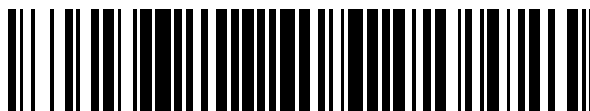


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 285**

51 Int. Cl.:
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09159563 .7**
96 Fecha de presentación: **28.03.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **2105141**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.09.2009**

54 Título: **Péptidos bioactivos cortos y procedimientos para su uso**

30 Prioridad:
28.03.2001 US 820053
28.03.2001 US 279505

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.10.2012

73 Titular/es:
HELIX BIOMEDIX, INC. (100.0%)
22121-17th Ave SE-112
Bothell, WA 98021, US

72 Inventor/es:
OWEN, DON R.

74 Agente/Representante:
UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 389 285 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

Péptidos bioactivos cortos y procedimientos para su uso

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud de patente provisional de EE.UU. con número de serie 60/279.505; presentada el 28 de marzo de 2001 y sobre la solicitud pendiente de patente de EE.UU. con número de serie 09/820,053 presentada el 28 de marzo de 2001.

10

Campo de la invención

La invención se refiere a péptidos de longitud corta que contienen los residuos aminoácidos de fenilalanina, leucina, alanina y lisina (F, L, A, y K; "péptidos FLAK") en su secuencia primaria. En concreto, se divulgan los péptidos FLAK que tienen actividades antimicrobianas, antifúngicas, anticancerosas y otras actividades biológicas deseables.

15

Antecedentes de la invención

20 Tanto en la literatura científica como en las patentes concedidas se han comunicado varios péptidos bioactivos. Históricamente, los péptidos se han aislado de fuentes naturales y recientemente han sido objeto de estudios de relación estructura-función. Adicionalmente, los péptidos naturales han servido como puntos de partida para el diseño de análogos peptídicos sintéticos.

25 En R.E.W. Hancock in 1997 (Lancet 349: 418-422) se publicó una revisión de antibióticos peptídicos. 418-422). Se debatieron la estructura, la función y las aplicaciones clínicas de varias clases de péptidos. En 1998 se publicó una revisión adicional de antibióticos peptídicos catiónicos (Hancock, R.E.W. y Lehrer, R. Trends Biotechnol. 16: 82-88). Normalmente, los péptidos son moléculas antipáticas de 12 a 45 aminoácidos de longitud. Los péptidos permeabilizan las membranas celulares que conducen al control de agentes microbianos. El potencial clínico de los péptidos catiónicos de defensa del huésped fue debatido por R.E.W. Hancock en 1999 (Drugs 57(4): 469-473; Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43(6): 1317-1323). Se debaten las propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, anticancerosas y de cicatrización de heridas de la clase de péptidos.

30

35 Se han publicado revisiones de las características estructurales de los péptidos antimicrobianos helicales y sus supuestos mecanismos de acción (véase, por ejemplo, Dathe, M. y Wieprecht, T. Biochimica et Biophysica Acta 1462: 71-87 (1999); Epanand, R.M. y Vogel H.J. Biochimica et Biophysica Acta 1462: 11-28 (1999)). Los parámetros estructurales que se cree que son capaces de modular la actividad y la selectividad incluyen la helicidad, el momento hidrofóbico, la hidrofobicidad, el ángulo delimitado por las superficies de la hélice hidrofílica/hidrofóbica y el cambio.

40

Se han notificado una amplia selección de péptidos en alfa-hélice naturales. Los siguientes son representativos de las muchas referencias en el campo.

45 Las cecropinas son una familia de péptidos en α -hélice aislados de insectos. Las cecropinas se conocen por sus propiedades antibacterianas, como se describen en las patentes de EE.UU. N° 4,355,104 y 4,520,016. EN general, las cecropinas tienen actividad contra bacterias gramnegativas, pero no contra todas las bacterias gramnegativas. Se descubrió que las cecropinas no tenían actividad contra las células eucarióticas (Andreu, y col., Biochemistry 24: 163-188 (1985); Boman, y col., Developmental and Comparative Immunol. 9: 551-558 (1985); Steiner y col., Nature 292: 246-248 (1981)). Las cecropinas de *Drosophila* y *Hyalphora* se presentaron como que tienen actividad contra varias cepas de hongos (Ekengren, S. y Hultmark, D., Insect Biochem. y Molec. Biol. 29: 965-972 (1999)). Se ha comunicado que la cecropina A del mosquito *Aedes aegypti* es diferente de la mayoría de las cecropinas de insectos en cuanto a que carece de triptófano y de amidación en C-terminal (Lowenberger, C. y col., J. Biol. Chem. 274 (29): 20092-20097 (1999)).

50

55 Las ranas del género *Rana* producen una amplia selección de péptidos antimicrobianos en su piel (Goraya, J. y col., Eur. J. Biochem. 267: 894-900 (2000)). Se notificaron péptidos tan cortos como de 13 aminoácidos y se agruparon en familias estructurales. Las secuencias mostraron poca o ninguna identidad de secuencia con los péptidos aislados de ranas de otros generales, tales como los péptidos magainina y dermaseptina.

60 La patente de EE.UU. N° 5,962,410 divulgó la inhibición de patógenos eucarióticos y la estimulación de linfocitos y fibroblastos con péptidos líticos tales como cecropinas y sarcotoxinas. Varios péptidos presentados incluyen cecropina B, cecropina SB-37, cecropina A, cecropina D, Shiva-1, lepidopteran, sarcotoxina 1A, sarcotoxina 1B, y sarcotoxina 1C.

65 Reed, W.A. y col., Transgenic Res. 6: 337-347 (1997) notificaron ratones transgénicos productores del péptido lítico de clase cecropina Shiva 1. La infección de los ratones transgénicos con una exposición a *Brucella abortus* tuvo

como resultado una reducción del número de bacterias respecto a la infección de ratones no transgénicos.

La magainina es un péptido en α -hélice de 23 aminoácidos aislado de la piel de la rana africana *Xenopus laevis* (Zasloff M. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 5449-5453 (1987)).

5 En las células sanguíneas de oveja, seres humanos, ganado vacuno, cerdos, ratones y conejos se encuentran péptidos en α -hélice de 23 a 28 aminoácidos asociados con catelina (Zanetti, M. y col., FEBS Lett. 374: 1-5 (1995)).

10 Las actividades antimicrobianas de la buforina II, la cecropina P1, la indolicidina, la magainina II, la nisina y la ranalexina fueron comunicadas por Giacomette, A. y col., (Peptides 20: 1265-1273 (1999)). Los péptidos mostraron las actividades variables contra bacterias y levaduras.

Se han preparado y analizado varios péptidos sintéticos tanto *in vitro* como *in vivo*.

15 La patente de EE.UU. N° 5,861,478 ha divulgado péptidos líticos sintéticos de aproximadamente 20 a 40 aminoácidos que adoptan una conformación en α -hélice. Los péptidos son eficaces en el tratamiento de las infecciones microbianas, heridas y cáncer. Los péptidos divulgados incluyen cecropina B, SB-37*, LSB-37, SB-37, Shiva 1 y 10-12, péptido señal de β -fibrina, Manitou 1-2, Hecato 1-3, Anubis 1-5 y 8, y Vishnu 1-3 y 8.

20 El Baghian, A. y col. describió hecato como un análogo peptídico sintético de melitina (Peptides 18(2): 177-183 (1997)). Los péptidos difieren en la distribución de su carga, pero no en su conformación en alfa-hélice antipática. El hecato inhibió el virus del herpes simple (HSV-1), mientras que no afecta de forma adversa al crecimiento celular y la síntesis de proteínas.

25 Los péptidos sintéticos D2A21, D4E1, D2A22, D5C, D5C1, D4E y D4B se describieron en Schwab, U. y col., to Antimicrob. Agents and Chemotherapy 43(6): 1435-1440 (1999). Se presentaron las actividades contra varias cepas bacterianas.

30 Juvvadi, P. y col. (J. Peptide Res. 53: 244-251 (1999)) prepararon y analizaron los péptidos híbridos hechos de péptidos de cecropina y melitina. Los híbridos se sintetizaron para investigar los efectos de la secuencia, la dirección del enlace amida (dipolo de hélice), la carga, la anfipaticidad y la hidrofobicidad sobre la capacidad de formación de canales y sobre la actividad antibacteriana. Se ha sugerido que la secuencia y la dirección del enlace amida son requisitos estructurales importantes para la actividad de los híbridos.

35 Un híbrido de melitina de abeja-cecropina de insecto de 26 aminoácidos, y análogos de los mismos, se describieron en un estudio de resistencia a sales (Friedrich, C. y col., Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43(7): 1542-1548 (1999)). Se descubrió que un residuo de triptófano en la segunda posición era crucial para la actividad. Se encontró que cambios modestos en la secuencia conducían a cambios sustanciales en las propiedades de los péptidos.

40 Se han publicado los efectos de los residuos de prolina sobre las propiedades antibacterianas de los péptidos en α -hélice (Zhang, L. y col., Biochem. 38: 8102-8111 (1999)). Se ha comunicado que la adición de prolinas cambiaba las propiedades de inserción en la membrana y la sustitución de una única prolina puede cambiar un péptido antimicrobiano en una toxina.

45 Se preparó una serie de péptidos que tienen entre 18 y 30 aminoácidos con el fin de analizar los efectos de los cambios en la secuencia y la carga sobre las propiedades antibacterianas (Scott, M.G., y col., Infect. Immun. 67(4): 2005-2009 (1999)). No se encontró ninguna correlación significativa entre la carga o la hidrofobicidad y la actividad antimicrobiana de los péptidos. Se encontró como tendencia general que los péptidos cortos eran menos activos que los péptidos largos, aunque los autores expresaron que este efecto sería, probablemente, dependiente de la secuencia.

50 Las "modelinas", un grupo de péptidos sintéticos, se prepararon y analizaron para comparar las relaciones entre secuencia y estructura (Bessalle, R. y col. Med. Chem. 36: 1203-1209 (1993)). Los péptidos de 16 y 17 aminoácidos que tienen caras opuestas hidrofóbicas e hidrofílicas eran altamente hemolíticos y antibacterianos. Los péptidos más pequeños tendían a tener actividades biológicas menores.

55 Se encontró que un péptido híbrido de cecropina-melitina y un péptido amidado de platija protegían al salmón de infecciones producidas por *Vibrio anguillarum in vivo* (Jia, X. y col., Appl. Environ. Microbiol. 66(5): 1928-1932 (2000)). Se usaron bombas osmóticas para liberar una dosis continua de cualquiera de los péptidos en el pez.

60 Se ha comunicado que los péptidos antipáticos son capaces de potenciar la cicatrización de heridas y estimular el crecimiento de fibroblastos y queratinocitos *in vivo* (patentes de EE.UU. N° 6.001.805 y 5.561.107). Se ha notificado la preparación de plantas transgénicas que expresan péptidos líticos como una proteína de fusión con ubiquitina (patente de EE.UU. N° 6,084,156). Se ha notificado la preparación de péptidos líticos ricos en lisina metilada, que muestran una resistencia proteolítica mejorada (patente de EE.UU. N° 5,717,064).

Aunque existe una serie de péptidos naturales y sintéticos, existe la necesidad de mejores péptidos bioactivos y procedimientos para su uso.

