

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390593** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2024.02.07

(51) Int. Cl. *C07K 14/435* (2006.01)  
*A61K 38/17* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.11.18

---

(54) **ПЕПТИДНЫЕ МОЛЕКУЛЫ С ПРОТИВОМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРОТИВ ПАТОГЕНОВ С МУЛЬТИЛЕКАРСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ**

---

(31) 2020-0086

(32) 2020.11.19

(33) CU

(86) PCT/CU2021/050011

(87) WO 2022/105948 2022.05.27

(88) 2022.10.20

(71) Заявитель:

**СЕНТРО ДЕ ИНВЕСТИГАСИОН  
И ДЕСАРРОЛЛО ДЕ  
МЕДИКАМЕНТОС. СИДЕМ (CU)**

(72) Изобретатель:

**Монтеро-Алехо Вивиан, Пердомо-  
Моралес Роландо, Васкес-Гонсалес  
Аманда, Гарай-Перес Хильда Элиза  
(CU)**

(74) Представитель:

**Рыбина Н.А. (RU)**

---

(57) В настоящем изобретении описаны синтетические пептидные соединения, которые позволяют бороться с патогенными микроорганизмами бактериальной природы, которые являются микроорганизмами с мультирезистентностью к традиционным антибиотикам. Дополнительно в нем описаны варианты комбинированной терапии, включающие указанные пептиды. Описаны фармацевтические композиции, содержащие пептидные соединения и их комбинации; а также применения и способы лечения, в которых их можно использовать.

---

**A1**

**202390593**

**202390593**

**A1**

# ПЕПТИДНЫЕ МОЛЕКУЛЫ С ПРОТИВОМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРОТИВ ПАТОГЕНОВ С МУЛЬТИЛЕКАРСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ

5

## ОПИСАНИЕ

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к пептидным молекулам, комбинациям и фармацевтическим композициям, содержащим их; а также к их применению в производстве лекарственных препаратов и в способах лечения бактериальных инфекций.

10

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Резистентность к антибиотикам возникает, когда у возбудителей, таких как бактерии и грибки, развивается способность к преодолению или уклонению от действия лекарств, разработанных для их уничтожения. Это означает, что возбудители не гибнут и продолжают расти. Инфекции, вызываемые резистентными к антибиотикам возбудителями, трудно, а иногда и невозможно, лечить. Если к этому добавить, что в большинстве случаев резистентных к антибиотикам инфекций необходимы длительная госпитализация, дополнительные визиты для последующего медицинского наблюдения и дорогие и токсичные альтернативные варианты лечения, сложность проблемы становится даже большей. Резистентность к антибиотикам не означает что организм становится резистентным к антибиотикам, как это происходит в случае резистентности при других заболеваниях; правильнее сказать, что бактерии становятся резистентными к антибиотикам, разработанным для их уничтожения. Эту проблему нельзя решить путем увеличения вводимой дозы антибиотиков, что также представляет добавочный риск возникновения токсичности. Резистентность к антибиотикам затрагивает людей на любой стадии жизни, а также системы здравоохранения, ветеринарии и сельского хозяйства, что делает ее одной из наиболее серьезных и неотложных связанных со здоровьем проблем по всему миру. Хотя риска резистентных инфекций невозможно полностью избежать, некоторые люди подвержены большему риску, чем другие, например, имеющие хронические заболевания. Если антибиотики теряют свою эффективность, мы теряем способность лечить инфекции и контролировать угрозу для здоровья населения (<https://www.cdc.gov/drugresistance/intl-activities/amr-challenge.html>). Кроме того, в

35

большинстве различных случаев неинфекционных заболеваний медики также полагаются на возможность предотвращения инфекций посредством применения антибиотиков, например, при замене суставов, трансплантации органов, противовоспалительной терапии, раке и при лечении хронических заболеваний, таких как диабет, астма и ревматоидный артрит.

Были предприняты значительные меры в направлении применения антибиотиков в комбинации с адъювантами, нацеленными на важные метаболические пути и механизмы, которые участвуют в развитии резистентности к традиционным антибиотикам (пермеабилizаторами, ингибиторами лактамазы, ингибиторами эффлюксного насоса, ингибиторами бактериального чувства кворума, ингибиторами токсинов и т. д.). Достигнутый на сегодняшний день умеренный успех с такими комбинациями антибиотиков и адъювантов подготовил почву для изучения других альтернативных вариантов для борьбы с резистентностью к этим лекарственным средствам.

С начала 2017 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) публикует перечень приоритетных патогенов по всему миру, включающий 12 резистентных к лекарственным средствам бактерий, для которых существует неотложная потребность в антибиотиках. Этот отчет подчеркивает важность и акцентирует внимание на необходимости разработки новых антибиотиков против мультирезистентных грамотрицательных бактерий (смотрите <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>). К микроорганизмам, среди которых наблюдается наибольшая частота резистентности к антибиотиками, относятся вид *Acinetobacter baumannii*, резистентный к карбапенемам, вид *Pseudomonas aeruginosa*, резистентный к карбапенемам, и виды *Enterobacteriaceae*, резистентные к карбапенемам и вырабатывающие ESBL. Кроме того, упоминаются другие микроорганизмы со средней частотой, такие как вид *Enterococcus faecium*, резистентный к ванкомицину, и вид *Staphylococcus aureus*, резистентный к метициллину.

Способность противомикробных пептидов (AMP) взаимодействовать с бактериальной мембраной и вызывать клеточный лизис делает их перспективной альтернативой для борьбы с явлением резистентности патогенов к традиционным антибиотикам [Mulani, MS, et al., Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in microbiology*, 2019. 10: р. 539-539]. Мембранолитический механизм природных AMP представляет

потенциально перспективную терапевтическую альтернативу, поскольку механизмы резистентности к конкретным лекарственным мишеням появляются быстро [Mourtado, R., et al., Design of stapled antimicrobial peptides that are stable, non-toxic and kill antibiotic-resistant bacteria in mice. *Nature Biotechnology*, 2019. 37 (10): p. 1186-1197]. В этом смысле сегодня необходимость в новых внешних противоионных агентах является более неотложной для борьбы с инфекционными заболеваниями и, в частности, с теми, которые остаются неразрешенными и/или вызваны микроорганизмами с мультилекарственной резистентностью.

10 В общем случае AMP являются селективными в отношении отрицательно заряженных бактериальных мембран, таких как у бактерий, и при этом их цитотоксичность является умеренной в отношении эукариотических организмов, несущих нейтральный заряд на поверхности. Отличительным элементом антибактериального механизма AMP является их взаимодействие с

15 цитоплазматической мембраной, следовательно, заряд и гидрофобность являются ключевыми свойствами для развития противомикробной активности. После связывания пептида с мембраной механизм действия в общем случае включает образование литических пор или дестабилизацию мембраны посредством образования пептидных агрегатов. Другой нелитический механизм включает

20 деполяризацию клеток и транслокацию в цитозоль, а также связывание с внутриклеточными мишенями (нуклеиновыми кислотами, ферментами и т. д.) [Hale, J.D. and R.E. Hancock, Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2007. 5 (6): p. 951-9.].

Отсутствуют данные о терапевтических кандидатах из природных матриц из

25 гемолимфы ракообразных видов рода *Panulirus*. Недавно было описано наличие нового семейства противомикробных пептидов  $\beta$ -типа дефензинов в гемоцитах лангуста *Panulirus argus* [Montero-Alejo, V., et al., Defensin-like peptide from *Panulirus argus* relates structurally with beta-defensin from vertebrates. *Fish Shellfish Immunol*, 2012. 33 (4): p. 872-9.] [Montero-Alejo, V., et al., Panusin represents a new

30 family of beta-defensin-like peptides in invertebrates. *Dev Comp Immunol*, 2017. 67: p. 310-321]. Также у этих ракообразных выявили новое семейство ингибиторов трипсин-подобных протеаз, которые регулируют систему активации профенолоксидазы [Perdomo-Morales, R., et al., The trypsin inhibitor panulirin regulates the prophenoloxidase-activating system in the spiny lobster *Panulirus argus*. *J Biol Chem*, 2013. 288 (44): p. 31867-79] [WO / 2013/113296. PERDOMO, M.R., et al.,

35

Composition from lobster hemocyte extract for detection of lipopolysaccharides, peptidoglycans, and 1,3-beta-d-glucans. 2014.] Как отмечено выше, явление мультилекарственной резистентности (МЛР) у патогенов и отсутствие новых терапевтических альтернатив, которые позволили бы решить эту проблему, делает необходимым поиск новых молекул с противомикробной активностью и новыми механизмами действия.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложены синтетические пептидные последовательности из группы, содержащей последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, с потенциальными терапевтическими применениями в предотвращении и лечении микробных инфекций, вызываемых бактериями с мультилекарственной резистентностью.

