



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(21) BR 102022022855-8 A2

(22) Data do Depósito: 09/11/2022

(43) Data da Publicação Nacional:
09/09/2025

(54) Título: BIOCONJUGAÇÃO DE GUANIDINAS N,N',N''-TRISUBSTITUÍDAS COM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E USO DOS BIOCONJUGADOS

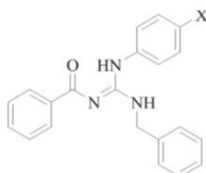
(51) Int. Cl.: C07C 279/18; A61K 31/155; A61P 35/00.

(52) CPC: C07C 279/18; A61K 31/155; A61P 35/00.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) Inventor(es): EDUARDO MAFFUD CILLI; EDUARDO RENE PEREZ GONZALEZ; MÁRCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA; MARIA CAROLINA OLIVEIRA DE ARRUDA BRASIL; NATÁLIA CAROLINE COSTA COELHO; VITOR PARTITE MOREIRA; JOÃO VICTOR MARCELINO DE SOUZA; LUANA RIBEIRO DOS ANJOS.

(57) Resumo: BIOCONJUGAÇÃO DE GUANIDINAS N,N,N-TRISUBSTITUÍDAS COM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E USO DOS BIOCONJUGADOS. O presente pedido de patente de invenção visa a funcionalização e caracterização da atividade leishmanicida de peptídeos antimicrobianos à guanidinas N,N',N''-trisubstituídas, e o uso da bioconjugação, visando aumentar a potência e seletividade dos mesmo frente ao parasita; e uso dos biconjugados. A funcionalização e caracterização da atividade leishmanicida de peptídeos antimicrobianos aos compostos guanidínicos foi realizada utilizando a síntese de peptídeos em fase sólida por meio da Química Fmoc e confirmou que os bioconjugados são mais potentes frente a amastigotas intracelulares e com alta seletividade para os parasitos quando comparados às células hospedeiras.



LQOFG-2. X = Br

LQOFG-6. X = *t*-bu

BIOCONJUGAÇÃO DE GUANIDINAS N,N',N''-TRISUBSTITUÍDAS COM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E USO DOS BIOCONJUGADOS.

INTRODUÇÃO

[001] O presente pedido de patente descreve a obtenção de bioconjugados de peptídeos e guanidinas N,N',N''-trisubstituídas, assim como o uso dos bioconjugados.

ESTADO DA TÉCNICA

[002] O tratamento das leishmanioses é fundamental, principalmente considerando a incidência de mortes associadas ao não tratamento (70 mil óbitos/ ano) em todo o mundo; no entanto, há poucas opções terapêuticas disponíveis, pouco eficazes e tóxicas. Desta forma, justifica-se a busca por novas alternativas terapêuticas com amplo espectro de ação e mais seletivos. Neste contexto, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) e seus bioconjugados são uma alternativa, podendo permitir o desenvolvimento de novas terapias mais ativas contra a Leishmaniose.

[003] O principal mecanismo de ação dos PAMs está vinculado à capacidade de interagir, permear e desestruturar membranas celulares sendo dependente de diversos fatores, tais como a estrutura secundária, a carga líquida total, o tamanho e a anfipaticidade (Lewies *et al.*, 2015: *The potential use of natural and structural analogues of antimicrobial peptides in the fight against neglected tropical diseases*). Em bactérias, por exemplo, a ação antibacteriana baseia-se, principalmente, na atração entre forças eletrostáticas entre os PAMs catiônicos e a superfície negativamente carregada da membrana (Mahlpuu *et al.*, 2016: *Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents.*).

[004] A ação antiparasitária destas moléculas segue um mecanismo de ação parecido, tendo como principal alvo a membrana celular do parasita. A membrana celular da *Leishmania* é formada principalmente por fosfolipídios de carga negativa, sendo os principais o fosfatidilinositol, a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina. Outro ponto importante é que a constituição desta membrana varia de acordo com a morfologia do parasita e o seu estágio de desenvolvimento, sendo mais negativa que a membrana celular de mamíferos, o que permite que os PAMs tenham uma ação mais seletiva

(Cabezas; Legentil; Robert-Gangneux; Daligault *et al.*, 2015: *Leishmania cell wall as a potent target for antiparasitic drugs. A focus on the glycoconjugates*).