Sumario de la invención

5 Se divulgan péptidos cortos (es decir, de no más de 23 aminoácidos de longitud) que contienen residuos aminoácidos de fenilalanina, leucina, alanina y lisina en su secuencia primaria. Los péptidos muestran actividades biológicas antibacterianas, antifúngicas, anticancerosas y también producen estimulación y proliferación de fibroblastos y linfocitos humanos.

10 Descripción de los listados de secuencias

Los siguientes listados de secuencias forman parte de la presente especificación y están incluidos para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a una o más de estas secuencias en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

Tabla 1

SEC ID N°	Nombre	P-No	Secuencia primaria
	Hecato AC #1010	1	FALALKALKKALKKLLKALKKAL-COOH
2	Hecato AM	2	FALALKALKKALKKLLKALKKAL-NH2
3	S8-37 AG#1 018	5	MPKWKVFKKIEKVGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKALGGOOH
4	Shiva 10 AM	11	FAKKLAKKLLKLLAKKLLAKLALAL-NH2
5	S8-37 AM	12	MPKWKVFKKIEKVGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKALGNH2
6	Shiva 10 AG #1015	13	FAKKLAKKLLKLLAKKLLAKLALAL-GOOH
7	Magainina 2	16	GIGKFLHSAKKFGKAFVGGIMNS-NH2
8	FLAK01 AM	23	FALAAKALKKLLAKKLLKLLAKKAL-N H2
9	FLAK03 AM	24	FALALKALKKLLKLLKLLAKKAL-N H2
10	FLAK04 AM	25	FALALKALKKLLAKKLLKLLAKKAL-NH2
11	FLAK05 AM	26	FALAKLAKKAKAKLKKALKAL-N H2
12	FLAK06 AM	27	FALALKALKKLLKLLKLLAKKAL-NH2
13	FLAK06 AG	28	FALALKALKKLLKLLKLLAKKAL-GOOH
14	FLAK06 R-AG	29	FAKKLAKKLLKLLAKLALAL-GOOH
15	KALV	30	VALALKALKKALKKLLKLLKLLAKKAL-NH2
16	FLAK 17 AM	34	FALALKKALKKALKKAL-NH2
17	FLAK 26 AM	35	FAKKLAKLAKKLLAKLAL-N H2
18	FLAK 25 AM	36	FAKKLAKLAKKLLAKLALAL-N H2
19	Hecato 20Ac	37	FALALKALKKAL-(O)-K-(O)-KLLKALKKAL-GOOH
20	FLAK43 AM	38	FAKKLAKLAKKLLAL-NH2
21	FLAK44AM	39	FAKKLAKLAKKALAL-N H2
22	FLAK62 AM	40	FALAKKALKKAKKAL-N H2
23	FLAK 06R-AM	41	FAKKLAKKLLKLLAKLALAK-NH2
24	MSI-78 AM	42	GIGKFLKAKKFGKAFVKILKK-NH2
25	FLAK50	43	FAKLLAKLAKKLL-N H2
26	FLAK51	44	FAKKLAKLAKLAKL-NH2
27	FLAK57	45	FAKKLAKKLLAKLAL-NH2
28	FLAK71	46	FAKKLKKLAKLAKKLL-N H2
29	FLAK??	47	FAKKALKALKKLL-NH2
30	FLAK50V	48	VAKLLAKLAKKLL-N H2
-31	FLAK50F	49	FAKLLAKLAKKLL-N H2
32	FLAK26V AM	50	VAKKLLAKLAKKLLAKLAL-NH2
33	GAME-15	53	KWKLFKKIGAVLVKLV-NH2
34	FLAK50G	54	FAKLLAKLAKKAL-NH2
35	FLAK500	55	FAKLLAKALKKLL-N H2
36	FLAK50E	56	FAKLLKLAACKLL-N H2
37	FLAK80	57	FAKLLAKKLL-NH2
38	. FLAK81	58	FAKKLAKALL-NH2
39	FLAK82	59	FAKKLAKKLL-NH2
40	FLAK83M	60	FAKLAKKLL-NH2
41	FLAK 26 Ac	61	FAKKLAKLAKKLLAKLAL-GOOH
42	Indolicidina	63	ILPWKWPWWPWRR-NH2
43	FLANK 17G	64	FAKALKALKKALKAL-NH2
44	FLAK50H	65	FAKLLAKLAKAKL-NH2

ES 2 389 285 T3

SEC ID N°	Nombre	P-No	Secuencia primaria
45	FLAKSOG	66	FAKLLAKLAKLKL-N H2
46	Shiva Oeriv P69+KWKL	70	FAKKLAKKLKLLAKKLAKKWKL-NH2
47	Shiva 10 (1-18 AG)	71	FAKKLAKKLKLLAKKLAK-GOOH
48	Shiva 10 péptido 71 +KWKL	72	FAKKLAKKLKLLAKKLAKKWKL-GOOH
49	GA(1-7)Shiva10(1-16)	73	KWKLFKFKTKLFFKFAKKLAKKL-NH2
50	FLAK 54	74	FAKKLAKKLAKAL-N H2
51	FLAK 56	75	FAKKLAKKLAKLL-NH2
52	FLAK 58	76	FAKKLAKKLAKAAL-N H2
53	FLAK 72	77	FAKKLAKKAKLAKKL-N H2
54	FLAK 75	79	FAKKLKLAKKL-NH2
55	Shiva 10 (1-16) Ac	80	KTKLFFKFAKKLAKKLKLLAKKL-GOOH
56	GA(1-7)Shiva10 (1-16)-GOOH	81	KWKLFKFKTKLFFKFAKKLAKKL-GOOH
57	Indolicidina-ac	91	ILPWKWPWWPWRR-GOOH
58	FLAK50B		FAKALAKLAKKLL-NH2
59	FLAK50J	93	FAKLLAKLAKKAA-NH2
60	FLAK50I	94	FAKLLALALKLL-NH2
61	FLAK50K	95	FAKLLAKLAKAKA-NH2
62	FLAK50L	96	FAKLLAKLAKAKG-NH2
63	Shiva-11	98	FAKKLAKKLKLLAKKLAKLALAKLAKAL-NH2
64	Shiva 11 [(1-16)ME (2-9)-GOOH	99	FAKKLAKKLKLLAKKLIGAVLKV-GOOH
65	FLAK50N	101	FAKLLAKALKLKL-N H2
66	FLAK 500	102	FAKLLAKALKKAL-NH2
67	FLAK50P	103	FAKLLAKALKKL-N H2
68	GA (1-&Hecato (11/23)	104	KWKLFKALKKLLKALKKAL-N H2
69	PYL-ME	105	KIAKVALAKLGIGAVLKVITGL-NH2
70	FLAG26-01	106	FAKKLAKLAKKL-NH2
71	Vishnu3	107	MPKEKVFLKIEKMGRNIRN-NH2
72	Melitina	108	GIGAVLKVLTIGLPALISWIKRKRQQ-NH2
73	FLAK26-02	109	FAKKLAKLAKKLAKAL-NH2
74	FLAG26-03	110	FAKKLLAKALKL-N H2
75	FLAK50 Q1	111	FAKFLAKFLKKAL-NH2
76	FLAK50 Q2	112	FAKLLFKALKKAL-N H2
77	FLAK50 Q3	113	FAKLLAKFLKKAL-N H2
78	FLAK50 Q4	114	FAKLLAKAFKKAL-NH2
79	FLAK50 Q5	117	FAKLFKAFKKAL-NH2
80	FLAK50 Q6	118	FAKLLAKALKKFL-N H2
81	FLAK50 Q7	119	FAKLLAKALKKFAL-NH2
82	FLAK50 Q8	120	FAKLLAKLAKKFAL-NH2
83	FLAK50 Q9	121	FAKLFKALAKKFAL-NH2
84	FLAK50 Q10	122	FKLAFKLAFFAL-NH2
85	FLAK50 T1	123	FAKLLAKLAK-NH2
86	FLAK50 T2	124	FAKLLAKLAKKVL-NH2
87	FLAK50 T3	125	FAKLLAKLAKKIL-NH2
88	FLAK50 T4	126	FAKLLAKLAKKEL-NH2
89	FLAK50 T5	127	FAKLLAKLAKKSL-NH2
90	FLAK90	128	FAKLA-NH2
91	FLAK91	129	FAKLF-NH2
92	FLAK92	130	KAKLF-NH2
93	FLAK93	131	KWKLF-NH2
94	FLAK50 Z1	132	FGKGIGKVGKLL-NH2
95	FLAK50 Z2	133	FAFGKGIGKVGKLL-NH2
96	FLAK50 Z3	134	FAKAIKIAFGKG IGVGKLL-N H2
97	FLAK50 Z4	135	FAKLWAKLAFGKGIGKVGKLL-NH2
98	FLAK50 Z5	136	FAKLWAKLAKKL-NH2
99	FLAK50 Z6	137	FAKGVGKVGKAL-NH2
100	FLAK50 Z7	138	FAFGKGIGKIGKGL-NH2
101	FLAK50 Z8	139	FAKIIAKIAKILNH2
102	FLAK50Z9	140	FAFAKIIAKIAKII-NH2
103	FLAK94	141	FALAKA-NH2
104	FLAK93B	142	KWKLAKKALALL-NH2

ES 2 389 285 T3

SEC ID N°	Nombre	P-No	Secuencia primaria
105	FLAK50 Z10	143	FAKHAKIAKKI-NH2
106	FLAK96	144	FALALKALKKAL-N H2
107	FLAK97	145	FALKALKK-NH2
108	FLAK98	146	KYKKALKKLAKLL-NH2
109	FKRLA	147	FKRLAKIKVRLAKIKR-NH2
110	FLAK91 B	148	FAKLAKKALAKL-NH2
111	FLAK92B	149	KAKLAKKALAKLL-NH2
112	FLAK99	150	KLALKLALKALKAAKLA-NH2
113	FLAK50T6	151	FAKLLAKLAKK-NH2
114	FLAK5077	152	FAKLLAKLAKKGL-N H2
115	FLAK95	153	FALKALKKLLKALKKAL-NH2
116	FLAK50TB	154	VAKLLAKLAKKVL-NH2
117	FLAK50T9	155	YAKLLAKLAKKAL-NH2
118	FLAK100-C02H	156	KLLKLLKLYKLLKLL-COOH
119	FAGVL	157	FAVGLRAIKRALKKLRGVRKVAKOL-NH2
120	Modelina-5	159	KLAKKLAKLAKLAKAL-N H2
121	Modelina-5-C02H	160	KLAKKLAKLAKLAKAL-COOH
122	Modelina-8	161	KWKKLAKKW-NH2
123	Modelina-8-C02H	162	KWKKLAKKW-COOH
124	Modelina-1	163	KLWKKWAKKWKLWKAW-NH2
125	Modelina-1-C02H	164	KLWKKWAKKWKLWKA-COOH
126	FLAK120	165	FALALKALKKL-NH2
127	FLAK121	166	FALAKALKKAL-NH2
128	FLAK96B	167	FALALKLAKKAL-N H2
129	FLAK96G	168	FALLKL-NH2
130	FLAK96F	169	FALALKALKK-NH2
131	FLAK96C	170	FALKALKKAL-NH2
132	FLAK960	171	FALLKALKKAL-NH2
133	Modelina-8B	172	KWKK-NH2
134	Modelina-8C	173	KWKKL-NH2
135	Modelina-80	174	KFKKLAKKF-NH2
136	Modelina-8E	175	KFKKLAKKW-NH2
137	Flak 96	176	FALALKALKKA-NH2
138	Flak 961	177	FALLKALLKAL-NH2
139	Flak 96J	178	FALALKLAKKL-NH2
140	Flak 96L	179	LKKLAKLALAF-NH2
141	FLAK-120G	180	VALALKALKKL-N H2
142	FLAK-1200	181	FALALKLKL-NH2
143	FLAK-120C	182	FALALKAKKL-N H2
144	FLAK-120B	183	FALA-NH2
145	FLAK-120F	184	WALAL-NH2
146	Magainina2wisc	300	GIGKFLHAAKKFAKAFVAEIMNS-NH2
147	02A21	301	FAKKFAKKFKKFAKKFAKFAF-NH2
148	KSL-1	302	KKWFKVKPK-NH2
149	KSL-7	303	FKVKFKVK-NH2
150	LSB-37	306	LPKWVFKKIEKVGVRNIRNGIVKAGPAI AVLGEAKALGNH2
151	Anubis-2	307	FAKKLAKKLKLLAKKLAKLAKL-N H2
152	FLAK17CV	501	VAKALKALKKAL-N H2
153	FLAK50Q1V	502	VAKFLAKFLKAL-N H2
154	02A21 V	503	VAKKFAKKFKKFAKKFAKFAF-NH2
155	FLAK25AMV	504	VAKKLAKLAKKLAKLALAL-N H2
156	FLAK43AMV	505	VAKKLAKLAKKLLAL-N H2
157	FLAK500V	506	VAKLLAKALKLL-N H2
158	HECATO AMV	507	VALALKALKKALKKLLKALKKAL-N H2
159	HECATO ACV	508	VALALKALKKALKKLLKALKKAL-COOH '
160	FLAK04AMV	509	VALALKALKKLLAKKLLAKKALNH2
161	FLAK03AMV	510	VALALKALKKLLKLLKLLAKKAL-N H2
162	O-Shiva 10 AC	67	(O)-FAKKLAKKLKLLAKKLAKLALAL-COOH
163	Shiva 11 AC	100	FAKKLAKKLKLLAKKLAKLALALALKA-COOH
164	Shiva 10 (1-18)AM	69	FAKKLAKKLKLLAKKLAK-NH2
165	FLAK50M	97	FAKLLALALKKAL-N H2