В изобретении дополнительно предложена комбинированная терапия для пациента с бактериальной инфекцией для контроля развития явления мультирезистентности, которая включает введение пациенту по меньшей мере 2 последовательностей, выбранных из группы, содержащей SEQ ID NO: 1–3. Также предложена комбинированная терапия, включающая введение пациенту последовательности, выбранной из группы, содержащей SEQ ID NO: 1–3, с бета-лактамым антибиотиком. И конкретнее, предложена комбинированная терапия, в которой классом бета-лактамыных антибиотиков являются карбапенемы.

Другим предметом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая пептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1–3, в качестве активного ингредиента и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов. Другим предметом изобретения является фармацевтическая композиция, которая дополнительно содержит второй пептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1–3, в качестве активного ингредиента. Другим предметом изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая пептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1–3, и также бета-лактамыный антибиотик. В конкретном варианте осуществления этого случая антибиотик представляет собой меропенем.

Описанные в настоящем изобретении пептиды можно применять для производства лекарственных средств для лечения бактериальных инфекций. Отличительным аспектом настоящего изобретения является его применение в лечении инфекций, вызываемых конкретно грамотрицательными бактериями. Конкретной формой

реализации изобретения является его терапевтическое применение в лечении инфекций, вызываемых штаммами патогенов, относящихся к группе ESKAPE, например, вид *Klebsiella pneumoniae*, вид *Acinetobacter baumannii*, вид *Pseudomonas aeruginosa* и вид *Escherichia coli*, и конкретнее, для клинических изолятов указанных видов, мультирезистентных к традиционным антибиотикам.

Другим конкретным аспектом настоящего изобретения является его применение в лечении инфекций, вызываемых грамположительными бактериями. Конкретными формами реализации изобретения было бы его применение в лечении инфекций, вызываемых патогенными штаммами, выбранными из группы из вида *Enterococcus faecium* или вида *Staphylococcus aureus*, и конкретнее, для клинических изолятов указанных видов, мультирезистентных к традиционным антибиотикам.

Другим предметом настоящего изобретения является способ лечения или предотвращения микробной инфекции, который включает введение пептида, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1–3, любой из комбинаций или фармацевтических композиций. В конкретном варианте осуществления инфекция вызвана патогенным штаммом, относящимся к группе ESKAPE.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. Очистка посредством ОФ-ВЭЖХ и проверка последовательности посредством ИЭР-МС/МС: а) SEQ ID NO: 1; б) SEQ ID NO: 2; в) SEQ ID NO: 3.

Фиг. 2. Оценка токсичных эффектов пептидов SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 на разные типы клеток. А) Процент гемолиза, определенный *in vitro* при разных концентрациях пептидов, для эритроцитов крыс линии Wistar. Б) Процент жизнеспособности клеток, определенный *in vitro* при разных концентрациях пептидов, для линии клеток Hep2. Использовали концентрации пептидов для охвата значений, в до 10 раз превышающих значения для 90 % летальной концентрации (LD<sub>90</sub>) бактериального роста.

Фиг. 3. Оценка времени гибели бактерий *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*: А) SEQ ID NO: 1, Б) SEQ ID NO: 2, В) SEQ ID NO: 3. В каждом случае использовали антибиотик меропенем для сравнения времени гибели бактерий *K. pneumoniae* и антибиотик цiproфлоксацин для бактерий *P. aeruginosa*. 3-log снижение числа колоний за время оценки демонстрирует летальный эффект на выбранные бактерии.

Фиг. 4. Ингибирование ЛПС-индуцированного высвобождения IL-6 из культуры цельной крови человека в присутствии пептидных последовательностей: А) SEQ ID

NO: 1, Б) SEQ ID NO: 2, В) SEQ ID NO: 3 и сравнение с ЛПС-нейтрализующей активностью полимиксина В (РМВ) в качестве референтного значения.

Фиг. 5. ЛПС-нейтрализующая активность пептидов, определенная методом лизата амебоцитов мечехвоста (LAL). Разные концентрации пептидов инкубировали с ЛПС (0,5 ЕЭ/мл). Метод LAL позволяет определять наличие активного ЛПС (процент восстановления) в присутствии пептидов. Дозозависимое ингибирование ответа в анализе LAL получают при стимуляции ЛПС в диапазоне концентраций 2 нМ – 20 мкМ для каждого пептидного варианта.

## 10 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложена альтернатива на основании новых синтетических пептидных соединений, которые позволяют бороться с патогенными микроорганизмами бактериальной природы, которые являются мультирезистентными микроорганизмами к традиционным антибиотикам. Неожиданно химерные гибридные структуры, сконструированные из разных семейств природных пептидов, выявленных в гемоцитах лобстера *P. argus*, демонстрируют противомикробную активность против штаммов с мультирезистентностью к антибиотикам, которые включают вид *Enterococcus faecium*, вид *Staphylococcus aureus*, вид *Klebsiella pneumoniae*, вид *Acinetobacter baumannii*, вид *Pseudomonas aeruginosa* и вид *Escherichia coli*.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения представлен перечень аминокислотных последовательностей, которые выбраны из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3, или пептидная структура с по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1–3.

В предпочтительном варианте осуществления выбранные последовательности, содержащиеся в группе SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3, получают посредством химического синтеза с использованием методологии твердофазного пептидного синтеза (ТФПС). Это означает, что в первичной структуре этих последовательностей присутствует по меньшей мере 6 аминокислот, соответствующих аргинину или лизину, которые могут находиться в L или D-формах, и при этом в предпочтительном варианте осуществления полученные последовательности должны содержать по меньшей мере четыре остатка аргинина.

В настоящем изобретении описана комбинированная терапия, которая включает по меньшей мере одну из выбранных последовательностей, содержащихся в группе SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3. В указанной комбинированной терапии пептиды могут находиться в одном составе или в разных составах, которые можно вводить одновременно или последовательно.

В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один синтетический пептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3, в качестве активного ингредиента и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов.

В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложено применение последовательностей SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3 в предотвращении и/или лечении микробных инфекций у субъекта. Пептидные последовательности по настоящему изобретению являются антибактериальными средствами широкого спектра действия, поскольку они оказывают литический эффект на грамотрицательные и грамположительные бактериальные штаммы, которые вызывают инфекции у людей и/или животных.

В предпочтительном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено применение указанных пептидных последовательностей SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3 в качестве ингибиторов бактериального роста и с бактериальной активностью против патогенных микроорганизмов, выбранных из группы из вида *Enterococcus faecium*, вида *Staphylococcus aureus*, вида *Klebsiella pneumoniae*, вида *Acinetobacter baumannii*, вида *Pseudomonas aeruginosa* и вида *Escherichia coli*.

В предпочтительном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено применение пептидных последовательностей SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3 в качестве ингибиторов мультирезистентных патогенных микроорганизмов, таких как вид *Enterococcus faecium*, вид *Staphylococcus aureus*, вид *Klebsiella pneumoniae*, вид *Acinetobacter baumannii*, вид *Pseudomonas aeruginosa* и вид *Escherichia coli*. Следовательно, все микроорганизмы с мультирезистентностью к антибиотикам были чувствительны к пептидным соединениям, демонстрируя значения  $CL_{90}$  в диапазоне 1,0–8,0 мкМ в методе кинетического микроразведения.

В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложено применение пептидных последовательностей SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2 и/или

SEQ ID NO: 3 для обеспечения 3-log снижения исходной бактериальной нагрузки за время, составляющее менее 30 минут. Факт состоит в том, что они обеспечивают быстрое действие в достижении снижения бактериальной нагрузки по сравнению с антибиотиками меропенемом и ципрофлоксацином против выбранных бактерий

5 *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 1003) и *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027).

В предпочтительном варианте осуществления проиллюстрировано, что пептидные последовательности SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3 демонстрируют активность нейтрализации липополисахарида или ЛПС, основного и токсичного компонента внешней мембраны грамотрицательных бактерий.

10 Предпочтительно пептидные последовательности ингибируют ЛПС-индуцированное высвобождение провоспалительных цитокинов в культуре цельной крови и ингибируют ЛПС-ответ на реагент LAL (лизат амёбоцитов мечехвоста).

В изобретении дополнительно предложен вариант осуществления, который иллюстрирует синергетический антибактериальный эффект, получаемый от комбинаций SEQ ID NO: 1- SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 1- SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 2- SEQ ID NO: 3 в *in vitro* культуре обладающих мультирезистентностью к антибиотикам штаммов вида *Klebsiella pneumoniae* и вида *Staphylococcus aureus* из клинических изолятов.

20 В настоящем изобретении дополнительно предложен способ лечения субъекта, у которого диагностирована микробная инфекция, который включает введение терапевтически эффективного количества одного из пептидов, выбранных из группы из SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3. В предпочтительном варианте осуществления указанная инфекция представляет собой инфекцию,

25 вызываемую грамотрицательными и грамположительными бактериями, обладающими мультирезистентностью к традиционным антибиотикам. В настоящем изобретении дополнительно предложено, что указанный способ лечения гарантирует более быстрый антибактериальный ответ в случае комбинации выбранных пептидов с последовательностями SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2 и/или

30 SEQ ID NO: 3 с антибиотиком карбапенемом в *in vitro* культуре штаммов вида *Klebsiella pneumoniae* и вида *Staphylococcus aureus* из клинических изолятов.