[005] Além das membranas celulares os peptídeos antiparasitários podem ter alvos intracelulares que incluem mecanismos como: indução de processos de necrose e apoptose-like, inibição da síntese mitocondrial de ATP, inibição da síntese da parede celular, interferência na bioenergética do parasita, entre outros. Desta forma, os PAMs podem interferir no metabolismo e em processos celulares críticos do patógeno, causando sua morte (Bechinger e Gorr, 2017: *Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance*; Kumar *et al.*, 2018: *Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo*).

[006] Apesar do grande potencial apresentado pelos PAMs, ainda existem alguns desafios para a aplicação dessas moléculas na terapêutica em geral, tais como o potencial de toxicidade para os seres humanos, susceptibilidade a proteases, custos de produção, e apesar de incomum, a resistência de alguns microrganismos para alguns peptídeos (Bahar e Ren, 2013: *Antimicrobial peptides*).

[007] Para contornar estes problemas, pode-se adotar a estratégia de bioconjugação e ou dimerização para melhorar propriedades farmacotécnicas dos PAMs. O nosso grupo de pesquisa tem utilizado estas estratégias a fim de desenvolver compostos antimicrobianos, anticâncer e antifúngicos, (Lorenzón *et al.*, 2012: *Effects of dimerization on the structure and biological activity of antimicrobial peptide Ctx-Ha*; Sanches *et al.*, 2015: *A conjugate of the lytic peptide Hecate and gallic acid: structure, activity against cervical cancer, and toxicity*; Batista *et al.*, 2018: *Recent insights in the use of nanocarriers for the oral delivery of bioactive proteins and peptides*) e, mais recentemente, antileishmanicida (Natalia Costa Coelho, tese de doutorado, em andamento).

[008] A bioconjugação de PAMs com guanidinas N,N',N''-trisubstituídas mostrou um aumento da atividade leishmanicida e um aumento no Índice de Seletividade (IS), ou seja, tornando a molécula mais potente e mais seletiva para os parasitos.

[009] A temporina TSHa, como outros PAMs, possui carga positiva, facilitando a interação com a membrana da *Leishmania* por meio de forças eletrostáticas, o que pode estar seletivamente levando a alterações na membrana. Após esta interação inicial o peptídeo pode agir na membrana do parasita ou causar um aumento na permeação do agente antileishmanial através da membrana plasmática da célula hospedeira, bem como a do vacúolo parasitóforo, podendo agir diretamente em alvos intracelulares (Gelhaus; Jacobs; Andrä; Leippe, 2008: *The antimicrobial peptide NK-2, the core region of mammalian NK-lysin, kills intraerythrocytic Plasmodium falciparum*).

[010] A estratégia da bioconjugação de peptídeos com moléculas de guanidina, que apresentam atividade antiparasitárias ((R.D. do Espírito Santo *et al.*, 2019: *N, N' N''-trisubstituted guanidines: Synthesis, characterization and evaluation of their leishmanicidal activity*) 116-128),), é uma estratégia interessante visto que estas moléculas podem ser modificadas para serem acopladas aos peptídeos antimicrobianos na região N-terminal, a fim melhorar a atividade antiprotzoária e seletividade destas moléculas frente aos parasitas.

[011] Para avaliar se diferentes peptídeos poderiam ser utilizados na conjugação com as guanidinas, o peptídeo TSHa e o peptídeo dimérico (desCys¹¹/Lys¹²/Lys¹³(p-BthTX-I)₂K), análogo do peptídeo isolado da toxina BthTX-I, da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*, que apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Santos-Filho *et al.*, 2021: *Understanding the mechanism of action of peptide (p-BthTX-I) derived from C-terminal region of phospholipase A2 (PLA)-like bothropstoxin-I on Gram-positive and Gram-negative bacteria*) foram avaliados conjugados às guanidinas N,N',N''-trisubstituídas.