Descripción detallada de la invención

En general, la invención está dirigida a los péptidos que tienen propiedades biológicas deseables y su uso. Es sorprendente que los péptidos son eficaces debido a su corta longitud en comparación con otros péptidos descritos en la técnica.

Péptidos

Una realización de la invención está dirigida a un péptido aislado, en el que la secuencia aminoácido del péptido consiste en las SEC ID N° 43, SEC ID N° 20, SEC ID N° 25, SEC ID N° 26, SEC ID N° 35, SEC ID N° 39, SEC ID N° 81, SEC ID N° 91, SEC ID N° 92, SEC ID N° 129 o la SEC ID N° 138.

Preferentemente, la secuencia del péptido es la SEC ID N° 43, SEC ID N° 129, SEC ID N° 91 o la SEC ID N° 92.

La divulgación también se refiere a péptidos que pueden ser similares a cualquiera de los péptidos descritos anteriormente y, preferentemente, son similares a la SEC ID N° 25 o la SEC ID N° 43 según se determine mediante el porcentaje de identidad. El porcentaje de identidad entre los péptidos es, preferentemente, de al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. El porcentaje de identidad se determina usando una alineación de secuencia mediante el producto comercial CLUSTALW. El número de aminoácidos alineados se dividen por la longitud del péptido más corto y el resultado se multiplica por 100 % para determinar el porcentaje de identidad. Si la longitud del péptido más corto es menos de 10 aminoácidos, el número de aminoácidos alineados se divide por 10 y el resultado y se multiplica por 100 % para determinar el porcentaje de identidad.

Los péptidos pueden comprender aminoácidos D o L. Los péptidos pueden comprender todos los aminoácidos D. Los péptidos pueden tener un extremo C ácido (-CO₂H) o un extremo C amida (-CONH₂, -CONHR, o -CONR₂).

Procedimientos de uso

Una realización adicional de la invención está dirigida hacia el uso de los péptidos descritos anteriormente como un medicamento. El uso, preferentemente, no produce lesiones ni mata las células de mamífero no infectadas normales. El uso a dosis terapéuticas, preferentemente, no produce lesiones ni mata las células de mamífero no infectadas normales o no neoplásicas. El uso puede implicar el uso de un único péptido o puede implicar el uso de múltiples péptidos.

Una realización de la invención es el uso de los péptidos descritos anteriormente para inhibir o matar células microbianas (microorganismos). Los microorganismos pueden ser células bacterianas, células fúngicas, protozoos, virus o células eucarióticas infectadas con microorganismos patogénicos. En general, el procedimiento está dirigido al contacto de microorganismos con el péptido. La etapa del contacto se puede realizar in vivo, in Vitro, tópicamente, oralmente, transdérmicamente, sistémicamente o mediante cualquier otro procedimiento conocido para los expertos en la técnica. Preferentemente, la etapa de contacto se realiza a una concentración suficiente para inhibir o matar los microorganismos. La concentración del péptido puede ser al menos aproximadamente 0,1 μM, al menos aproximadamente 0,5 μM, al menos aproximadamente 1 μM, al menos aproximadamente 10 μM, al menos aproximadamente 20 μM, al menos aproximadamente 50 μM, al menos aproximadamente 100 μM.

Los procedimientos de uso pueden estar dirigidos hacia la inhibición o destrucción de microorganismos tales como bacterias, bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, micobacterias, levaduras, hongos, algas, protozoos, virus y organismos intracelulares. Ejemplos específicos incluyen, entre otros, *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Chlamydia*, *Candida albicans*, *Saccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Trypanosoma cruzi* o *Plasmodium falciparum*. La etapa de contacto se puede realizar mediante inyección sistémica, inyección oral, subcutánea, IP, IM, inyección IV o mediante aplicación tópica. Para inyección, la dosis puede estar entre cualquiera de las concentraciones siguientes: aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, and aproximadamente 100 mg/kg. La etapa de contacto se puede realizar en un mamífero, un gato, un perro, una vaca, un caballo, un cerdo, un ave, un pollo, una planta, un pez o un ser humano.

Los péptidos útiles para aplicaciones antibacterianas incluyen las SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 4, SEC ID N° 6, SEC ID N° 8, SEC ID N° 10, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, SEC ID N° 13, SEC ID N° 14, SEC ID N° 15, SEC ID N° 16, SEC ID N° 17, SEC ID N° 18, SEC ID N° 19, SEC ID N° 20, SEC ID N° 23, SEC ID N° 25, SEC ID N° 26, SEC ID N° 27, SEC ID N° 28, SEC ID N° 30, SEC ID N° 31, SEC ID N° 32, SEC ID N° 34, SEC ID N° 35, SEC ID N° 36, SEC ID N° 41, SEC ID N° 43, SEC ID N° 45, SEC ID N° 46, SEC ID N° 50, SEC ID N° 51, SEC ID N° 52, SEC ID N° 55, SEC ID N° 56, SEC ID N° 57, SEC ID N° 58, SEC ID N° 60, SEC ID N° 65, SEC ID N° 66, SEC ID N° 67, SEC ID N° 68, SEC ID N° 74, SEC ID N° 75, SEC ID N° 77, SEC ID N° 80, SEC ID N° 81, SEC ID N° 84, SEC ID N° 86, SEC ID N° 87, SEC ID N° 93, SEC ID N° 106, SEC ID N° 108, SEC ID N° 112, SEC ID N° 115, SEC ID N° 126, SEC ID N° 128, SEC ID N° 162, SEC ID N° 163, SEC ID N° 164 y la SEC ID N° 165.

Los péptidos útiles para aplicaciones antifúngicas incluyen las SEC ID N° 2, SEC ID N° 10, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, SEC ID N° 13, SEC ID N° 16, SEC ID N° 17, SEC ID N° 25, SEC ID N° 30, SEC ID N° 35, SEC ID N° 58, SEC ID N° 66, SEC ID N° 67, SEC ID N° 80, SEC ID N° 81, SEC ID N° 84, SEC ID N° 85, SEC ID N° 86, SEC ID N° 106, SEC ID N° 108, SEC ID N° 115, SEC ID N° 116, SEC ID N° 126, SEC ID N° 128, SEC ID N° 131, SEC ID N° 143, SEC ID N° 163 y la SEC ID N° 165.

Los péptidos descritos anteriormente se pueden usar para inhibir o matar las células cancerosas. En general, el procedimiento está dirigido al contacto de las células cancerosas con el péptido. La etapa del contacto se puede realizar in vivo, in Vitro, tópicamente, oralmente, transdérmicamente, sistémicamente o mediante cualquier otro procedimiento conocido para los expertos en la técnica. Preferentemente, la etapa de contacto se realiza a una concentración suficiente para inhibir o matar las células cancerosas. La concentración del péptido puede ser de al menos aproximadamente 0,1 μM , al menos aproximadamente 0,5 μM , al menos aproximadamente 1 μM , al menos aproximadamente 10 μM , al menos aproximadamente 20 μM , al menos aproximadamente 50 μM , o al menos aproximadamente 100 μM . En general, las células cancerosas pueden ser cualquier tipo de células cancerosas. Las células cancerosas pueden ser sarcomas, linfomas, carcinomas, leucemias, células de cáncer de mama, células de cáncer de colon, células de cáncer de piel, células de cáncer de ovarios, células de cáncer cervical, células de cáncer testicular, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de próstata y células de cáncer de piel. La etapa de contacto se puede realizar mediante inyección subcutánea, inyección IP, inyección IM, inyección IV, inyección directa en el tumor o aplicación tópica. Para inyección, la dosis puede estar entre cualquiera de las concentraciones siguientes: aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 1 mg/Kg, aproximadamente 5 mg/kg aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg and aproximadamente 100 mg/kg. La etapa de contacto se puede realizar en un mamífero, un gato, un perro, una vaca, un caballo, un cerdo, un ave, un pollo, una planta, un pez o un ser humano. La inhibición de las células cancerosas puede ser, en general, cualquier inhibición del crecimiento de las células cancerosas en comparación con las células cancerosas sin tratamiento peptídico. Preferentemente, la inhibición es de al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % e idealmente 100 % de inhibición del crecimiento. La inhibición se puede conseguir mediante lisis de las células cancerosas o por otros medios. El péptido inhibidor de cáncer se puede usar sinérgicamente con otros agentes quimioterapéuticos contra el cáncer.

Los péptidos útiles para aplicaciones anticancerosas incluyen las SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 8, SEC ID N° 11, SEC ID N° 13, SEC ID N° 16, SEC ID N° 17, SEC ID N° 18, SEC ID N° 19, SEC ID N° 20, SEC ID N° 25, SEC ID N° 26, SEC ID N° 29, SEC ID N° 30, SEC ID N° 32, SEC ID N° 35, SEC ID N° 46, SEC ID N° 51, SEC ID N° 56, SEC ID N° 57, SEC ID N° 58, SEC ID N° 60, SEC ID N° 68, SEC ID N° 75, SEC ID N° 86, SEC ID N° 152 y la SEC ID N° 162.