## ПРИМЕРЫ

### Пример 1.

Для пептидного синтеза использовали смолу Chemmatrix (замена 0,7 ммоль/г), функционализированную спейсером Fmoc-Am-OH. Следующие компоненты использовали в качестве защитных групп для боковых цепей аминокислот: Тритил (Trt) для Cys, Asn, His и Gln; 2,2,4,6,7-пентаметил-дигидробензофуран-5-сульфонил (Pbf) для Arg; Boc для Lys; tBu для Ser, Thr, Asp, Tyr и Glu. Fmoc-группу, защищающую N $\alpha$ -аминогруппу, удаляли путем обработки 20 % раствором пиперидина в ДМФ (2 x 10 мин). После каждого шага снятия защиты проводили промывку ДМФ 4 раза в течение 5 минут. Сочетание каждой аминокислоты и спейсера проводили методом активации ДИК/оксима (этил-2-циано-2-(гидроксимино)ацетатом). Использовали четыре эквивалента реагентов и ДМФ в качестве растворителя. Завершение реакции сочетания подтверждали методом с использованием нингидрина, который чувствителен к наличию аминогрупп [Kaiser, E., et al., Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem*, 1970. 34 (2): p. 595-8]. Все промывки и реакции проводили с механическим встряхиванием, а растворители или реагенты удаляли посредством вакуумной фильтрации. Снятие защиты с аминокислотных боковых цепей и отделение пептида от смолы проводили посредством обработки раствором ТФУ/Н<sub>2</sub>О/ЭДТ/ТИС (94/2,5/2,5/1) (для пептидов, содержащих Cys или Met) в течение двух часов при 25 °С. Несвязанный пептид, растворенный в ТФУ, осаждали в эфире, охлажденном до -20 °С, перерастворяли в 40 % растворе ацетонитрила в воде и лиофилизировали. После этого последовательность подтверждали с помощью процесса, описанного González et al [Gonzalez, J., et al., Effect of the position of a basic amino acid on C-terminal rearrangement of protonated peptides upon collision-induced dissociation. *J Mass Spectrom*, 1996. 31 (2): p. 150-8.] ИЭР-МС-спектры получали на спектрометрах Q-ToF 1 или Q-ToF 2 с ортогональной гибридной конфигурацией (Micromass, England) с источником ионизации нанораспылением. Раствор йодида натрия и цезия использовали в качестве референтного образца для калибровки спектрометра. Программу Masslynx версии 3.5 (Micromass, England) использовали для обработки масс-спектров. И наконец, проводили препаративную очистку пептидов, соответствующих сконструированной последовательности. Очистку методом препаративной ОФ-ВЭЖХ проводили на оборудовании LabChrom (Merck Hitachi, Germany). Использовали колонку RP-C18 (Vydac, 25 x 250 мм, 25 мкм) и проводили разделение из линейного градиента от 15 до 45 % подвижной фазы В в течение 50 мин при скорости потока 5 мл/мин. Использовали композицию из подвижной фазы А: 0,1 % ТФУ в воде (об/об.) и

подвижной фазы В: 0,05 % ТФУ в ацетонитриле (об/об.). Вводили по 50 мг каждого неочищенного пептида. Хроматограммы получали на длине волны 226 нм.

### Пример 2.

#### 5 Оценка противомикробного эффекта *in vitro* против МЛР

Из клинических бактериальных изолятов *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* на LB-агаровых клиньях часть высевали в жидкую среду Мюллера — Хинтона (МН) и оставляли расти при 37 °С на орбитальном шейкере при 180  
10 об/мин в течение ночи. После этого готовили рабочую культуру путем инокуляции 100 мкл растущих бактерий в 5 мл МН и инкубировали при 37 °С в течение 2 или 3 часов. Рост останавливали, когда культура достигала оптической плотности (ОП) на 650 нм от 0,45 до 0,55. В этом диапазоне ОП считается, что культура имеет концентрацию 10<sup>8</sup> КОЕ/мл [Ericksen, B., et al., Antibacterial activity and specificity  
15 of the six human {alpha} -defensins. Antimicrob Agents Chemother, 2005. 49 (1): p. 269-75]. Бактериальную суспензию разводили до 10<sup>6</sup> КОЕ/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и использовали как рабочую культуру. Пептиды растворяли в стерильном ФБ до необходимой концентрации и вносили 50 мкл в стерильный 96-луночный полипропиленовый планшет (Eppendorf, Germany). Проводили  
20 двукратные серийные разведения пептидов (в двух повторах) в ФБ и в каждую лунку вносили 50 мкл рабочей культуры. Планшет инкубировали в течение 2 часов при 37 °С, чтобы обеспечить возможность взаимодействия пептидов с бактериальной мембраной. После этого во все лунки добавляли 100 мкл вдвойне концентрированной среды МН и кинетически отслеживали микробный рост  
25 посредством регистрации ОП на 650 нм каждые 5 минут в течение 15 часов при 37 °С с использованием микропланшетного ридера (BioTek Instruments, USA). И наконец, анализировали кривые роста, и при этом математическая обработка данных позволила получить взаимосвязь между концентрацией пептида и процентом выживаемости в терминах КОЕ. Посредством аппроксимации данных  
30 уравнением типа Log [пептид] в зависимости от ответа в ОП можно определить летальную концентрацию 90 % микробного роста (LC<sub>90</sub>) (таблица 1). Таким образом было получено среднее значение CL<sub>90</sub> по трем независимым экспериментам для бактериальной культуры для каждой последовательности против штаммов мультирезистентных грамотрицательных и грамположительных  
35 микроорганизмов из клинических изолятов.

Таблица 1. Значения выражены в летальной концентрации 90 % бактериальной культуры (LC<sub>90</sub>) для SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 для мультирезистентных штаммов (из группы ESKAPE ) из клинических изолятов. Значения представляют диапазон концентраций, полученных из независимых экспериментов.

МЛР клинический изолят	LC <sub>90</sub> мкМ					
	Грамотрицательные				Грамположительные	
Пептиды	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecium</i>
SEQ ID NO: 1	2–8	1-4	2–8	2–8	1-4	4–8
SEQ ID NO: 2	1-4	1-4	1-4	2–8	1-4	2–8
SEQ ID NO: 3	2–8	1-4	1-4	4–8	2–8	4–8

### Пример 3.

#### Оценка цитотоксичности

10 Гемолитическую активность пептидов оценивали в эритроцитах крыс линии Wistar. Полученную кровь дополняли гепарином в устройстве для сбора (Monovette, Sarstedt, Germany). Кровь центрифугировали при 1000 x g в течение 10 мин при 25 °C (Hettich, Germany), а осадок из эритроцитов три раза последовательно промывали стерильным солевым раствором. Бесплазменные эритроциты разводили

15 в солевом растворе до конечной концентрации 4 % (об./об.). Двукратные серийные разведения каждого пептида смешивали с эквивалентным объемом эритроцитов и инкубировали в течение 1 часа при 37 оС в микропланшетах с U-образным дном (Sero-Wel, Bibby Sterilin, UK). ФСБ и Тритон-Х 100 при 0,1 % (об./об.) использовали как контроли для 0 % и 100 % гемолиза, соответственно. После

20 завершения инкубации планшеты центрифугировали при 1000 г в течение 5 мин, а супернатант переносили в плоскодонные полистироловые микропланшеты, где измеряли поглощение на 540 нм, которое свидетельствует о высвобождении гемоглобина эритроцитами. Процент гемолиза (% H) рассчитывали по уравнению 1

25 по двум независимым повторам, где H<sub>0%</sub> и H<sub>100%</sub> соответствуют поглощению на 540 нм для контролей с ФСБ и тритон X-100, соответственно, а H<sub>пептид</sub> представляет значение поглощения на 540 нм, полученное для каждой пептидной концентрации.

$$\%H = \frac{H_{\text{пептид}} - H_{0\%}}{H_{100\%} - H_{0\%}} \quad \text{Уравнение 1}$$

Аналогично, определяли цитотоксический эффект пептидов, представленных SEQ ID NO: 1–3, в клетках Hep2. Использовали 96-луночные планшеты, засеянные через 48 часов полностью конфлюэнтным монослоем клеток ( $1 \times 10^5$  клеток/лунка). Из планшето