VANTAGENS DA INVENÇÃO

[012] A grande vantagem da invenção está na estratégia de bioconjugação e nos efeitos biológicos encontrados quanto a questão da seletividade frente ao parasita *Leishmania* na sua forma infectante, amastigota, além da baixa toxicidade in vitro e alto índice de seletividade das moléculas.

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

[013] SEQ ID NO: 1 - peptídeo TSHa, o qual é funcionalizado com guanidinas N,N',N''-trisubstituídas em sua região N terminal.

[014] SEQ ID NO: 2 - peptídeo isolado da toxina BthTX-I, da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*, o qual originou o peptídeo dimérico sintético (desCys¹¹/Lys¹²/Lys¹³(p-BthTX-I)₂K), descrito no pedido de patente BR102018071914-9.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FIGURAS

[015] A Figura 1 apresenta os precursores, com diferentes modificações no grupo X que mostraram ter atividade antiparasita (R.D. do Espírito Santo *et al.*, 2019: *N, N' N''-trisubstituted guanidines: Synthesis, characterization and evaluation of their leishmanicidal activity*), mas possuem problemas de solubilidade e seletividade.

[016] As Figuras 2A e 2B apresentam as guanidinas N,N',N''-trisubstituídas (GQOFG) com atividade antileishmanicida, em que LQOFG-2 e LQOFG-6 são modificadas com um grupo carboxila, e apresentam as estruturas nomeadas de GVL-1 (modificação de LQOFG-2) (Figura 2A) e GVL-2 (modificação de LQOFG-6) (Figura 2B). Os compostos bases LQOFG-2 e LQOFG-6 foram escolhidos para os estudos por apresentar a melhor atividade amastigota, boa atividade promastigota e baixa toxicidade (R.D. do Espírito Santo *et al.*, 2019: *N, N' N''-trisubstituted guanidines: Synthesis, characterization and evaluation of their leishmanicidal activity*). Estes compostos foram modificados com um grupo carboxila (Tabela 1) e denominados de GVL-1 e GVL-2 para os substituintes de bromo e t-butil, respectivamente, permitindo o acoplamento diretamente à extremidade N-terminal dos peptídeos utilizando a síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS).

[017] A Figura 3, mostra o peptídeo que foi dimerizado utilizando como primeiro resíduo a Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (Lisina (Lys) com o grupo protetor Fmoc na cadeia lateral), e apresentou a sequência KKYRYHLKPF(α)K(ε)FPKLHYRYKK (desCys¹¹/Lys¹²/Lys¹³(p-BthTX-I)₂K).

[018] A Figura 4 apresenta as estruturas químicas dos peptídeos (desCys¹¹/Lys¹²/Lys¹³(p-BthTX-I)₂K) conjugados com 1 ou duas moléculas de GVL-1.

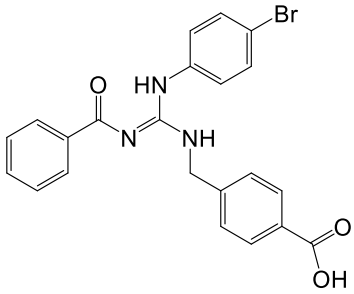
DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[019] Com foco na estratégia de bioconjugação, a funcionalização dos PAMs com as guanidinas N,N',N''-trisubstituídas ocorreu na região N-terminal dos peptídeos. Estudos realizados pelo grupo demonstram o grande potencial deste bioconjugado frente ao parasita, aumentando sua potência e seletividade. Destaca-se que, as guanidinas são provenientes do Laboratório de Química Orgânica Fina - Departamento de Química e Bioquímica - Faculdade de Ciências e Tecnologia - Unesp Campus de Presidente Prudente, que foram responsáveis pelo planejamento, síntese e caracterização das guanidinas precursoras (LQOFG) e seus correspondentes análogos - chamados no presente documento de GVLs.