Un procedimiento para promocionar la estimulación y/o proliferación de células puede comprender poner en contacto las células y una composición, en el que la composición comprende un péptido. El péptido puede ser cualquiera de los péptidos descritos anteriormente. La concentración del péptido en la composición puede ser de aproximadamente 0,01 μM a aproximadamente 500 μM , aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 100 μM , aproximadamente 1 μM a aproximadamente 5.0 μM , o aproximadamente 1 μM a aproximadamente 10 μM . En general, las células pueden ser cualquier tipo de células y, preferentemente, son células de mamífero, incluidas específicamente, entre otras, fibroblastos y leucocitos, incluidas linfocitos y fagocitos. La estimulación y/p proliferación metabólica de las células aumenta en al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 % o 200 % respecto a las mismas células que no están en contacto con la composición. La composición puede comprender además un factor de crecimiento. Las propiedades de estimulación y proliferación de algunos de los péptidos FLAK son prometedoras para su aplicación en el cuidado de la piel, la cicatrización de heridas y en la inmunomodulación de sistemas inmunitarios de mamífero comprometidos.

Los péptidos útiles para aplicaciones de estimulación y proliferación incluyen las SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 8, SEC ID N° 10, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, SEC ID N° 13, SEC ID N° 14, SEC ID N° 15, SEC ID N° 16, SEC ID N° 17, SEC ID N° 20, SEC ID N° 27, SEC ID N° 28, SEC ID N° 30, SEC ID N° 32, SEC ID N° 34, SEC ID N° 45, SEC ID N° 46, SEC ID N° 50, SEC ID N° 51, SEC ID N° 55, SEC ID N° 56, SEC ID N° 57, SEC ID N° 58, SEC ID N° 59, SEC ID N° 60, SEC ID N° 61, SEC ID N° 65, SEC ID N° 66, SEC ID N° 71, SEC ID N° 74, SEC ID N° 75, SEC ID N° 77, SEC ID N° 80, SEC ID N° 81, SEC ID N° 87, SEC ID N° 90, SEC ID N° 91, SEC ID N° 92, SEC ID N° 108, SEC ID N° 115, SEC ID N° 116, SEC ID N° 126, SEC ID N° 127, SEC ID N° 129, SEC ID N° 132, SEC ID N° 137, SEC ID N° 138, SEC ID N° 139, SEC ID N° 140, SEC ID N° 141, SEC ID N° 142, SEC ID N° 143, SEC ID N° 144, SEC ID N° 145, SEC ID N° 159, SEC ID N° 162, SEC ID N° 164 y la SEC ID N° 165.

Un procedimiento para estimular la cicatrización de heridas de la piel o tejidos del organismo oculares o internos dañados por el envejecimiento normal, enfermedad, lesiones o mediante cirugía u otros procedimientos médicos puede comprender administrar en la herida de un animal una composición, en la que la composición comprende cualquiera de los péptidos descritos anteriormente. La concentración del péptido en la composición puede ser de aproximadamente 0,01 μM a aproximadamente 500 μM , aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 100 μM , aproximadamente 1 μM a aproximadamente 50.0 μM , o aproximadamente 1 μM a aproximadamente 10 μM . La composición se puede administrar en la herida por vía tópica o mediante liberación sistémica. En general, el animal

puede ser cualquier tipo de animal, preferentemente es un mamífero y, más preferentemente, es un ser humano, una vaca, un caballo, un gato, un perro, un cerdo, una cabra o una oveja. La estimulación de la cicatrización de heridas es, preferentemente, al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 % o 200 % respecto a la misma herida que no está en contacto con la composición.

5 Los péptidos útiles para aplicaciones de cicatrización de heridas incluyen las SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 8, SEC ID N° 10, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, SEC ID N° 13, SEC ID N° 14, SEC ID N° 15, SEC ID N° 16, SEC ID N° 17, SEC ID N° 20, SEC ID N° 27, SEC ID N° 28, SEC ID N° 30, SEC ID N° 32, SEC ID N° 34, SEC ID N° 45, SEC ID N° 46, SEC ID N° 50, SEC ID N° 51, SEC ID N° 55, SEC ID N° 56, SEC ID N° 57, SEC ID N° 58, SEC ID N° 59, SEC ID N° 60, SEC ID N° 61, SEC ID N° 65, SEC ID N° 66, SEC ID N° 71, SEC ID N° 74, SEC ID N° 75, SEC ID N° 77, SEC ID N° 80, SEC ID N° 81, SEC ID N° 87, SEC ID N° 90, SEC ID N° 91, SEC ID N° 92, SEC ID N° 93, SEC ID N° 115, SEC ID N° 116, SEC ID N° 126. "SEC ID N° 129 y la SEC ID N°: 138.

15 La potenciación aditiva o sinérgica de la actividad de un agente terapéutico puede comprender preparar una composición, en la que la composición comprende un péptido y un agente terapéutico. Como alternativa, la potenciación aditiva o sinérgica de la actividad de un agente terapéutico puede comprender co-terapia con un péptido (o péptidos) usado junto con otros agentes terapéuticos. El péptido puede ser cualquiera de los péptidos descritos anteriormente. En general, el agente terapéutico puede ser cualquier agente terapéutico y es, preferentemente, un antibiótico, un agente antimicrobiano, un factor de crecimiento, un agente quimioterapéutico, un agente antimicrobiano, lisozima, un agente quelante o EDTA. Preferentemente, la actividad de la composición es mayor que la actividad de la misma composición que contiene el agente terapéutico pero que carece del péptido. La composición o co-terapia se puede usar en aplicaciones *in vitro*, *in vivo*, tópica, oral, IV, IM, IP o transdérmica. La estimulación de la activación de la composición que contiene el agente terapéutico y el péptido es, preferentemente, al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 % o 200 % respecto a la actividad del agente terapéutico solo.

20 En general, se prefiere cualquier péptido que es activo de forma autónoma contra una diana para usar para incrementar, de forma aditiva o sinérgica, la actividad de otro agente terapéutico contra la diana. Si hay varios péptidos candidatos para una aplicación de sinergia dada, los péptidos menos tóxicos se considerarían más favorablemente.

30 Los péptidos de la presente invención descritos anteriormente se pueden usar en el tratamiento de los pacientes con un diagnóstico de fibrosis quística (FQ), dichas infecciones pulmonares a menudo son causadas por *P. aeruginosa*. La FQ produce, entre otros efectos, inflamación e infección de los pulmones. Los péptidos de la invención pueden poseer propiedades antiinflamatorias, lo que les convierte en útiles para el tratamiento de las infecciones pulmonares en pacientes con FQ. El péptido se puede administrar al paciente con FQ mediante cualquier procedimiento aceptable, incluyendo inhalación o liberación sistémica. El péptido se puede administrar en una única dosis, en múltiples dosis o como liberación continua.

40 Muchas de las especies fúngicas responsables de enfermedades de transmisión sexual (ETS) son inhibidas y destruidas por los péptidos de la invención descritos anteriormente. Ejemplos de dichas especies incluyen *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*. Los péptidos de la invención se pueden usar adicionalmente contra otros agentes responsables de ETS, incluidos virus y bacterias. Los péptidos se pueden administrar al paciente con ETS mediante cualquier procedimiento aceptable, tal como liberación tópica, oral o sistémica. El péptido se puede administrar en una única dosis, en múltiples dosis o como liberación continua. El péptido se puede administrar por cualquier forma aceptable, tal como una crema, gel o líquido.

45 Los péptidos de la invención tienen actividad contra las bacterias aisladas de granos de acné, *Propionibacterium acnes*, y pueden además poseer propiedades antiinflamatorias. El péptido puede estar presente en una composición terapéutica clínica o en una composición cosmética. El péptido se puede administrar por cualquier forma aceptable, tal como una crema, gel o líquido. El péptido se puede administrar por cualquier forma aceptable, tal como administración tópica. El péptido se puede usar en un procedimiento de tratamiento o de un modo preventivo para reducir o eliminar futuros brotes de acné.

50 Se ha demostrado que los péptidos de la invención estimulan el colágeno y los fibroblastos y que estimulan la cicatrización de heridas. La inclusión de los péptidos de la invención en formulaciones cosméticas puede ser útil en los mercados anti-envejecimiento y rejuvenecimiento.

55 Los péptidos de la invención tienen una potencia elevada contra las bacterias más asociadas con las infecciones de heridas. *S. aureus*, *S. pyogenes* y *P. aeruginosa*. Los péptidos también estimulan la cicatrización de heridas y la reducción de la inflamación. El péptido se puede administrar por cualquier forma aceptable, tal como una crema, gel o líquido. El péptido se puede administrar por cualquier forma aceptable, tal como administración tópica o administración sistémica.

60 Los ejemplos siguientes se han incluido para demostrar las formas de realización preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deben apreciar que las técnicas divulgadas en los ejemplos siguientes representan técnicas

descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención y, por tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. No obstante, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las formas de realización específicas que se divulgan y seguir obteniendo un resultado parecido o similar sin desviarse del alcance de la invención tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Cepas microbianas

En la tabla siguiente se enumeran los diversos microorganismos usados a lo largo de los Ejemplos.

Tabla 2

Microorganismo	Referencia o fuente
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538 y ATCC25923
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC9027 y ATCC27853
<i>Staphylococcus intermedius</i>	ATCC19930 y ATCC20034
<i>Cy ida albicans</i>	ATCC10231
<i>Escherichia coli</i> UB 1005	D. Clark, FEMS Microb. Lett. 21:189-195,1984
<i>Salmonella typhimurium</i> 14028S	Fields y col., Science243: 1059-1 062, 1989
<i>Staphylococcus aureus</i> SAP0017	Aislamiento clínico resistente a meticilina del Prof. 1 Chow, Vancouver General hospital
<i>Staphylococcus epidermidis</i> C621	Aislamiento clínico de David. Speer
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC19615
<i>Streptococcus pyogenes</i> M76	Del Prof. R. Gallo (UCSD)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC6305-C718
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC49619-C719
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> H187	Angus, y col., AAC 21 :299-309, 1982
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> H374 (<i>nfxB</i> <i>efflux</i> mutant)	Masuda, N., y col., AAC, 36: 1847-1851, 1992
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> H744 <i>nalB</i> mutante de eflujo con múltiples resistencias	Poole, K., y col. J. Bacteriol. 175-7363-7372, 1993
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 100609	Cepa resistente a tobramicina del Prof. D. Woods (U. Calgary)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 105663	Cepa resistente a tobramicina del Prof. D. Woods (U. Calgary)
<i>Candida albicans</i> 105	Del Prof Barbara Dill (UBC)
<i>Candida guilliermondii</i>	ATCC8492
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC13803
<i>Candida glabrata</i>	ATCC15126
<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC6919
<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC11827
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC19606

Ejemplo 2: Ensayos antimicrobianos I

Los datos para el siguiente ensayo antimicrobiano de los péptidos se han obtenido realizando mediciones de la DO en experimentos de cultivo celular *in vitro* con y sin péptido añadido. El protocolo usado es el siguiente.

Las líneas celulares incluyeron *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 o 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 o 27853. Los medios usados fueron medio con antibiótico 3 (Difco), medio con antibiótico 2 (Difco) y solución salina al 0,85 %. Los controles usados fueron solución salina fisiológica y gentamicina a 50, 25, 10, 5,1 y 0,1 ppm.