5 планшето

10 удаляли среду для роста и добавляли 100 мкл пептидов, растворенных в культуральной среде без SFBI, на лунку при разных концентрациях от 6,25 мкМ до 100 мкМ. Для оценки использовали шесть лунок на концентрацию пептида, а в оставшиеся лунки (6) добавляли 100 мкл культуральной среды без SFBI, при этом последнее представляло клеточный контроль. Планшеты инкубировали при 37 °С в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> в течение 72 часов и ежедневно осматривали для определения возможных морфологических изменений в монослое клеток, которые свидетельствовали бы о цитотоксичности. После этого определяли жизнеспособность клеток во всех лунках, используя колориметрический анализ на основе снижения количества соединения МТТ активными митохондриальными ферментами в живых клетках [Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, 1983. 65 (1-2): p. 55-63], при этом в каждую лунку добавляли 10 мкл раствора МТТ в концентрации 5 мг/мл в ФСБ. Клетки снова инкубировали при 37 °С с защитой от света в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> в течение 4 часов. После этого все

20 содержимое среды удаляли из планшета, а супернатант аккуратно сливали на фильтровальную бумагу. Образованный осадок ресуспендировали путем добавления в каждую лунку 100 мкл безводного ДМСО, аккуратно встряхивая планшет в течение 5 минут. Поглощение планшета считывали на 540 нм с референтным фильтром на 630 нм на многопланшетном спектрометре ELX 808 (BIOTEK, USA) с интегрированным программным обеспечением Gen5 версии 2.00.18. Процент жизнеспособности клеток, связанный с каждой концентрацией пептида, рассчитывали следующим образом:

$$\% \text{ жизнеспособности клеток} = \frac{(Abs_{CT})}{(Abs_{CC})} \times 100 \quad \text{Уравнение 2}$$

AbsCT: среднее значение поглощения клеточных культур, обработанных пептидами. AbsCC: среднее значение поглощения клеточных контролей, принимаемых за 100 % жизнеспособности клеток. Анализ проводили в двух повторах для каждой концентрации пептида. На фигуре показаны два варианта *in vitro* анализа цитотоксичности пептидов, представленных SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3.

#### Пример 4.

##### Оценка времени уничтожения.

Этот способ основан на определении времени, необходимого для пептидов, представленных SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, и антибиотиков меропенема и цiproфлоксацина для достижения по меньшей мере 3-log (1000-кратного) снижения исходной бактериальной концентрации в КОЕ. Вреязависимую гибель оценивали для бактериальных штаммов *P. aeruginosa* (АТСС 9027) и *K. pneumoniae* (АТСС 1003), как описано в литературе [12], с незначительными модификациями. Рабочие культуры бактерий ( $1 \times 10^5$  КОЕ/мл) подвергали воздействию противомикробных агентов в концентрации  $2 \times M_3$ , приведенной для подлежащего исследованию штамма, в конечном объеме 1 мл (об./об.). Инокулят в ФСБ (рН 7,4) без какого-либо противомикробного агента считали контролем. После инокуляции все суспензии инкубировали при 37 °С. 100 мкл аликвоты культуры получали в разные предопределенные моменты времени (5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 и 120 мин), разводили 100 х в стерильном ФСБ и распределяли в агаровые планшеты Мюллера — Хинтона. Планшеты инкубировали в течение 24 часов при 37 °С и определяли выживаемость клеток путем подсчета общего количества колоний. Кривые КОЕ в зависимости от времени строили для каждого пептидного соединения и сравнивали с референтными антибиотиками. Время гибели бактерий меньше для сконструированных последовательностей, чем для традиционных антибиотиков, используемых в качестве контроля восприимчивости для грамотрицательных штаммов.

25

#### Пример 5.

##### Оценка активности нейтрализации ЛПС с помощью теста активации моноцитов (МАТ).

Этот способ основан на определении провоспалительных цитокинов, высвобождаемых в культуре цельной крови, агентами, которые вызывают провоспалительный ответ. ЛПС использовали в качестве основного индуктора провоспалительного ответа. Для определения влияния пептидов, представленных SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, в *ex vivo* системе в присутствии и/или отсутствие ЛПС определяли высвобождение цитокина IL-6 методом ELISA. Для этого культуру цельной крови инкубировали в среде RPMI-1640 (Sigma, USA) с рядом разведений пептидов, охватывающим 0,05–50 нМ, в присутствии и

35

отсутствие фиксированных концентраций ЛПС при 0,25 ЕЭ /мл (стандартная добавка). Культуру инкубировали в течение 20 ч в инкубаторе Ultima II (Revco Products, USA) при 37 °С с 5 % CO<sub>2</sub>. После этого выделяли 50 мкл образца и определяли концентрацию цитокина, используя стандарты для каждого цитокина, а также захват и биотинилированные моноклональные антитела для каждого из цитокинов. Совместную инкубацию кривой международного стандарта ЛПС в диапазоне от 0,05 ЕЭ/мл до 2000 ЕЭ/мл с цельной кровью в RPMI проводили в том же планшете. Тест проводили в трех повторах, а средние значения и стандартное отклонение полученных величин рассчитывали, используя программу GraphPad Prism версии 5.0 (GraphPad Software, Inc., USA). Для сравнения значений высвобождения цитокинов, полученных в каждом тестируемых условиях (ЛПС с или без пептидов, соответствующих SEQ ID NO: 1–3), использовали множественный критерий Стьюдента. Для сравнения эффекта между разными концентрациями пептидов, которые инкубировали совместно с ЛПС и контрольным ЛПС, использовали простую классификацию ANOVA с последующим применением критерия множественных сравнений Даннета. Сконструированные последовательности демонстрируют ингибирующую активность экспрессии провоспалительных цитокинов (IL-6), опосредованной ЛПС, в культуре цельной крови.

20

#### Пример 6.

#### Оценка активности нейтрализации ЛПС с помощью хромогенного анализа LAL PYROCHROME.

Активность нейтрализации пептидов, представленных SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, в отношении бактериальных эндотоксинов (ЛПС) с использованием кинетического хромогенного анализа LAL (PYROCHROME®; ACC, USA). Все апиrogenные материалы, предоставленные ACC, USA, использовали для проведения исследования. Условия проведения исследования соответствовали инструкциям производителя. Подлежащие оценке пептиды исследовали в ряде 1:10 разведений (об./об.) от начальной концентрации 20 мкМ с постоянной стимуляцией 0,5 ЕЭ/мл эндотоксина (ЛПС). Разные концентрации пептидов плюс стимуляция ЛПС инкубировали в апиrogenном микропланшете (ACC, USA) при 37 °С в течение 5 минут. После этого добавляли реагент LAL и измеряли кинетику реакции на 450 нм в течение 1 часа с 15-секундными интервалами при 37 оС на микропланшетном спектрофотометре. Появление желтой

35

окраски было связано с высвобождением п-нитроанилина из хромогенного субстрата, включенного в LAL, который гидролизуется только в присутствии свободного ЛПС в образце, который активирует ферментативный каскад, который приводит к гидролизу субстрата. Используя программное обеспечение КС4, получали процент восстановления ЛПС, который транслируется в количество свободного или активного ЛПС, не нейтрализованного или не секвестрированного оцениваемыми пептидами.

#### Пример 7.

Оценка антибактериальных эффектов, получаемых при использовании комбинации между разными пептидными вариантами, представленными SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, на выживаемость бактерий.

Для проведения исследований комбинации между пептидами были выбраны только штаммы из клинических изолятов грамотрицательных бактерий *Klebsiella pneumoniae* и грамположительных *Staphylococcus aureus*, мультирезистентных к антибиотикам. Эксперименты проводили в соответствии с методологией исследования, описанной как «шахматная доска» [Huang, R.-y., et al., Isobologram Analysis: A Comprehensive Review of Methodology and Current Research. *Frontiers in Pharmacology*, 2019. 10: p. 1222]. Этот тест позволяет определять показатель фракционной ингибирующей концентрации (FICI) по уравнению 3, что устанавливает классификацию получаемых эффектов следующим образом: синергетический ( $FICI \leq 0,5$ ), аддитивный ( $0,5 < FICI \leq 1$ ), индифферентный ( $1 < FICI \leq 2$ ) и антагонистический ( $FICI > 2$ ).

$$FICI = FIC_A + FIC_B = \frac{MIC_{AB}}{MIC_A} + \frac{MIC_{BA}}{MIC_B} \quad \text{Уравнение 3}$$

где:  $MIC_A$ : минимальная ингибирующая концентрация соединения А;  $MIC_B$ : минимальная ингибирующая концентрация соединения В;  $MIC_{AB}$ : минимальная концентрация А, которая в комбинации с В ингибирует рост;  $MIC_{BA}$ : минимальная концентрация В которая в комбинации с А ингибирует рост. Эксперимент по методу шахматной доски проводили в стерильных 96-луночных полипропиленовых планшетах (Eppendorf, Germany). Выделенные колонии каждой бактерии использовали для создания 1 x 10<sup>5</sup> КОЕ бактериальных культур в ФСБ, называемых рабочей культурой. Кроме того, готовили 64 мкМ маточные растворы пептидов в ФСБ. Создавали двукратные разведения каждого пептида в ФСБ в

конечном объеме 50 мкл. Пептид А размещали в колонках (2–11), а пептид В — в рядах планшета (В–F). Таким образом использовали 60 внутренних лунок планшета для комбинаций пептидных концентраций между пептидом А (0,25–16 мкМ) и пептидом В (0,075–16 мкМ). Первая колонка и последний ряд соответствовали концентрациям некомбинированных пептидов А и В, соответственно. В качестве контроля бактериального роста во все лунки колонок и внешние ряды планшета добавляли 50 мкл ФСБ. После этого во все лунки добавляли по 50 мкл рабочей бактериальной культуры и инкубировали планшет при 37 °С в течение 2 ч. И наконец, во все лунки распределяли по 100 мкл вдвойне концентрированного бульона МН (МНВ) и кинетически отслеживали микробный рост путем измерения ОП на 650 нм в течение 15 часов при 37 °С, регистрируя значения ОП с 5-минутными интервалами на планшетном спектрофотометре (BioTek Instruments, USA). Значения ингибирования бактериального роста (MIC) брали как значения, аналогичные с холостыми лунками (контроль) со средой МНВ, инкубируемыми во внешних лунках планшета. В следующей таблице показано среднее значение по результатам, полученным в трех независимых экспериментах.

