
Agua para inyección	997 ml
Producto final	1.000 ml

Se disuelven PL-13 y otras materias primas en el 60 % del agua prescrita para inyección y se agitan bien. Se disuelven benzoato sódico y mentol en agua, se añaden al licor mixto anterior y se añade agua para la solución hasta 1.000 ml. Se agitan para su completa disolución. Tras comprobar su calidad, se introducen en frascos. De este modo, se obtiene el producto final.

5

Listado de secuencias

<110> Jiangsu ProteLight Pharmaceutical & Biotechnology Co., Ltd

<120> PÉPTIDO ANTIBIÓTICO Y MÉTODO DE PREPARACIÓN DEL MISMO, Y APLICACIÓN DEL MISMO

10

<130> 13158/PCT/EP-ml

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

15

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Secuencia artificial

25

<400> 1

Phe Lys Lys Leu Lys Lys Leu Phe Ser Lys Leu Trp Asn Trp Lys
 1 5 10
 15

REIVINDICACIONES

1. Un péptido antimicrobiano con secuencia de aminoácidos de Ac-F-K-K-L-K-K-L-F-S-K-L-W-N-W-K-NH₂ (SEQ ID NO: 1).
- 5 2. El péptido antimicrobiano de la reivindicación 1, **caracterizado por que** W de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido antimicrobiano está sustituido con L.
- 10 3. El péptido antimicrobiano de la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicho péptido antimicrobiano comprende enantiómeros L enteros y enantiómeros D enteros.