La preparación de todos los medios, soluciones madre u diluciones se produjo en una campana de flujo laminar para evitar la contaminación. Las células bacterianas se cultivaron en fresco en agar con medio antibiótico 2 inclinado (pH 7,0 a 25 °C). Las bacterias se suspendieron y diluyeron en medio antibiótico 3 hasta aproximadamente 10^4 ufc/ml y se usaron como inóculo. Las soluciones de muestra (100 µl/pocillo) se añadieron a las placas de acuerdo con la distribución de la placa. Se añadió el inóculo (100 µl/pocillo) hasta alcanzar una concentración final de 5×10^3 ufc/ml. Los controles negativos recibieron 100 µl de solución salina y 100 µl de medio de crecimiento. Los controles positivos recibieron 100 µl de solución salina y 100 µl de inóculo. Las placas bacterianas se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

ES 2 389 285 T3

La absorbancia se leyó a 620 nm tras agitación a las células resuspendidas. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como la concentración de péptido más baja que inhibe completamente el crecimiento del organismo de ensayo.

5 El ensayo de levaduras se realizó en medio RPMI 1640 (pH 7,0 a 25° C).

Los datos presentados en la Tabla 3 se obtuvieron usando el protocolo anterior. No obstante, los datos para la Tabla 4 se obtuvieron con un protocolo modificado, en el que el medio fue caldo de soja con tristoná, la fuerza del inóculo fue de aproximadamente 10^4 UFC por ml y los valores determinados fueron concentraciones mínimas bactericidas (CMB) o concentraciones mínimas fungicidas (CMF).

10 La tabla 3 siguiente describe las propiedades antimicrobianas de los péptidos medidas como los valores de CMI o CMF en $\mu\text{g/ml}$. Staph6538 es *Staphylococcus aureus*, número de registro en la ATCC 6538; paerug9027 es *Pseudomonas aeruginosa* número de registro en la ATCC 9027, la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

15

Tabla 3

NDmbre	SEC ID N°	Número P	staph6538	paerug9027	Levad ura
Hecato AC # 1010	1	1	5	10	>
Hecato AM	2	2	25	100	25
SB-37 AC # 1018	3	5	100	50.	>
SB-37 AM	5	12	>	100	>
Shiva 10AC#1015	6	13	10	>	>
FLAK01 AM	8	23	5	50	100
FLAK04 AM	10	25	10	5	25
FLAK05 AM	11	26	10	15	>
FLAK06 AM	12	27	10	10	25
KALV	15	30	>	>	ND
FLAK 17 AM	16	34	5	50	25
FLAK 26 AM	17	35	5	200	25
Hecato 2DAc	19	37	5	100	50
FLAK43 AM	20	38	5	50	50
FLAK44AM	21	39	100	25	100
FLAK62 AM	22	40	100	25	100
FLAK 06R-AM	23	41	10	10	ND
MSI-78 AM	24	42	10	>	200
FLAK50	25	43	5	100	25
FLAK51	26	44	5	5	50
FLAK57	27	45	5	100	100
FLAK71	28	46	10	5	50
FLAK77	29	47	200	100	50
FLAK50V	30	48	5	5	25
FLAK50F	31	49	10	200	50
FLAK26V AM	32	50	5	15	50
CAME-15	33	53	5	15	50
FLAK50C	34	54	5	50	50
FLAK500	35	55	200	5	25
FLAK50E	36	56	200	5	50
FLASK80	37	57	100	200	200
FLAK81	38	58	100	100	200
FLAK82	39	59	>	>	>
FLAK83M	40	60	200	100	200
FLAK 17 C	43	64	5	>	200
FLAK 50H	44	65	15	50	200
FLAK 50G	45	66	5	50	100
Shiva deriv P69+KWKL	46	70	10	>	100
Shiva 10 (1-18_AC	47	71	15	15	200
CA(1-7)Shiva10(1-16)	49	73	50	15	100
FLAK 54	50	74	15	5	100
FLAK 56	51	75	5	5	50
FLAK 58	52	76	10	100	200

ES 2 389 285 T3

NDmbre	SEC ID Nº	Número P	staph6538	paerug9027	Levad ura
FLAK 72	53	77	200	100	200
FLAK 75	54	79	100	200	100
Shiva 10(1-16) Ac	55	80	10	100	100
CA(1-7)Shiva10(1-16)-COOH	56	81	10	>	>
Undolocidin-ac	57	91	10	>	>
FLAK50B	58	92	5	5	50
FLAK501	60	94	10	>	>
FLAK50K	61	95	100	200	>
FLAK50L	62	96	>	>	>
Shiva-11	63	98	>	>	>
Shiva 11 [(1-16)ME(2-9)]-COOH	64	99	100	>	>
FLAK 50N	65	101	10	25	100
FLAK 500	66	102	5	10	50
FLAK 50P	67	103	10	25	100
CA(1-&Hecato(11/23)	68	104	10	10	200
PYL-ME	69	105	200	200	>
FLAG26-01	70	106	100	25	100
Vishnu3	71	107	>	>	>
Melitina	72	108	5	>	25
FLAK26-02	73	109	>	200	200
FLAG26-03	74	110	>	200	200
FLAK50 Q1	75	111	5	100	200
FLAK50 Q2	76	112	50	200	100
FLAK50 Q3	77	113	10	200	200
FLAK50 Q4	78	114	50	15	100
FLAK50 Q5	79	117	100	200	200
FLAK50 Q6	80	118	10	100	100
FLAK50 Q7	81	119	50	25	50
FLAK50 Q8	82	120	50	200	200
FLAK50 Q9	83	121	50	>	100
FLAK50 T1	85	123	50	200	100
FLAK50 T2	86	124	5	100	100
FLAK50 T3	87	125	10	100	50
FLAK50 T4	88	126	>	>	>
FLAK50 T5	89	127	100	25	100
FLAK90	90	128	>	100	200
FLAK91	91	129	100	25	100
FLAK92	92	130	200	200	200
FLAK93	93	131	25	10	100
FLAK50 Z1	94	132	>	100	>
FLAK50 Z2	95	133	>	>	>
FLAK50 Z3	96	134	100	>	200
FLAK50 Z4	97	135	15	10	50
FLAK50 Z5	98	136	100	50	100
FLAK50 Z6	99	137	>	>	>
FLAK50 Z7	100	138	>	>	>
FLAK50 Z8	101	139	50	25	200
FLAK50 Z9	102	140	>	>	>
FLAK94	103	141	15	50	200
FLAK93B	104	142	100	50	100
FLAK50 Z10	105	143	100	50	200
FLAK96	106	144	5	50	50
FLAK97	107	145	200	100	200
FLAK98	108	146	10	10	50
FKRLA	109	147	5	5	200
FLAK91 B	110	148	>	200	200
FLAK92B	111	149	50	100	200
FLANK99	112	150	100	10	>
FLAK50T6	113	151	>	>	200

NDmbre	SEC ID Nº	Número P	staph6538	paerug9027	Levad ura
FLAK50T7	114	152	100	50	100
FLAK95	115	153	5	25	100
FLAK50T8	116	154	100	100	50
FLAK50T9	117	155	>	>	>
FLAK100-C02H	118	156	15	>	>
FAGVL	119	157	200	>	>
FLAK120	126	165	10	25	25
FLAK121	127	166	>	>	>
FLAK96B	128	167	10	25	100
FLAK96G	129	168	50	100	>
FLAK96F	130	169	100	100	100
FLAK96C	131	170	200	100	100
FLAK960	132	171	25	50	100
FLAK 96	137	176	>	>	>
FLAK 96J	139	178	200	100	>
FLAK 96L	140	179	50	50	100
FLAK-120G	141	180	200	>	>
FLAK-1200	142	181	100	200	100
FLAK-120C	143	182	>	>	>
FLAK-120B	144	183	200	100	200
FLAK-120F	145	184	25	100	100
FLAK 50M	165	97	5	50	50
> indica más de 200 µg/ml; ND = ND determinado					

En la tabla 4 siguiente se describen las propiedades antimicrobianas de los péptidos medidas como las concentraciones mínimas bactericidas o mínimas fungicidas (*Candida*). Los valores de CMB o CMF están en µg/ml. E. coli es *Escherichia coli*, número de registro en la ATCC 25922; P. aerug es *Pseudomonas aeruginosa*, número de registro en la ATCC 27853, S. aur. es *Staphylococcus aureus*, número de registro en la ATCC 25923; *Candida* es *Candida albicans*, número de registro en la ATCC 10231

5

Tabla 4

SEC ID Nº	Nº P	E. coli A.25922	P.aerug A.27853	S. aur A.25923	Candida A.1 0231
1	1	25	30	25	>50
2	2	25	10	25	>50
3	5	50	>60	40	ND
4	11	40	25	25	>50
5	12	50	>60	75	ND
6	13	8	15	30	>50
8	23	15	25	30	>50
9	24	>80	30	>40	>50
10	25	40	30	40	>50
11	26	>80	>40	>40	>50
12	27	10	8	8	>50
13	278	40	10	>40	>40
14	27C	10	4	>40	>40
15	30	10	15	40	>50
16	34	15	15	40	>40
17	35	8	8	10	>40
18	36	30	15	10	>40
19	37	8	8	40	>50
20	38	15	30	15	ND
21	39	>40	>40	>40	ND
22	40	30	40	>40	ND
23	41	40	40	40	ND
24	42	10	30	10	ND
25	43	8	15	4	15
26	44	10	55	30	>50
27	45	30	40	80	>50
29	47	>50	>50	>50	>50

ES 2 389 285 T3

SEC ID N°	N° P	E. coli A.25922	P.aerug A.27853	S. aur A.25923	Candida A.1 0231
30	48	8	25	4	10
31	49	40	30	50	30
32	50	50	25	25	>50
33	53	15	15	10	30
34	54	15	40	15	30
35	55	4	10	4	25
36	56	50	10	55	30
37	57	>50	>50	>50	>50
38	58	>50	>50	>50	>50
39	59	>50	>50	>50	>50
40	60	>50	>50	>50	>50
41	61	4	50	>80	>40
42	63	10	50	15	60
43	64	10	30	4	>50
44	65	>55	>50	>55	>50
45	66	40	50	30	40
46	70	40	30	40	>50
47	71	50	40	>50	>50
48	72	>50	40	>50	>50
50	74	>55	50	>55	>55
51	75	40	30	>55	30
52	76	40	>55	>55	>50
53	77	>50	>50	>50	>50
54	79	>50	>50	>50	>50
55	80	30	15	>50	>50
58	92	40	25	15	25
59	93	>50	>50	>50	>50
60	94	>50	>50	>50	>50
61	95	>50	>50	>50	>50
62	96	>50	>50	>50	>50
65	101	300	>50	>50	40
66	102	25	30	25	15
67	103	30	30	>50	25
69	105	25	>50	ND	>50
70	106	50	>50	ND	>50
71	107	ND	>50	>50	>50
72	108	>50	>50	25	>50
73	109	ND	ND	80	>50
74	110	8	>50	>50	>50
75	111	30	ND	40	INACT
76	112	30	INACT	INACT	INACT
77	113	INACT	INACT	INACT	40
79	117	INACT	INACT	INACT	INACT
80	118	8	25	10	25
81	119	15	30	4	25
82	120	INACT	INACT	INACT	INACT
83	121	INACT	INACT	INACT	50
84	122	30	30	25	15
85	123	40	INACT	INACT	25
86	124	10	40	8	15
87	125	40	40	INACT	40
88	126	INACT	INACT	INACT	INACT
89	127	INACT	INACT	INACT	INACT
90	128	INACT	INACT	INACT	INACT
91	129	INACT	INACT	INACT	INACT
92	130	INACT	INACT	INACT	INACT
93	131	INACT	INACT	INACT	INACT
94	132	INACT	INACT	INACT	INACT
95	133	INACT	INACT	INACT	INACT
96	134	INACT	INACT	INACT	INACT