Таблица 2. Тест по методу шахматной доски, который позволяет проверить синергетические эффекты, обеспечиваемые комбинациями между пептидными последовательностями, содержащимися в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3.

Бактериальный штамм	Комбинация и A (пептид А)/ B (пептид В)	$FIC_A$	$FIC_B, \text{ мкМ}$	$FICI$	Качественные результаты
		$(MIC_{AB}/MIC_A)$	$(MIC_{BA}/MIC_B)$	$(FIC_A+FIC_B)$	
<i>K. pneumoniae</i>	SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2	0,25/4,0	0,12/1,0	0,18	Синергия
	SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 3	0,25/2,0	0,5/4,0	0,25	Синергия
	SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 2	0,25/4,0	0,12/1,0	0,18	Синергия
	SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2	0,25/4,0	0,12/1,0	0,18	Синергия
	SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 3	0,25/2,0	0,5/4,0	0,25	Синергия
	SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 2	0,25/4,0	0,12/1,0	0,18	Синергия
<i>S. aureus</i>	SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2	0,50/4,0	0,12/2,0	0,18	Синергия

NO: 1/SEQ				
ID NO: 2				
SEQ ID				Синергия
NO: 1/SEQ	0,25/2,0	0,25/4,0	0,18	
ID NO: 3				
SEQ ID				Синергия
NO: 3/SEQ	0,25/4,0	0,25/2,0	0,18	
ID NO: 2				

### Пример 8.

Оценка синергетических эффектов в комбинациях пептидов, представленных SEQ

5 ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, с антибиотиком меропенемом по показателю фракционной ингибирующей концентрации (FICI).

Использовали метод шахматной доски для оценки синергии между меропенемом и пептидами, представленными SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, против мультирезистентных бактерий *Klebsiella pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* из 10 клинических изолятов. Используемая процедура для метода шахматной доски аналогична описанной в примере 7. В этом случае меропенем исследовали как соединение А, а пептиды как соединение В. Результаты, приведенные в таблице 3, основаны на определении показателя фракционной ингибирующей концентрации (FICI) в соответствии со следующей классификацией: синергия ( $FICI \leq 0,5$ ), 15 аддитивность ( $0,5 < FICI \leq 1$ ), индифферентность ( $1 < FICI \leq 2$ ) и антагонизм ( $FICI > 2$ ). Все гибридные варианты демонстрируют синергетический антибактериальный эффект в комбинации с меропенемом против клинических изолятов грамотрицательных бактерий *Klebsiella pneumoniae* и грамположительных мультирезистентных к антибиотикам *Staphylococcus aureus* (таблица 3).

20 Таблица 3. Исследование методом шахматной доски, подтверждающее синергетические эффекты, обеспечиваемые комбинациями SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 и меропенемом (карбапенем).

Бактериальный штамм	Комбинация и A (MER)/ B (SEQ ID NO:	$FIC_A$ , мкг/мл	$FIC_B$ , мкМ	$FICI$	Качественные результаты
		( $MIC_{AB}/MIC_A$ )	( $MIC_{BA}/MIC_B$ )	( $FIC_A + FIC_B$ )	

<i>K. pneumoniae</i>	MER/SEQ ID NO: 1	1,0/8,0	0,25/4,0	0,18	Синергия
	MER/SEQ ID NO: 2	0,5/8,0	0,12/2,0	0,12	Синергия
	MER/SEQ ID NO: 3	1,0/8,0	0,12/4,0	0,15	Синергия
<i>S. aureus</i>	MER/SEQ ID NO: 1	1,0/8,0	0,12/2,0	0,18	Синергия
	MER/SEQ ID NO: 2	0,5/8,0	0,12/2,0	0,12	Синергия
	MER/SEQ ID NO: 3	0,5/8,0	0,12/4,0	0,09	Синергия

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид с противомикробной активностью, отличающийся тем, что он содержит: аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80 % идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3
2. Пептид по п. 1, дополнительно отличающийся тем, что остатки цистеина (Cys; C), присутствующие в каждой последовательности, образуют дисульфидные связи, и при этом остаток в карбоксильном конце является амидированным.
3. Пептид по п. 2, дополнительно отличающийся тем, что Хаа независимо выбран из группы, состоящей из D- или L-форм аргинина (Arg; R) и лизина (Lys; K); при условии, что по меньшей мере четыре остатка Хаа представляют собой аргинин.
4. Комбинированная терапия для пациента с бактериальной инфекцией для контроля развития явления мультирезистентности, включающая введение пациенту по меньшей мере 2 последовательностей, выбранных из группы, определенной в пп. 1–3.
5. Комбинированная терапия для пациента с бактериальной инфекцией для контроля развития явления мультирезистентности, включающая введение пациенту последовательности, выбранной из группы, определенной в пп. 1–3, с бета-лактамым антибиотиком.
6. Комбинированная терапия по п. 5, в которой бета-лактамыный антибиотик представляет собой карбапенем.
7. Фармацевтическая композиция для лечения и/или предотвращения микробных инфекций, содержащая:
  - а) терапевтически эффективное количество пептида, выбранного из группы, определенной в пп. 1–3, в качестве активного ингредиента и
  - б) один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов.
8. Фармацевтическая композиция по п. 7, дополнительно содержащая второй пептид, выбранный из группы, определенной в пп. 1–3, в качестве активного ингредиента.
9. Фармацевтическая композиция по п. 7, дополнительно содержащая бета-лактамыный антибиотик в качестве активного ингредиента.
10. Фармацевтическая композиция по п. 9, в которой бета-лактамыный антибиотик представляет собой меропенем.
11. Применение пептида, выбранного из группы, описанной в пп. 1–3, комбинированной терапии, выбранной из вариантов, описанных в пп. 4–6, или

фармацевтической композиции, выбранной из вариантов, описанных в пп. 7–10, отличающееся тем, что указанное применение предназначено для производства лекарственного средства для предотвращения и/или лечения микробных инфекций.

12. Применение по п. 11, в котором инфекция вызвана патогенным штаммом грамотрицательных бактерий или грамположительных бактерий, относящихся к группе ESKAPE.

13. Применение по п. 12, в котором грамотрицательные бактерии демонстрируют мультирезистентность к традиционным антибиотиками и выбраны из группы, включающей *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomona aeruginosa* и *Escherichia coli*.

14. Применение по п. 12, в котором грамположительные бактерии демонстрируют мультирезистентность к традиционным антибиотиками и выбраны из группы, включающей *Enterococcus faecium* или *Staphylococcus aureus*.

15. Способ лечения или предотвращения микробной инфекции, включающий введение субъекту с микробной инфекцией пептида, выбранного из группы, описанной в пп. 1–3, комбинированной терапии, выбранной из вариантов, описанных в пп. 4–6, или фармацевтической композиции, выбранной из вариантов, описанных в пп. 7–10, в терапевтически эффективном количестве.

16. Способ лечения по п. 15, в котором инфекция вызвана патогенным штаммом грамотрицательных бактерий или грамположительных бактерий, относящихся к группе ESKAPE.