[020] Os ensaios antileishmania foram realizados utilizando formas promastigotas de *L. amazonensis* (MPRO/BR/1972/M1841-LV-79) cultivadas em meio LIT a 28°C até a fase mid log de crescimento. Macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos Swiss, após exposição à solução de tioglicolato de sódio 3%, por meio de lavagem com tampão fosfato estéril (pH 7,2). Estas células foram crescidas em meio RPMI-1640 completo, (RPMI-1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino - SFB, 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina) e mantidos à temperatura de 37°C em estufa a 5% de CO₂. Formas promastigotas de *Leishmania* foram plaqueadas à razão de 1x10⁷ parasitos/mL em placas de 96 poços e para os ensaios serão adicionados à suspensão de parasitos, peptídeos nas concentrações de 100 µmol L⁻¹ a 1,6 µmol L⁻¹, de acordo com metodologia previamente descrita pelo nosso grupo (Velásquez, A. M. A.; Ribeiro, W. C.; Venn, V.; Castelli, S. *et al.*, 2017: *Efficacy of a Binuclear Cyclopalladated Compound Therapy for Cutaneous Leishmaniasis in the Murine Model of Infection with Leishmania amazonensis and Its Inhibitory Effect on Topoisomerase 1B*). Após 72 horas foi realizada a leitura das placas por MTT no comprimento de onda de 570 nm.

[021] Macrófagos peritoneais murinos (3x10⁵ células/mL) foram cultivados em meio RPMI-1640 completo, distribuídos em lâminulas circulares em placas de 24 poços. A adesão das células ocorreu a 37°C em 5% CO₂ por 4 h. Macrófagos foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis*, na fase estacionária do crescimento, a razão de 10:1 (*Leishmania*/célula) e mantidos a 37°C em 5% CO₂ por mais 18 h. Ao

final, os parasitos não fagocitados foram removidos por lavagem, e então foram adicionados 20 µL da solução do bioconjugado, peptídeo ou guanidina em meio fresco. A placa foi mantida a 37°C, 5% de CO₂ por 24 h. O fármaco de referência utilizado como controle foi a anfotericina B. Para análise do índice de infecção, foi realizada coloração por Giemsa, para posterior análise em microscopia óptica. Resultados foram expressos como a concentração inibitória de 50% da inibição do crescimento (IC_{50-AMA}) determinados por regressão não linear. Os ensaios serão realizados em triplicata. A determinação da citotoxicidade contra macrófagos peritoniais de compostos ativos pela técnica colorimétrica do MTT foi obtida consoante o protocolo descrito no item anterior e a metodologia descrita anteriormente (Velásquez, A. M. A.; Ribeiro, W. C.; Venn, V.; Castelli, S. *et al.*, 2017: *Efficacy of a Binuclear Cyclopalladated Compound Therapy for Cutaneous Leishmaniasis in the Murine Model of Infection with Leishmania amazonensis and Its Inhibitory Effect on Topoisomerase 1B*). Os resultados obtidos foram expressos em forma de CC₅₀, onde a determinação deste valor foi realizada por regressão não linear utilizando-se o software Bioestat (Tabela 1).

Nome do composto	Estrutura molecular	Massa molar (g/mol)	Ponto de fusão (°C)	Solubilidade
GVL-1		451,05	190,8 – 192,2	DMSO, Acetona

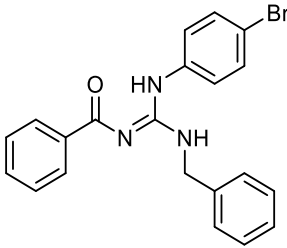
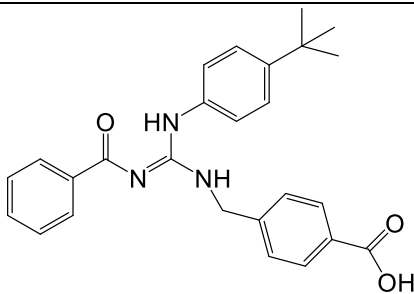
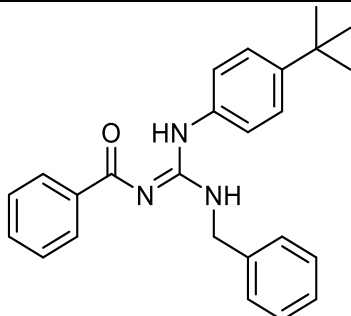
LQOF-G2		408,07	101,5 – 101,8	DMSO, CH ₂ Cl ₂ , CHCl ₃ , Acetonitrila
GVL-2		429,21	203,1 – 203,5	DMSO, Acetona
LQOF-G6		386,22	124,3 – 125,0	DMSO, CH ₂ Cl ₂ , CHCl ₃ , Acetonitrila

Tabela 1: Guanidinas precursoras e utilizadas na bioconjugação com os peptídeos e suas propriedades físico-químicas.