ES 2 389 285 T3

SEC ID N°	N° P	E. coli A.25922	P.aerug A.27853	S. aur A.25923	Candida A.1 0231
97	135	INACT	40	INACT	25
98	136	INACT	INACT	INACT	INACT
99	137	INACT	INACT	INACT	INACT
100	138	INACT	INACT	INACT	INACT
101	139	INACT	INACT	INACT	INACT
102	140	INACT	INACT	INACT	INACT
103	141	INACT	INACT	INACT	INACT
104	142	INACT	INACT	INACT	INACT
105	143	INACT	INACT	INACT	INACT
106	144	10	25	25	25
107	145	INACT	INACT	INACT	100
108	146	10	>250	75	10
109	147	25	75	>250	>250
110	148	150	>250	>250	100
111	149	150	>250	>250	100
112	150	75	>250	>250	50
113	151	>250	>250	>250	100
114	152	150	150	>250	50
115	153	10	25	.5	25
116	154	50	100	>250	25
117	155	>250	>250	>250	>250
118	156	100	>250	>250	>250
119	157	75	>250	>250	>250
120	159	10	10	>250	50
121	160	>250	>250	>250	>250
122	161	150	>250	>250	25
123	162	50	>250	>250	100
124	163	25	50	25	25
125	164	25	25	25	25.
126	165	10	25	25	10
127	166	>250	>250	>250	>250
128	167	25	>250	10	25
129	168	75	100	>250	150
130	169	200	>250	>250	75
131	170	25	>250	150	25
132	171	75	100	>250	50
133	172	>250	>250	>250	>250
134	173	>250	>250	>250	150
162	67	25	30	30	>50
165	97	25	>50	25	25

INACT se refiere a ausencia de actividad detectable. ND indica ND hay datos disponibles

Ejemplo 3: Ensayos antimicrobianos II

5 La actividad antimicrobiana contra un abanico más amplio de patógenos (incluidas cepas clínicas) que se analizó en el Ejemplo 2. Cabe destacar que para los ensayos en el Ejemplo 2 y el Ejemplo 3 se usaron protocolos algo diferentes.

10 Para este ejemplo se determinaron las CMI usando una versión ligeramente modificada del procedimiento de microdilución en caldo del NCCLS (National Committee for Clinical laboratory Standards) como se ha descrito anteriormente (Steinberg y col., AAC41: 1738,1997). Brevemente, los agentes antimicrobianos se prepararon como concentrados 10X en el disolvente más adecuado. Para el péptido se usó ácido acético al 0,01 % que contiene 0,2 % de seroalbúmina bovina como proteína transportadora. Los inóculos se prepararon resuspendiendo las colonias de un BAP en medio y ajustando la suspensión para que concordara con la de un patrón de McFarland 0,5. La suspensión se diluyó en medio fresco (recomendado por el NCCLS para el organismo), para dar de 2×10^5 a 7×10^5 UFC/ml para bacterias o de 2×10^3 a 7×10^3 UFC/ml para *Candida*. Después de dispensar alícuotas de 100 µl de la suspensión microbiana en cada pocillo de una placa de microtitulación de polipropileno de 96 pocillos se añadieron 11 µl del compuesto de ensayo. La CMI se definió como la concentración más baja de fármaco que evitó una turbidez visible tras de 16 a 20 horas (bacterias) o de 46 a 50 horas (*Candida*) a 35 °C. Para anaerobios facultativos, la incubación se realizó en dióxido de carbono al 7 % y para los anaerobios estrictos en un ambiente sin oxígeno mantenido usando un "bote" para anaerobios estándar. Todas as CMI se realizaron tres veces y se determinó el valor medio.

15

20

Tabla 5: Actividad contra bacterias grampositivas

Péptidos (SEC ID N°)	S. aureus (MRSA)	S. epidermidis C621	S. pyogenes M76
P23 (8)	32	16	16
P25 (10)	16	4	8
P26 (11)	32	4	4
P27 (12)	16	4	4
P34 (16)	16	8	4
P35 (17)	8	4	4
P37 (19)	8	4	8
P41 (23)	64	4	8
P42 (24)	16	2	4
P43 (25)	4	2	2
P44 (26)	8	4	4
P46 (28)	64	8	8
P49(31)	64	8	8
P50 (32)	4	4	8
P54 (34)	16	8	8
P55 (35)	4	2	4
P59 (39)	8	8	2
P60 (40)	32	4	8
P61 (41)	32	8	16
P63* (42)	32	16	8
P64* (43)	8	4	4
P72 (48)1	16	4	16
P73 (49)	16	4	16
P75(51)	32	8	8
P94* (60)	16	8	8
P97 (165)	8	4	4
P105* (69)	32	8	16
P111 (75)	8	4	4
P119(81)	8	4	8
P124 (86)	8	4	16
P146 (108)	16	8	8
P153(115)	16	4	2
P157(119)	32	4	8
P177 (138)	8	4	8
P301 (147)	8	4	8
P504 (155)	4	4	8
P510 (161)	8	4	8
P2 (2)	32	8	4
P27 (12)	8	4	4
La negrita indica actividad de amplio espectro; *indica selectivo de grampositivas			

Tabla 6: Actividad contra bacterias grampositivas

5

Péptidos (SEC ID N°)	S. pyogenes	S. pneumoniae	S. pneumoniae	P.acne
P23 (8)	8	16	16	4
P25 (10)	4	64	8	2
P26 (11)	4	>128	16	4
P26(12)	4	32	8	4
P34 (16)	4	8	8	8
P35 (17)	16	4		4
P37 (19)	8	64	16	4
P41 (23)	8	64	32	4
P42 (24)	4	32	8	2
P43 (25)	2	8	4	2
P44 (26)	4	8	16	4
P46 (28)	16	64	128	
P49(31)	8	64	32	
P50 (32)	4	32	16	4
P54 (34)	8	64	64	
P55 (35)	2	8	4	4

ES 2 389 285 T3

Péptidos (SEC ID N°)	S. pyogenes	S. pneumoniae	S. pneumoniae	P.acne
P59 (39)	2	16	4	2
P60 (40)	8	128	>128	4
P61 (41)	16	128	32	2
P63* (42)	8	128	16	
P64* (43)	4	8	2	2
P72 (48)	16	>128	16	2
P73 (49)	16	>128	64	4
P75(51)	4	>128	64	16
P94* (60)	8	64	128	
P97 (165)	4	32	16	8
P105* (69)	16	64	32	16
P111 (75)	2	16	4	4
P119(81)	8	128	32	8
P124 (86)	16	>128	64	8
146(108)	8	>128	128	16
P153(115)	2	32	8	4
P157(119)	8	128	16	4
P177 (138)	4	32	16	8
P301 (147)	8	>128	8	2
P504 (155)	16	64	8	4
P510 (161)	8	64	16	2
P2A* (2)	8	128	32	
P97 (165)	8	32	32	16
P27 (12)	4	16	4	4

La negrita indica actividad de amplio espectro; *indica selectivo de grampositivas; S. pyogenes ATCC19615; S. pneumoniae C718; S. pneumoniae C719; P.acne ATCC-6919

Tabla 7: Actividad contra bacterias gramnegativas

Péptidos (SEC ID N°)	E.coli UB1 005	S. typhimurium 14028S	P. aeruginosa H374
P12 (5)	1	4	8
P39 (21)	4	16	16
P41 (23)	2	4	4
P46 (28)	4	8	4
P61 (41)	2	4	4
P71 (47)	2	8	4
P100 (163)	0,5	4	8
P109 (73)	16	32	8
P110(74)	16	32	8
P157(119)	8	8	8
P306 (150)	4	4	8
P46 (28)	8	16	4
P29 (14)	8	8	16

5

Tabla 8: Actividad contra bacterias gramnegativas

Péptido	P. aeruginosa H187	C. glabrata ATCC15126
P12 (5)	16	128
P39 (21)	32	16
P41 (23)	8	32
P46 (28)	16	32
P61 (41)	8	32
P71 (47)	8	32
P100 (163)	32	>128
P109 (73)	64	128
P110(74)	64	128
P157(119)	8	64
P306 (150)	16	>128
P46 (28)	8	32
P29(14)	32	128

Tabla 9: Actividad contra cepas bacterianas de Pseudomonas

Péptidos (SEC ID N°)	P. aeruginosa H374	P. aeruginosa H187	P. aeruginosa Tb 105663	P. aeruginosa Tb 00609
P12 (5)	8	16	8	8
P25 (10)	8	8	8	8
P27 (12)	8	8	16	16
P35 (17)	8	8	4	4
P37 (19)	8	8	16	16
P39 (21)	16	32	32	32
P41 (23)	4	8	8	8
P42 (24)	4	8	8	8
P43 (25)	8	8	8	8
P44 (26)	8	8	16	8
P45 (27)	8	16	32	32
P46 (28)	4	16	32	16
P50 (32)	4	4	8	4
P55 (35)	8	8	16	8
P59 (39)	8	8	8	8
P61 (41)	4	8	8	16
P71 (47)	4	8	16	16
P72 (48)	4	8	8	8
P73 (49)	8	16	16	16
P97 (165)	8	16	16	16
P111 (75)	8	8	32	16
P119 (81)	8	16	16	16
P124 (86)	16	32	64	64
P146 (108)	2	4	8	8
P153 (115)	4	8	8	8
P157 (119)	8	8	16	16
P177 (138)	16	16	32	32
P301 (247)	4	8	8	8
P306 (150)	8	16	32	16
P504 (155)	8	8	16	8
P510 (161)	8	8	16	16
P2 (2)	16	16	16	32
P13 (6)	16	16	16	16
P27 (12)	8	8	8	8
P11 (4)	16	16	16	16

La negrita indica actividad de amplio espectro.

- 5 Las siguientes tablas comparan las propiedades antifúngicas y antibacterianas de una muestra representativa de péptidos.

Tabla 10: Comparación de las actividades antibacterianas y antifúngicas de péptidos seleccionados

Péptido (SEC ID N°)	C. albicans 105	C. tropicalis ATCC 13803	C. giabrata ATCC15126
P40 (22)	32	1	32
P47 (29)	32	1	64
P49 (31)	16	2	16
P74 (50)	16	1	16
P77 (53)	16	1	64
P79 (54)	32	2	128
P101 (65)	32	4	32
P103 (67)	16	2	16
P106 (70)	32	2	64
P113 (77)	32	4	32
P122 (84)	32	4	64
P154(116)	64	8	128
P167 (128)	64	8	128
P169 (130)	64	8	128

Tabla 11: Comparación de las actividades antibacterianas y antifúngicas de péptidos seleccionados

Péptidos (SEC ID N°)	E. coli UB1005	S. typhimurium 14028S	P. aeruginosa H187	S. aureus SAP0017
P40 (22)	64	>128	>128	>128
P47 (29)	64	>128	64-128	>128
P49(31)	32	64	16-64	64
P74 (50)	16	64	32-128	>128
P77 (53)	64	>128	64-128	>128
P79 (54)	32	>128	>128	>128
P101 (65)	32	128	32-128	128
P103 (67)	32	128	64	64
P106 (70)	64	>128	>128	>128
P113 (77)	32	44	32-128	32
P122 (84)	64	128	32-128	128
P154(116)	64	>128	>128	>128
P167 (128)	32	64	128	128
P169 (130)	32	64	128	>128

5 Muchos de los péptidos FLAK divulgados tienen actividad contra una amplia serie de microorganismos. Las tablas siguientes ilustran estas propiedades para una muestra representativa de péptidos.