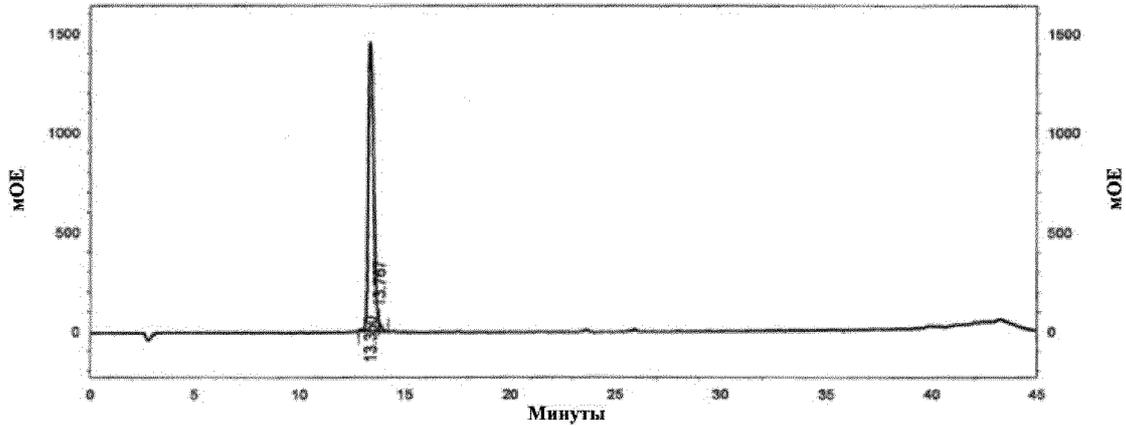
17. Способ лечения по п. 16, в котором грамотрицательные бактерии демонстрируют мультирезистентность к традиционным антибиотиками и выбраны из группы, включающей *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomona aeruginosa* и *Escherichia coli*.

18. Способ лечения по п. 16, в котором грамположительные бактерии демонстрируют мультирезистентность к традиционным антибиотиками и выбраны из группы, включающей *Enterococcus faecium* или *Staphylococcus aureus*.

**Пептидная послед. 1**

Отчет (% площади)  
Образец: M17P31 003

Файл данных: D:\Lab Analysis\Servicio RP\_HPLC\Data\Año 2017\M17P31\M17P31 003 9-14-2017 2-47-43  
 AM.dat  
 Метод: D:\Lab Analysis\Control de proceso\Method\Ctrol Proceso CAM.met  
 Получено: 9/14/2017 2:59:08 AM  
 Напечатано: 9/15/2017 6:57:47 AM

**Результаты K-2501**

Время удержания	Площадь	% Площади	Высота	% Высоты
13.350	24930070	98.47	1452995	96.71
13.767	387247	1.53	49445	3.29
<b>Всего</b>	<b>25317317</b>	<b>100.00</b>	<b>1502440</b>	<b>100.00</b>

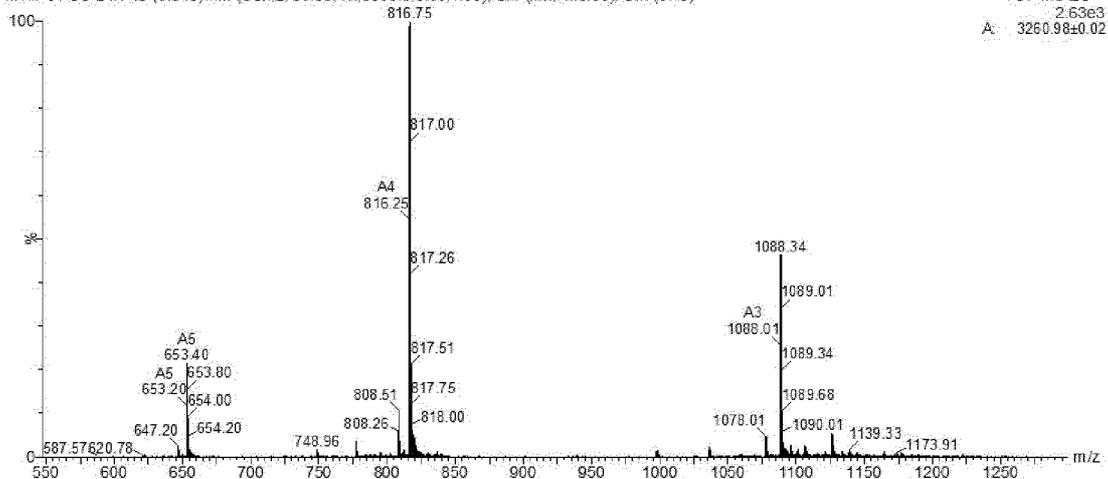
**M17P31ss**

Средняя масса = 3262,6932, моноизотопная масса = 3260,5733

N-конец = H, C-конец = NH<sub>2</sub>

1 YCPYG NRLNY WSRAR GHIGT KSCRR SY

M17P31-SS-24H 49 (0.846) AM (Cen.2, 80.00; Ht,5000.0 0.00,1.00); Sm (Mn, 1x3.00); Cm (5.49)

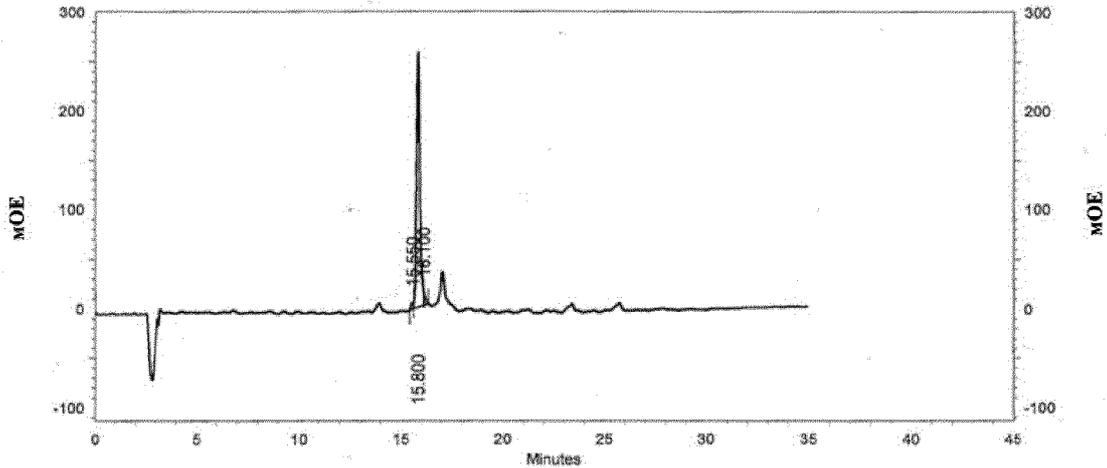


**Пептидная послед. 2**

Отчет (% площади)

Образец: M17P32 008

Файл данных: D:\Lab Analysis\Servicio RP\_HPLC\Data\Año 2017\M17P32\M17P32 008 9-18-2017 1-20-59  
 PM.dat  
 Метод: D:\Lab Analysis\Control de proceso\Method\CTrol Proceso CAM.met  
 Получено: 9/18/2017 1:32:27 PM  
 Напечатано: 9/19/2017 6:51:18 AM

**Результаты К-2501**

Время удержания	Площадь	% Площади	Высота	% Высоты
15.550	46269	1.54	6127	2.22
15.800	2882982	95.95	257857	93.39
16.100	75424	2.51	12114	4.39
<b>Всего</b>	<b>3004675</b>	<b>100.00</b>	<b>276098</b>	<b>100.00</b>

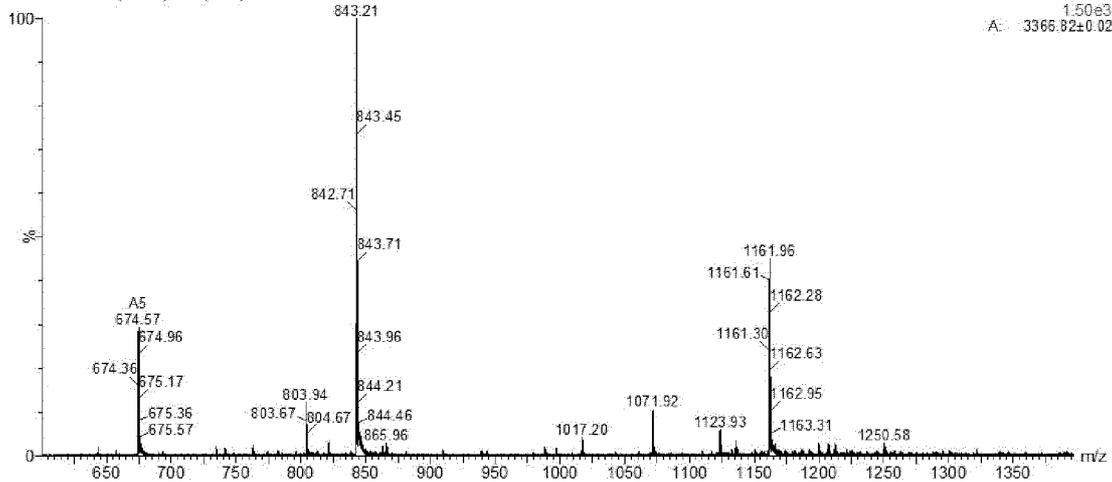
**M17P32ss**

Средняя масса = 3368,8520, моноизотопная масса = 3366,6502

N-конец = H, C-конец = NH2

1 YSTSC RYFRL DYRSF SVGTK SCVRR GIY

M17P32-24H 9 (0.162) Cm (6:64)