[022] A bioconjugação com o TSHA (FLSGIVGMLGKLF-NH₂) mostrou excelente atividade, maior que o peptídeo e a guanidina separadamente, frente a *L. amazonensis*, apresentando atividade leishmanicida com IC₅₀ abaixo de 6 µmol/L frente (Tabela 2) às formas promastigotas e amastigotas e com baixa citotoxicidade (IS acima de 3000), evidenciando a eficácia da estratégia da bioconjugação de peptídeos com compostos guanidínicos. Esta sequência peptídica é derivada de uma classe denominada de temporinas, a qual se destaca por apresentar amplo espectro de ação frente a bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas), fungos e parasitos (Agarwal, S.; Sharma, G.; Dang, S.; Gupta, S. *et al.*, 2016: *Antimicrobial Peptides as Anti-Infectives against Staphylococcus epidermidis*; Mohanram, H.; Bhattacharjya, S., 2016: 'Lollipop'-

shaped helical structure of a hybrid antimicrobial peptide of temporin B-lipopolysaccharide binding motif and mapping cationic residues in antibacterial activity).

[023] As temporinas (SEQ ID NO: 1) são peptídeos pequenos (13-14 resíduos), de carga líquida positiva variando de 0 a +3, e com estrutura em α -hélice em meios que simulam a polaridade da membrana. Apresentam ainda uma região N-terminal altamente conservada que auxilia na ancoragem do peptídeo às membranas celulares e uma região C-terminal, hipervariável e amidada, que pode estar envolvida na seletividade e especificidade (Mangoni M. L.; Saugar J. M.; Dellisanti M.; Barra D.; Simmaco M.; Rivas L., 2005: *Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity.*; Raja, Z.; André, S.; Abbassi, F.; Humblot, V. et al., 2017: *Insight into the mechanism of action of temporin-SHa, a new broad-spectrum antiparasitic and antibacterial agent*). A temporina escolhida para a conjugação foi o TSHa (FLSGIVGMLGKLF-NH₂), o qual apresenta atividade antileishmania *infantum* (Galanth, C.; Abbassi, F.; Lequin, O.; Ayala-Sanmartin, J. et al., 2009: *Mechanism of antibacterial action of dermaseptin B2: interplay between helix-hinge-helix structure and membrane curvature strain*). As sínteses do peptídeo e do bioconjugado foram realizadas em fase sólida (SPFS), utilizando o protocolo da química fluorenilmetiloxycarbonila (Fmoc). Este método baseia-se no crescimento da cadeia peptídica, através do acoplamento dos aminoácidos na sequência desejada, a partir da sua região C-terminal. O suporte polimérico utilizado neste processo foi a Rink-amida para obtenção do peptídeo na forma carboxiamida. Os solventes são selecionados dentre os solventes utilizados para síntese de peptídeos em fase sólida, preferencialmente dimetilformamida, diclorometano, N-metilpirrolidona e dimetilsulfóxido. A temperatura foi a ambiente. Os agentes acoplantes utilizados são os normalmente utilizados na SPFS, tais N,N-diisopropilcarbodiimida (DIC)/N-Hidroxibenzotriazol (HOBt); hexafluorofosfato de O-(Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HBTU)/ N-Etildiisopropilamina (DIEA) e hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitripirrolidinofosfônio (PyBOP)/N-Etildiisopropilamina (DIEA). Após a síntese, os peptídeos e bioconjugados foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e caracterizados por espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI) positivo.