Tabla 12: Actividades de amplio espectro

Péptidos (SEC ID N°)	E. coli UB 1005	S. typhimutium 1402S	P. aeruginosa H374	P. aeruginosa H187
P25 (10)	8	8	8	8
P27 (12)	8	16	8	8
P35 (17)	2	4	8	8
P37 (19)	4	8	8	8
P42 (24)	4	8	4	8
P43 (25)	8	8	8	8
P44 (26)	1	4	8	8
P45 (27)	4	32	8	16
P50 (32)	2	4	4	4
P55 (35)	4	4	8	8
P59 (39)	8	8	8	8
P72 (48)	2	8	4	8
P73 (49)	8	16	8	16
P97 (165)	8	16	8	16
P111 (75)	16	16	8	8
P119(81)	4	8	8	16
P124 (86)	16	16	16	32
P146 (108)	2	4	2	4
P153(115)	8	8	4	8
P177 (138)	8	16	16	16
P301 (147)	8	8	4	8
P504 (155)	4	4	8	8
P510 (161)	8	16	8	8

10

Tabla 13: Actividades de amplio espectro

Péptidos (SEC ID N°)	S. aureus SAP0017	S. epidermis C621	C. albicans 105	C. glabrata ATCC15126
P25 (10)	16	4	32	32
P27 (12)	16	4	32	32
P35 (17)	8	4	32	16
P37(19)	8	4	32	32
P42 (24)	16	2	32	64
P43 (25)	4	2	8	16
P44 (26)	8	4	8	16
P45 (27)	32	16	16	16
P50 (32)	4	4	16	16

Péptidos (SEC ID N°)	S. aureus SAP0017	S. epidermis C621	C. albicans 105	C. glabrata ATCC15126
P55 (35)	4	2	16	8
P59 (39)	8	8	32	16
P72 (48)	16	4	32	64
P73 (49)	16	4	32	128
P97 (165)	8	4	16	16
P111 (75)	8	4	32	32
P119(81)	8	4	16	16
P124 (86)	8	4	16	16
P146 (108)	16	8	8	16
P153(115)	16	4	16	16
P177 (138)	8	4	16	16
P301 (147)	8	4	32	32
P504 (155)	4	4	64	64
P510 (161)	8	4	32	64
P27 (12)	8	4	16	16

Aunque los péptidos FLAK generalmente son activos contra una serie de agentes microbianos, no todos los péptidos son igual de eficaces contra todos los microorganismos. Las tablas siguientes presentan algunas combinaciones de péptidos y microorganismos en las que se observó que el péptido tenía mala actividad.

5

Tabla 14: Actividades antimicrobianas bajas observadas

Péptidos (SEC ID N°)	E. coli UB1005	S. typhimurium 14028S	P. aeruginosa H374
P57 (37)	>128	>128	>128
P58 (38)	>128	>128	>128
P65 (44)	128	>128	64
P76 (52)	16	128	64
P93 (59)	128	> 128	128
P95 (61)	>128	>128	>128
P96 (62)	>128	>128	>128
P107 (71)	>128	>128	>128
P112 (76)	>128	>128	>128
P114 (78)	32	128	>128
P120 (82)	>128	>128	128
P121 (83)	>128	>128	>128
P123 (85)	64	>128	>128
P126 (88)	>128	>128	>128
P127 (89)	128	>128	>128
P128 (90)	128	>128	>128
P129 (91)	64	>128	>128
P130 (92)	>128	>128	>128
P131 (93)	>128	>128	>128
P132 (94)	128	>128	>128
P133(95)	>128	>128	>128
P134 (96)	128	>128	128
P136 (98)	128	>128	>128
P137 (99)	>128	>128	>128
P138 (100)	>128	>128	>128
P139 (101)	64	>128	>128
P140(102)	>128	>128	>128
P141(103)	>128	>128	>128
P142 (104)	64	128	>128
P143 (105)	>128	>128	>128
P145 (107)	>128	>128	>128
P147 (109)	64	128	128
P148 (110)	128	>128	>128
P149 (111)	32	>128	128
P151 (113)	>128	>128	128
P152 (114)	32	>128	>128
P155 (117)	>128	>128	>128

ES 2 389 285 T3

Péptidos (SEC ID N°)	E. coli UB1005	S. typhimurium 14028S	P. aeruginosa H374
P166 (127)	>128	>128.	>128
P168 (129)	128	>128	128
P169 (130)	64	64	128
P170 (131)	64	>128	>128
P171 (132)	32	>128	>128
P174 (135)	>128	>128	>128
P175 (136)	>128	>128	>128
P180 (141)	>128	>128	>128

Tabla 15: Actividades antimicrobianas bajas observadas

Péptidos (SEC ID N°)	P. aeruginosa H374	S. aureus SAP0017	S. epidermidis C621	Candida albicans 105
P57 (37)	>128	>128	>128	128
P58 (38)	>128	>128	>128	64
P65 (44)	64	>128	>128	64
P76 (52)	64	>128	>128	64
P93 (59)	128	>128	>128	64
P95 (61)	>128	>128	>128	>128
P96 (62)	>128	>128	>128	>128
P107 (71)	>128	>128	>128	>128
P112 (76)	>128	>128	64	128
P114 (78)	>128	>128	64	64
P120 (82)	128	>128	>128	64
P121 (83)	>128	>128	>128	64
P123 (85)	>128	>128	16	64
P126 (88)	>128	>128	>128	>128
P127 (89)	>128	>128	64	32
P128 (90)	>128	>128	128	128
P129 (91)	>128	>128	32	128
P130 (92)	>128	>128	>128	>128
P131 (94)	>128	>128	>128	128
P132 (94)	>128	>128	>128	128
P133(95)	>128	>128	>128	>128
P134 (96)	128	>128	128	64
P136 (98)	>128	>128	128	64
P137 (99)	>128	>128	>128	>128
P138 (100)	>128	>128	>128	>128
P139 (101)	>128	>128	64	128
P140(102)	>128	>128	>128	>128
P141(103)	>128	>128	>128	>128
P142 (104)	>128	>128	128	64
P143 (105)	>128	>128	>128	>128
P145 (107)	>128	>128	>128	64
P147 (109)	128	>128	64	64
P148 (110)	>128	>128	128	128
P149 (111)	128	>128	>128	128
P151 (113)	128	>128	>128	128
P152 (114)	>128	>128	32	128
P155 (117)	>128	>128	>128	>128
P166 (127)	>128	>128	>128	>128
P168 (129)	128	>128	128	128
P169 (130)	128	>128	32	64
P170 (131)	>128	0,128	>128	128
P171 (132)	>128	>128	128	>128
P174 (135)	>128	>128	>128	>128
P175 (136)	>128	>128	>128	>128
P180 (141)	>128	>128	>128	>128

Ejemplo 4: Ensayos anti-cáncer

Los ensayos con células cancerosas se realizaron de un modo similar a los ensayos antimicrobianos descritos anteriormente, excepto porque el procedimiento de ensayo usó el protocolo de pigmento MTT. La viabilidad de las células se determina mediante la respuesta al pigmento. En el procedimiento siguiente se añadieron aproximadamente 5×10^4 células por pocillo y se determinó la viabilidad con las células en un estado semiconfluyente. El ensayo se realizó en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Tras la adición del péptido, la placa se fijó durante 24 horas. Se añadió MTT (5 mg/ml en RPMI 1640 sin rojo fenol, 20 μ l) a cada pocillo, incluidos los pocillos de control positivo no tratados con péptido. La placa se incubó a 37°C durante 4 horas. Se retiró el contenido líquido de cada pocillo y a cada pocillo se añadió isopropanol con HCl 0,1M (100 μ l). La placa se selló con Parafilm para prevenir la evaporación del isopropanol. Se deja la placa en reposo durante 5-10 minutos con el fin de solubilizar el precipitado. A cada pocillo se añadió agua (100 μ l). La absorbancia se determinó con un instrumento lector de ELISA. La intensidad del color a 540 nm es proporcional a la viabilidad de las células. Los resultados para cada concentración de péptido se representan respecto a los controles no tratados y los valores de DL50 se determinan a partir de los gráficos.

WI38 (N° ATCC CCL75) es una línea de fibroblastos normales de células diploides pulmonares, MCF7 (N° ATCC HTB22) es una línea de células tumorales de adenocarcinoma de mama, SW480 (N° ATCC CCL228) es una línea de células tumorales de adenocarcinoma de colon, BMKC es una línea de melanoma clonada de la línea de melanoma de Bowes HMCB (N° ATCC CRL9607), H1299 (N° ATCC CRL5803) es una línea tumoral de carcinoma pulmonar macrocítico, HeLaS3 (N° ATCC CCL2.2) línea de células tumorales de carcinoma epitelial cervical y PC3 (N° ATCC CRL1435) es una línea de células tumorales de adenocarcinoma de próstata. Las cifras son valores de DI50 (μ g/ml). Los datos de las seis dianas se presentan en las siguientes Tablas 16 y 17.

25

Tabla 16

Nombre	SEC ID N°	N° P	W138	MCF7	SW480	BMKC
HECATO AC	1	1	27	54	6	72
HECATO AM	2	2	66	23	46	128
SB37COOH	3	5	130	175	82	120
SB-37 AM	5	12	950	540	>	>
SHIVA 10 AC	6	13	57	>	NO	NO
FLAK01 AM	8	23	34	62	5	27
FLAK03 AM	9	24	55	26	38	85
FLAK04 AM	10	25	24	10	12	36
FLAK05 AM	11	26	96	74	8	94
FLAK06 AM	12	27	37	14	26	44
FLAK06 AC	13	27B	101	65	59	93
FLAK06 R-AC	14	27C	520	140	210	300
KALV	15	30	93	72	62	140
FLAK 17 AM	16	34	40	21	35	53
FLAK 26 AM	17	35	8	9	14	7
FLAK 25 AM	18	36	19	9	30	56
HECATE 20Ac	19	37	80	14	57	150
FLAK43 AM	20	38	12	17	13	21
FLAK44AM	21	39	300	130	435	510
FLAK62 AM	22	40	>	760	>	>
FLAK 06R-AM	23	41	175	98	120	290
MSI-78 AM	24	42	67	31	34	140
FLAK50	25	43	5	9	9	7
FLAK51	26	44	36	140	32	47
FLAK57	27	45	200	260	180	160
FLAK71	28	46	200	300	160	150
FLAK??	29	47	>	575	>	700
FLAK50V	30	48	41	23	47	43
FLAK50F	31	49	135	40	100	115
FLAK26V AM	32	50	43	32	46	40
CAME-15	33	53	32	45		40
FLAK50C	34	54	97	60		90
FLAK50D	35	55	32	16	14	16
FLAK 50E	36	56	250	500	215	205
FLAK80	37	57	900	>	740	740
FLAK81	38	58	>	>	>	>
FLAK82	39	59	77	31	42	155