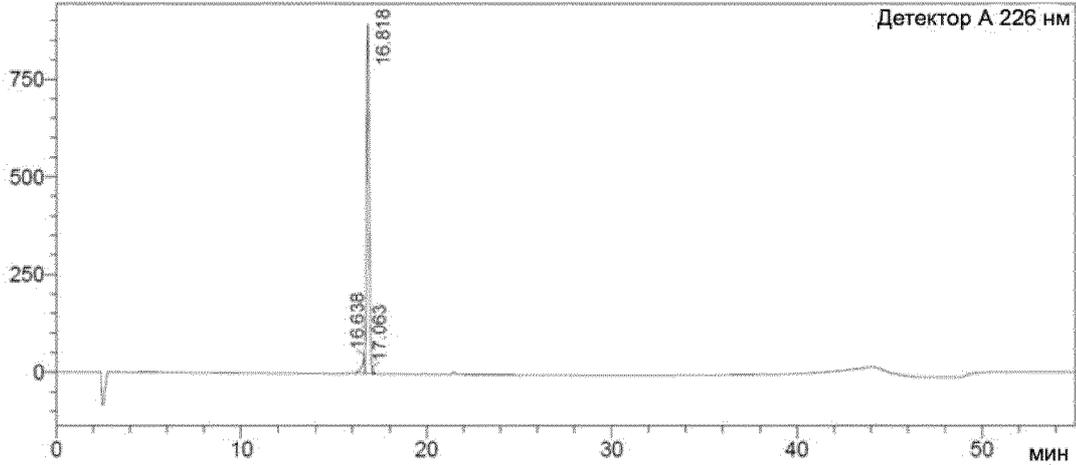
**<Информация по образцу>**

Название образца : Y19P94ss C2F4  
 ID образца : Y19P94ss C2F4  
 Назв. файла данных : Y19P94ss C2F4.lcd  
 Назв. файла метода : Градиент от 5 до 60% В за 35 мин. equil final.lcm  
 Назв. файла партии : Y19P94ss C2.lcb  
 Флакон № : 1-7  
 Объем ввода : 150 мкл  
 Получение данных : 5/21/2020 9:37:06 PM  
 Обработка данных : 5/25/2020 8:13:35 AM

Тип образца : Неизвестно  
 Получено : Системным администратором  
 Обработано : Системным администратором

**<Хроматограмма>**

мВ

**<Таблица пиков>**

Детектор А 226 нм

Пик№	Время уд.	Площадь	Высота	Конц.	Един.	Марка	Название
1	16.638	374561	38076	4.375		M	
2	16.818	8154501	892242	95.239		V M	
3	17.063	33080	12338	0.386		V M	
Всего		8562143	942655				