Compostos	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹) promastigota	CC ₅₀ (μmol L ⁻¹) macrófagos peritoneais	IC ₅₀ amastigota (μmol L ⁻¹)	IS
LQOFG-2	19,6 ± 0,2	737,9 ± 1,4	5,6 ± 2,5	131,8
LQOFG-6	25,9 ± 0,9	1118,9 ± 105,4	17,20 ± 2,1	65,0
GVL-1	34,4 ± 0,13	>2000 ± 0,013	8,9 ± 1,41	225
GVL-1-TSHa	5,36 ± 0,08	>2000 ± 0,02	0,33 ± 0,04	>6060
GVL-2	33,29 ± 4,3	nd	nd	nd
GVL-2-TSHa	2,57 ± 0,73	nd	nd	nd
TSHa	8 ± 0,12	>1000 ± 0,02	6,8 ± 2,82	294

Tabela 2: Ensaios antileishmaniais frente a *L. amazonensis* com TSHa conjugado com GVL.

[024] Os estudos contra a forma promastigota e amastigota de *L. mexicana* também mostraram resultados superiores do conjugado e com baixa toxicidade contra macrófagos peritoneais de murinos (Tabela 3).

Compostos	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹) promastigota	CC ₅₀ (μmol L ⁻¹) macrófagos peritoneais	IC ₅₀ amastigota (μmol L ⁻¹)	IS
GVL-1	51,8 ± 0,10	>2000 ± 0,013	7,5 ± 3,53	>267
GVL-1-TSHa	1,85 ± 0,07	>2000 ± 0,02	0,83 ± 0,7	>2410
TSHa	6,3 ± 0,85	>1000 ± 0,01	6,73 ± 0,1	>148

Tabela 3: Ensaios antileishmaniais, com duração de 48h, frente a *L. mexicana* com TSHa conjugado com GVL-1.

[025] Outro peptídeo avaliado foi o peptídeo dimérico sintético (SEQ ID NO: 2), que apresentou atividade antibacteriana (Santos-Filho, N. A.; Righetto, G. M.; Pereira, M. R.; Piccoli, J. P.; Almeida, L. M. T.; Leal, T. C.; Camargo, I. L. B. C.; Cilli, E. M., 2021: *Effect of C-terminal and N-terminal dimerization and alanine scanning on antibacterial activity of the analogs of the peptide p-BthTX*) similar ou aumentada (Santos-Filho, N. A.; Lorenzon, E. N.; Ramos, M. A. S.; Dos Santos, C. T.; Piccoli, J. P.; Bauab, T. M.; Fusco-Almeida, A. M.; Cilli, E. M., 2015: *Synthesis and characterization of an antibacterial and non-toxic dimeric peptide derived from the C-terminal region of Bothropstoxin-I*) em relação ao peptídeo original (p-BthTX-I)₂ (sequência [KKYRYHLKPFCKK]₂), isolado da toxina BthTX-I da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*. O seu mecanismo de ação ainda não é bem definido, no entanto, esse

peptídeo aparentemente não age diretamente na membrana bacteriana, não possuindo capacidade de permeabilizar vesículas (Santos-Filho, N. A.; Marise De Freitas, L.; Dos Santos, C. T.; Piccoli, J. P.; Fontana, C. R.; Fusco-Almeida, A. M.; Cilli, E. M., 2021: *Understanding the mechanism of action of peptide (p-BthTX-I) derived from C-terminal region of phospholipase A2 (PLA)-like bothropstoxin-I on Gram-positive and Gram-negative bacteria*).

[026] As sínteses do peptídeo e do bioconjugado foram realizadas como descrito para o TSHa. O suporte polimérico utilizado neste processo foi a Rink-amida para obtenção do peptídeo na forma carboxiamida.

[027] O peptídeo não mostrou atividade sozinho (JS2144) em *L. amazonensis* na forma promastigota (Tabela 4), mas a conjugação com 1 molécula de guanidina GVL-1 (GVL-1-JS2144) ou com duas moléculas de JS2144 ((GVL-1)₂-JS2144)) mostraram atividade muito elevada (Figura 4). Na forma amastigota a biconjugação mostrou um grande aumento na capacidade antileishmanicida quando conjugadas com 1 ou duas moléculas em suas extremidades N-terminais (Tabela 4).