PL-13: Ac-FKKLKKLFSKLWNWK-NH₂

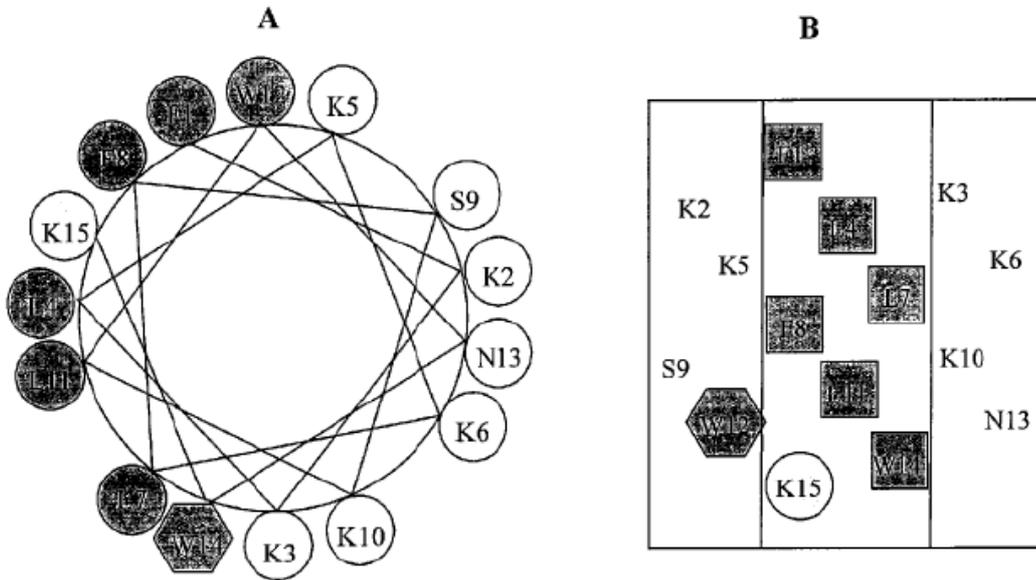


Fig. 1

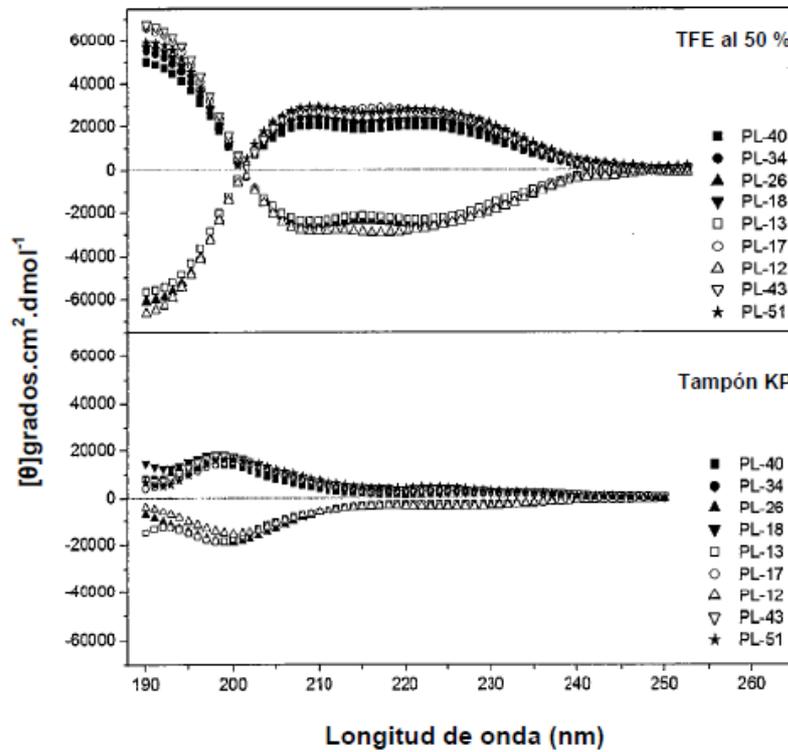


Fig. 2

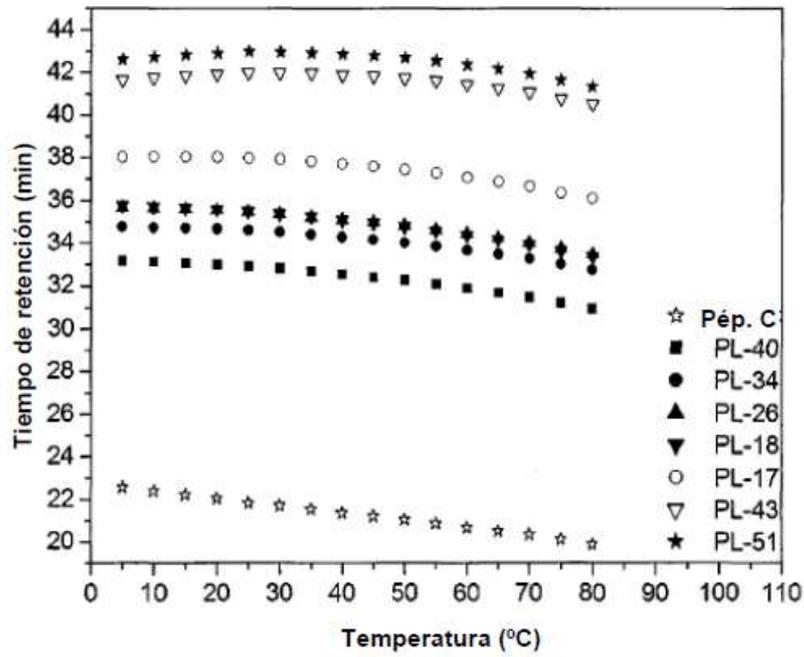


Fig. 3

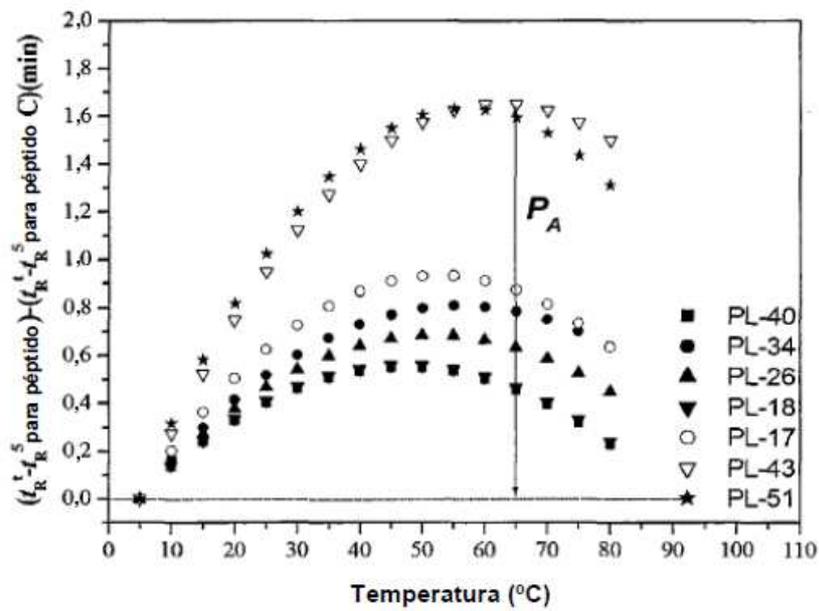


Fig. 4