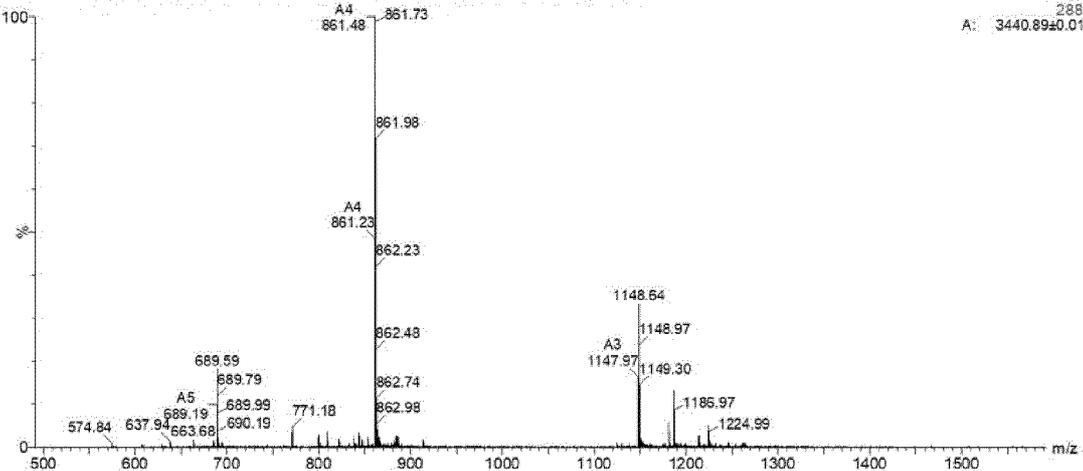
Y19P94ss

Средняя масса = 3442,9462, моноизотопная масса = 3440,7108

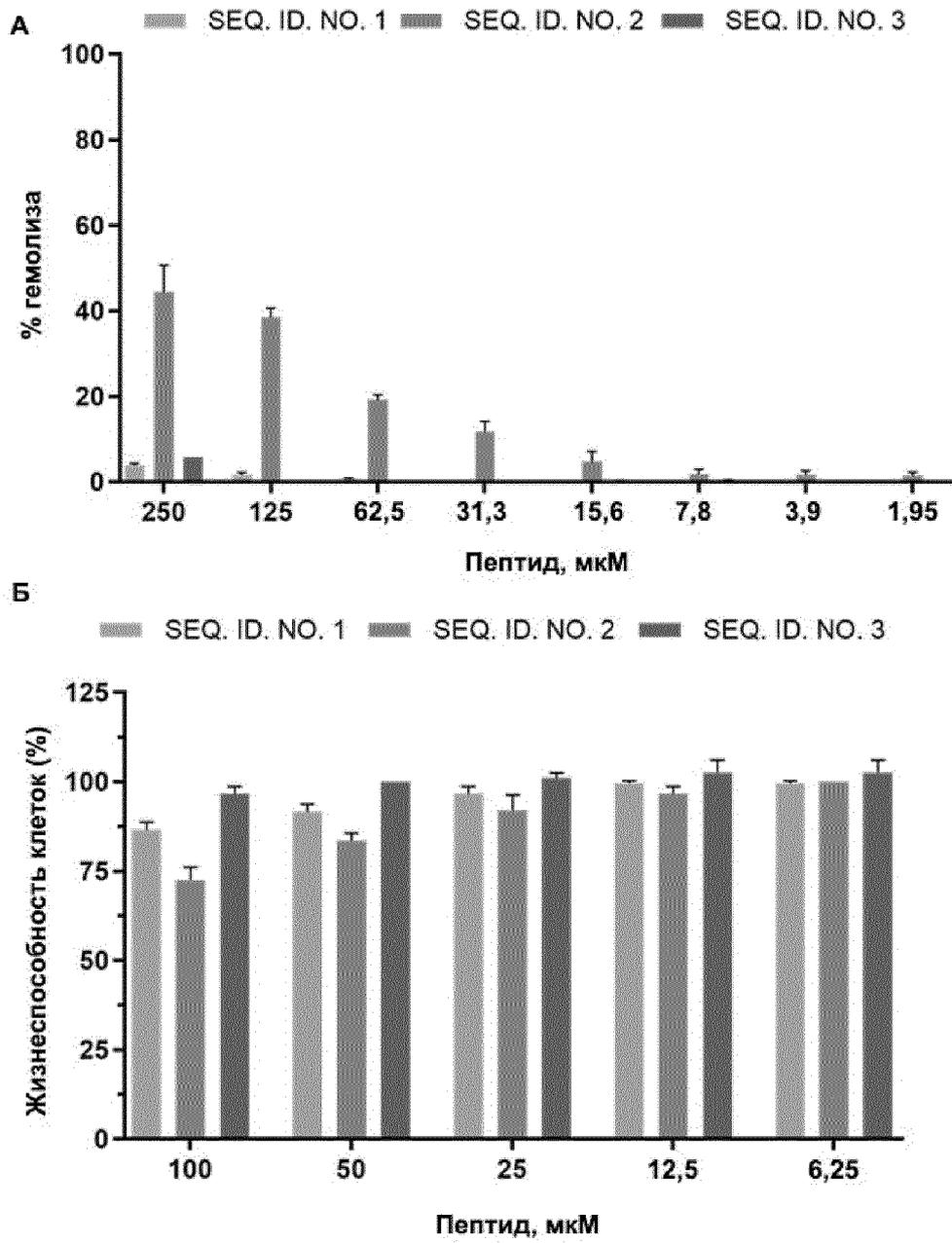
N-конец = H, C-конец = NH2

1 YSTSC RYFRL NHWSR ARGHI SCVRR GIY

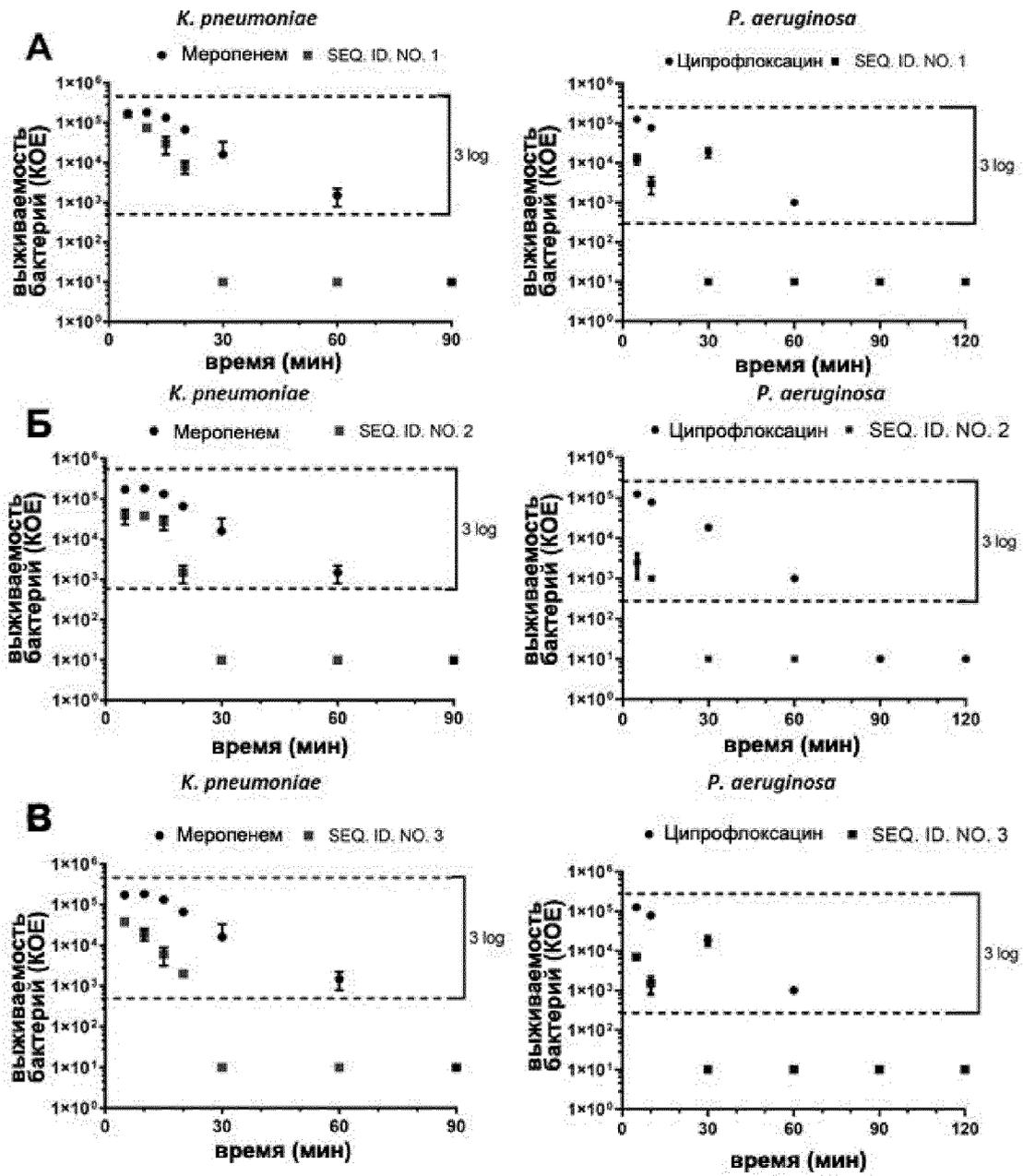
Y19P94SS 9 (0.194) AM (Cen, 2, 80.00, Ht, 50000.0, 0.00, 1.00); Sm (Mn, 1x3.00); Cm (8.34)

TOF MS ES+  
288  
A: 3440.89±0.01

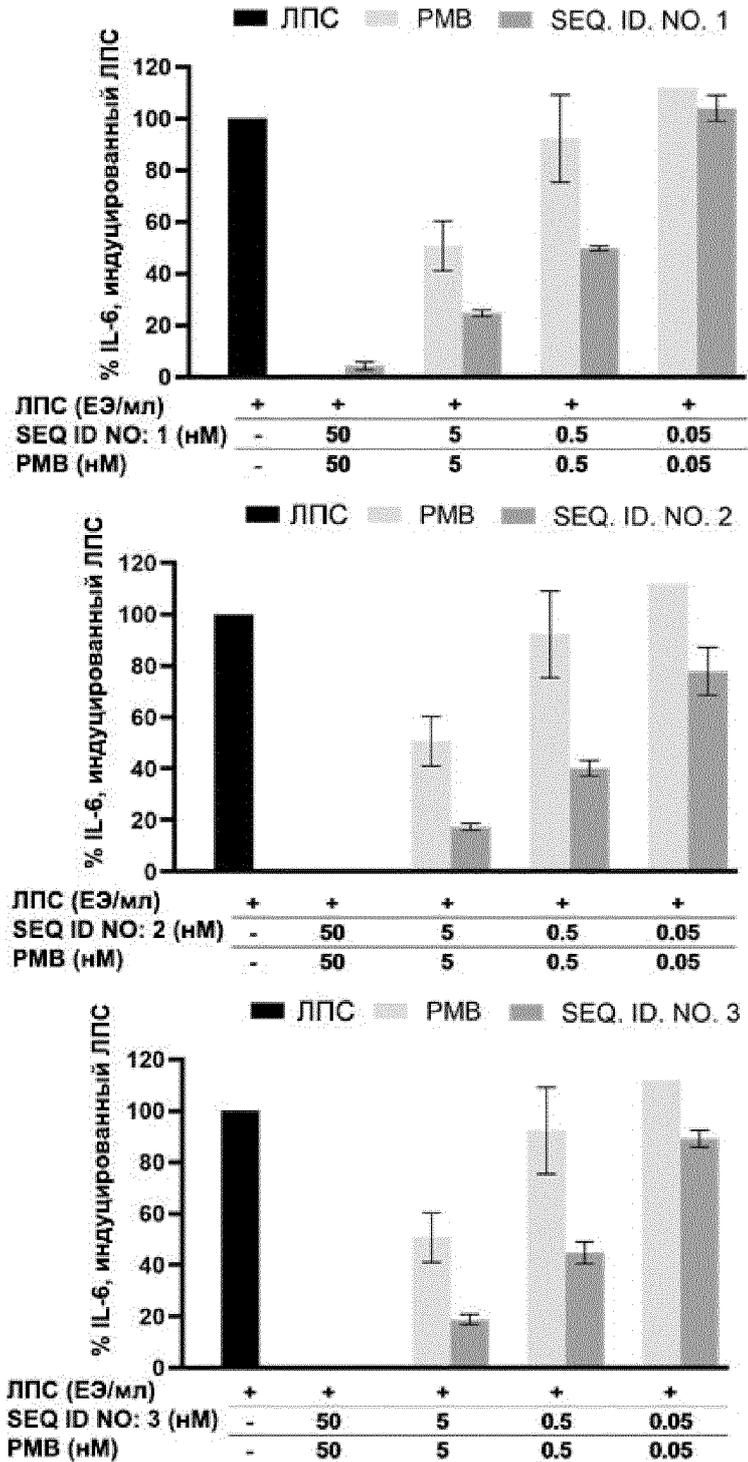
Фиг. 1



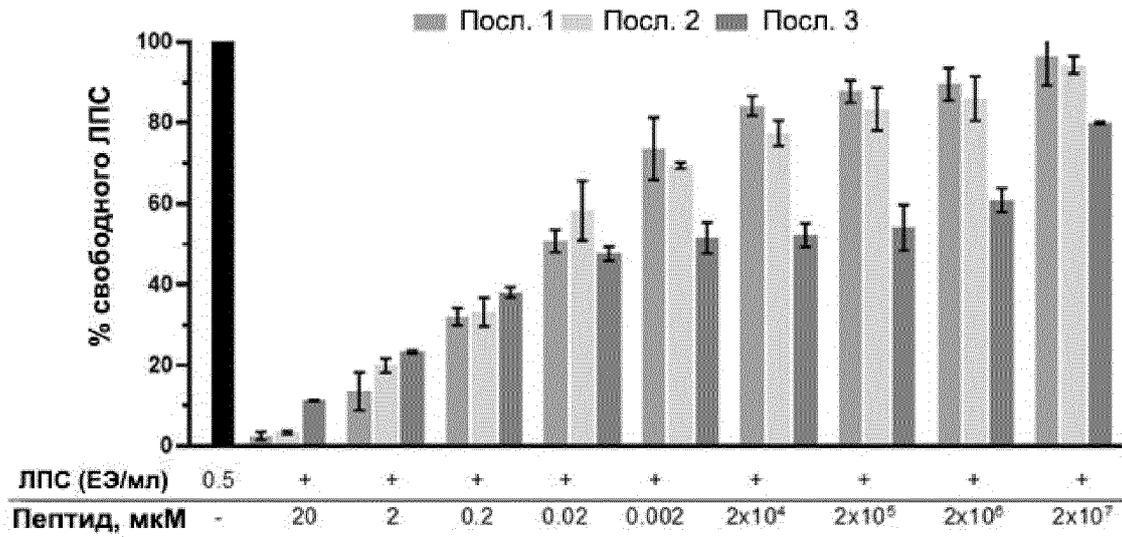
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5