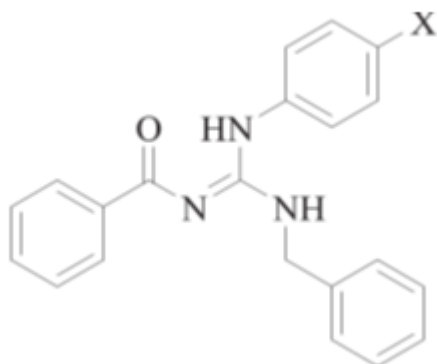
	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹) promastigota	CC ₅₀ (μmol L ⁻¹) macrófagos peritoneais	IC ₅₀ amastigota (μmol L ⁻¹)	IS
JS2144	Não Houve atividade	>2000 ± 0,01*	7,50 ± 0,15*	266,6
(GVL-1)- JS2144	1,10 ± 0,2	550 ± 0,011*	0,9 ± 0,07	2.222
(GVL-1)₂- JS2144	6,25 ± 0,035	>2000 ± 0,11	2,25 ± 0,35	>889

Tabela 4: Ensaios antileishmaniais frente a *L. amazonensis* com JS2144 conjugado com 1 ou duas moléculas de GVL-1.

[028] Desta forma, este pedido de patente de invenção pleiteia englobar o patenteamento de moléculas bioconjugadas com atividade leishmanicida compostas de diferentes guanidinas acopladas a diferentes peptídeos com atividade antimicrobiana.

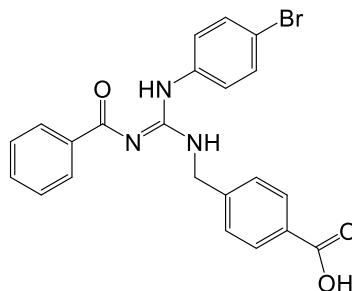
REIVINDICAÇÕES

1. BIOCONJUGAÇÃO DE GUANIDINAS N,N',N''-TRISUBSTITUÍDAS (GQOFG) COM ATIVIDADE ANTILEISHMANICIDA, **caracterizado pela** funcionalização dos peptídeos antimicrobianos (PAM) com drogas antiparasitárias guanidinas N,N',N'' trissubstituídas na região N-terminal dos peptídeos, em que as guanidinas LQOFG-2 e LQOFG-6 e demais guanidinas N,N',N''-trissubstituídas foram modificadas com um grupo carboxila (modificação do LQOFG-2 e LQOFG-6 denominada de GVL-1 e GVL-2, respectivamente), permitindo o acoplamento diretamente à extremidade N-terminal de peptídeos antimicrobianos, apresentando a seguinte estrutura:

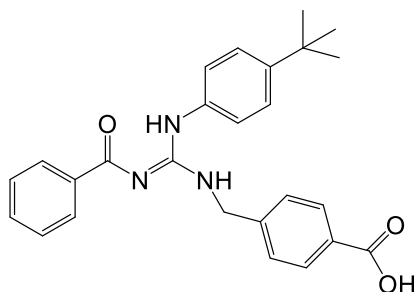


em que os grupamentos X são: LQOFG-2 (X=BR) e LQOFG-6 (X=t-bu).

2. BIOCONJUGADO DE GUANIDINAS N,N',N''-TRISUBSTITUÍDAS (GQOFG) COM ATIVIDADE ANTILEISHMANICIDA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** LQOFG-2 e LQOFG-6 serem modificadas com o grupo carboxila, e apresentarem as seguintes estruturas:



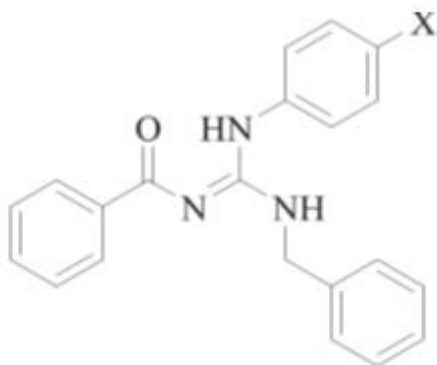
GVL-1 (modificação de LQOFG-2) e



GVL-2 (modificação de LQOFG-6).

3. BIOCONJUGADO DE GUANIDINAS N,N',N''-TRISUBSTITUÍDAS (GQOFG) COM ATIVIDADE ANTILEISHMANICIDA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** peptídeo funcionalizado em sua região N-terminal com a guanidina N,N',N''-trisubstituída GLV-1 ser o peptídeo TSHa (SEQ ID NO:1).
4. BIOCONJUGADO DE GUANIDINAS N,N',N''-TRISUBSTITUÍDAS (GQOFG) COM ATIVIDADE ANTILEISHMANICIDA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** peptídeo funcionalizado em sua região N- terminal com a guanidina N,N',N''-trisubstituída GLV-2 ser o peptídeo TSHa (SEQ ID NO:1).
5. BIOCONJUGADO DE GUANIDINAS N,N',N''-TRISUBSTITUÍDAS (GQOFG) COM ATIVIDADE ANTILEISHMANICIDA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** peptídeo funcionalizado em sua região N-terminal com a guanidina N,N',N''-trisubstituída GLV-1 ser o peptídeo dimérico sintético (desCys 11 /Lys 12 /Lys 13 (p-BthTX-I)₂K).

6. USO DO BIOCONJUGADO DE COMPOSTOS GUANÍDICOS COM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS, **caracterizado por** ser utilizado como alternativa terapêutica no tratamento das leishmanioses e ação contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonenses*.



LQOFG-2. X = Br

LQOFG-6. X = *t*-bu

FIGURA 1

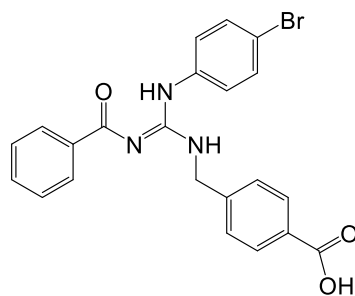
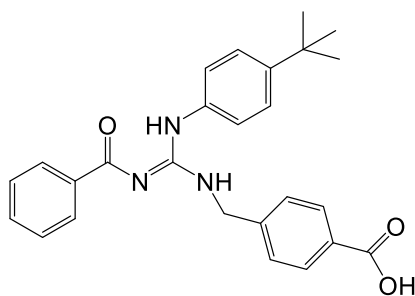
**FIGURA 2A****FIGURA 2B**



FIGURA 3

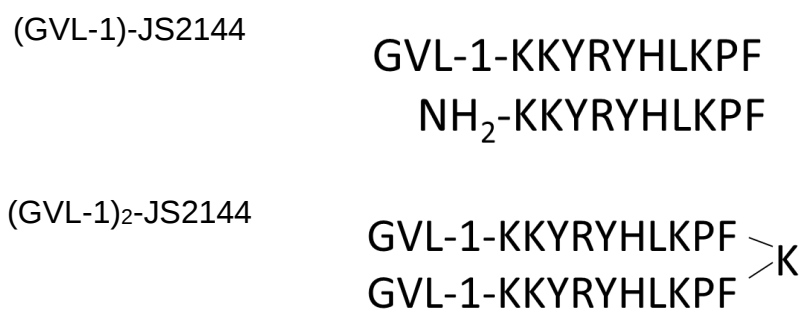


FIGURA 4

RESUMO

BIOCONJUGAÇÃO DE GUANIDINAS N,N',N''-TRISUBSTITUÍDAS COM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E USO DOS BIOCONJUGADOS.

O presente pedido de patente de invenção visa a funcionalização e caracterização da atividade leishmanicida de peptídeos antimicrobianos à guanidinas N,N',N''-trisubstituídas, e o uso da bioconjugação, visando aumentar a potência e seletividade dos mesmo frente ao parasita; e uso dos biconjugados. A funcionalização e caracterização da atividade leishmanicida de peptídeos antimicrobianos aos compostos guanidínicos foi realizada utilizando a síntese de peptídeos em fase sólida por meio da Química Fmoc e confirmou que os bioconjugados são mais potentes frente a amastigotas intracelulares e com alta seletividade para os parasitos quando comparados às células hospedeiras.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: AS260492 item 627020 - 10 nov.xml
- Data de Geração do Código: 06/01/2023
- Hora de Geração do Código: 18:08:08
- Código de Controle:
 - Campo 1: 6BC6436B8D00D909
 - Campo 2: 0B49F9A56F7297EB