ES 2 389 285 T3

Nombre	SEC ID N°	N° P	W138	MCF7	SW480	BMKC
FLAK83M	40	60	>	>	>	>
FLAK 26 Ac	41	61	93	105	100	140
INDOLICIDINA	42	63	NO	64	345	200
FLAK 17C	43	64	37	80		35
FLAK 50H	44	65	320	475	345	250
FLAK 50G	45	66	240	90	145	200
SHIVA DERIV P69+KWKL	46	70	34	44	11	94
SHIVA 10(1-18)_AC	47	71	355	190	250	445
PÉPTIDO SHIVA 10 71+KWKL	48	72	125	93	82	290
CA(1-7)Shiva10(1-16)	49	73	160	150	70	360
FLAK 54	50	74	335	465	340	460
FLAK 56	51	75	80	42	17	24
FLAK 58	52	76	445	970	400	750
FLAK 72	53	77	>	>	>	125
FLAK 75	54	79	>	540	>	830
SHIVA 10 (1-16) Ac	55	80	28	29	35	76
CA(1-7)Shiva10(1-16)-COOH	56	81	8	63	13	12
INDOLOCIDINA-ac	57	91	9	12	30	180
FLAK50B	58	92	43	23	51	46
FLAK501	60	94	6	65	NO	11
FLAK50K	61	95	250	>	>	820
FLAK50L	62	96	>	>	>	>
Shiva-11	63	98	47	96	125	94
SHIVA 11[(1-16)ME(2-9)]-COOH	64	99	34	95	120	94
FLAK 50N	65	101	300	250	170	160
FLAK 500	66	102	73	60	57	60
FLAK 50P	67	103	26	46	90	75
CA(1-&HECATO(11/23)	68	104	24	11	54	100
PYL-ME	69	105	430	635	>	NO
FLAG26-0 1	70	106	>	620	570	690
VISHNU3	71	107	>	>	>	>
MELITINA	72	108	16	9	23	18
FLAK26-02	73	109)	>	>	>	>
FLAG26-03	74	110	45	180	325	400
FLAK50 Q1	75	111	24	35	27	26
FLAK50 Q2	76	112	420	500	800	445
FLAK50 Q3	77	113	170	150	180	115
FLAK50 Q4	78	114	>	730	>	>
FLAK50 Q5	79	117	>	>	>	>
FLAK50 Q6	80	118	170	70	115	135
FLAK50 Q7	81	119	45	54	46	36
FLAK50 Q8	82	120	600	730	630	660
FLAK50 Q9	83	121	625	400	800	670
FLAK50 Q10	84	122	720	360	570	700
FLAK50 T1	85	123	600	615	>	635
FLAK50 T2	86	124	21	18	9	10
FLAK50 T3	87	125	90	90	125	220
FLAK50 T4	88	126	>	>	>	>
FLAK50 T5	89	127	760	440	400	535
FLAK90	90	128	500	500	530	330
FLAK91	91	129	>	>	550	>
FLAK92	92	130	>	>	>	>
FLAK93	93	131	>	600	555	>
FLAK50 Z1	94	132	>	>	>	>
FLAK50 Z2	95	133	>	>	>	>
FLAK50 Z3	96	134	>	>	740	>
FLAK50 Z4	97	135	110	54	80	155
FLAK50 Z5	98	136	>	500	600	530
FLAK50 Z6	99	137	>	>	>	>
FLAK50 Z7	100	138	>	>	>	>
FLAK50 Z8	101	139	550	625	>	525
FLAK50 Z9	102	140	>	>	>	>

ES 2 389 285 T3

Nombre	SEC ID N°	N° P	W138	MCF7	SW480	BMKC
FLAK94	103	141	420	430	560	465
FLAK93B	104	142	73	44	38	38
FLAK50 Z10	105	143	>	>	>	>
FLAK96	106	144	750	150	285	250
FLAK97	107	145	>	>	>	>
FLAK98	108	146	270	110	380	185
FKRLA	109	147	83	106	185	110
FLAK91 B	110	148	380	315	>	330
FLAK92B	111	149	>	>	>	>
FLAK99	112	150	125	160	235	190
FLAK50T6	113	151	>	>	>	>
FLAK50T7	114	152	620	430	740	>
FLAK95	115	153	130	64 -	61	165
FLAK50T8	116	154	600	315	750	330
FLAK50T9	117	155	>	>	>	>
FLAK100-C02H	118	156	230	135	345	520
FAGVL	119	157	500	240	330	600
Modelina-5	120	159	82	61	140	140
Modelina-5-C02H	121	160	700	320	370	220
FLAK120	126	165	470	360	240	240
FLAK 121	127	166	>	>	>	>
FLAK96B	128	167	260	230	360	240
FLAK96G	129	168	>	630	>	590
FLAK96F	130	169	>	510	>	530
FLAK96C	131	170	>	940	>	>
FLAK960	132	171	615	305	770	600
Modelina-80	135	174	>	>	>	>
Modelina-8E	136	175	>	>	70	>
Flak 96H	137	176	>	>	>	>
Flak 961	138	177	270	190	310	310
Flak 96J	139	178	405	770	>	640
Flak 96L	140	179	540	555	>	920
FLAK-120G	141	180	940	950	600	770
FLAK-1200	142	181	500	550	870	830
FLAK-120C	143	182	>	>	>	>
FLAK-120B	144	183	>	>	>	>
FLAK-120F	145	184	800	260	440	600
Magainina2 wisc	146	300	52	22	60	130
02A21	147	301	66	64	76	140
KSL-1	148	302	800	340	>	700
KSL-7	149	303	355	315	530	330
LSB-37	150	306	320	50	240	170
Anubis-2	151	307	75	38	73	83
FLAK 17 CV	152	501	26	23	NO	NO
FLAK50 Q1V	153	502	64	92	NO	NO
02A21V	154	503	150	210	NO	NO
FLAK 25 AM V	155	504	110	130	NO	NO
FLAK43 AM V	156	505	85	86	NO	NO
FLAK500 V	157	506	75	45	NO	NO
HECATO AM V	158	507	285	340	NO	NO
HECATO AC V	159	508	190	160	NO	NO
FLAK04AM V	160	509	95	84	NO	NO
03AMV	161	510	77	62	NO	NO
O-Shiva 10 AC	162	67	4	7	NO	NO
Shiva 11 AC	163	100	95	175	82	120
Shiva 10 (1-18)AM	164	69	101	45	63	66

Nota: > indica más de 1000; ND indica no determinado; los números están en µg/ml.

ES 2 389 285 T3

Tabla 17

Nombre	SEC ID N°	P No.	W138	H1299	HeLaS3	PC3
HECATO AC	1	1	27	44	95	6
HECATO AM	2	2	66	140	50	44
SB37COOH	3	5	130	220	150	NO
SB-37 AM	5	12	950	720	>	630
SHIVA 10 AC	6	13	57	>	>	83
FLAK01 AM	8	23	34	64	82	41
FLAK03 AM	9	24	55	72	145	38
FLAK04 AM	10	25	24	37	20	12
FLAK05 AM	11	26	96	84	150	125
FLAK06 AM	12	27	37	16	25	8
FLAK06 AC	13	27B	101	54	80	16
FLAK06 AM	14	27C	520	170	260	280
KALV	15	30	93	125	190	65
FLAK 17 AM	16	34	40	24	62	9
FLAK 26 AM	17	35	8	16	27	5
FLAK 25 AM	18	36	19	57	NO	19
HECATE 20Ac	19	37	80	150	NO	64
FLAK43 AM	20	38	12	33	35	10
FLAK44AM	21	39	300	420	620	310
FLAK62 AM	22	40	>	>	>	435
FLAK 06R-AM	23	41	175	245	185	140
MSI-78 AM	24	42	67	150	NO	66
FLAK50	25	43	5	6	15	12
FLAK51	26	44	36	72	22	45
FLAK57	27	45	200	330	160	170
FLAK71	28	46	200	290	280	280
FLAK77	29	47	>	>	>	>
FLAK50V	30	48	41	17	44	32
FLAK50F	31	49	135	140	NO	77
FLAK26V AM	32	50	43	7	33	54
CAME-15	33	53	32	65	30	40
FLAK50C	34	54	97	80	190	90
FLAK50D	35	55	32	7	15	47
FLAK 50E	36	56	250	370	300	435
FLAK80	37	57	900	>	830	>
FLAK81	38	58	>	>	>	>
FLAK82	39	59	77	180	NO	81
FLAK83M	40	60	>	>	>	>
FLAK 26 Ac	41	61	93	127	170	66
INDOLICIDINA	42	63	NO	270	345	290
FLAK 17 C	43	64	37	30	30	46
FLAK 50H	44	65	320	450	210	470
FLAK50G	45	66	240	130	140	170
SHIVA DERIV P69+KWKL	46	70	34	63	28	82
SHIVA 10 (1-18_AC	47	71	355	320	570	270
PÉPTIDO SHIVA 10 71+KWKL	48	72	125	160	240	63
CA(1-7)Shiva10(1-16)	49	73	160	115	270	97
FLAK 54	50	74	335	670	260	660
FLAK 56	51	75	80	80	74	54
FLAK 58	52	76	445	860	380	675
FLAK 72	53	77	>	>	>	>
FLAK 75	54	79	>	>	>	>
SHIVA 10 (1-16) Ac	55	80	28	64	97	28
CA(1-7)Shiva10(1-16)-COOH	56	81	8	22	19	170
Indolocidina-ac	57	91	9	64	20	31
FLAK50B	58	92	43	25	670	83
FLAK50J	59	93	530	320	>	690
FLAK50I	60	94	6	NO	>	NO
FLAK50K	61	95	250	>	>	>
FLAK50L	62	96	>	>	>	>

ES 2 389 285 T3

Nombre	SEC ID Nº	P No.	W138	H1299	HeLaS3	PC3
Shiva-11	63	98	47	53	175	52
SHIVA 11[(1-16)ME(2-9)-COOH	64	99	34	54	180	28
FLAK 50N	65	101	300	340	170	730
FLAK 500	66	102	73	27	43	66
FLAK 50P	67	103	26	150	70	330
CA(1-&HECATE(11/23)	68	104	24	52	130	18
PVL-ME	69	105	430	>	>	NO
FLAG26-01	70	106	>	920	700	>
VISHNU3	71	107	>	>	>	>
MELITILINA	72	108	16	25	35	13
FLAK26-02	73	109	>	>	>	>
+FLAG26-03	74	110	45	95	540	>
FLAK50 Q1	75	111	24	8	7	11
FLAK50 Q2	76	112	420	470	660	640
FLAK50 Q3	77	113	170	50	190	240
FLAK50 Q4	78	114	>	>	>	>
FLAK50 Q5	79	117	>	>	>	>
FLAK50 Q6	80	118	170	74	87	330
FLAK50 Q7	81	119	45	33	30	140
FLAK50 Q8	82	120	600	620	810	>
FLAK50 Q9	83	121	625	460	830	>
FLAK50 Q10	84	122	720	830	780	800
FLAK50 T1	85	123	600	>	940	>
FLAK50 T2	86	124	21	30	14	10
FLAK50 T3	87	125	90	76	220	145
FLAK50 T4	88	126	>	>	>	>
FLAK50 T5	89	127	760	770	610	>
FLAK90	90	128	500	>	700	>
FLAK91	91	129	>	790	550	>
FLAK92	92	130	>	>	>	>
FLAK93	93	131	>	>	>	>
FLAK50 Z1	94	132	>	>	>	>
FLAK50 Z2	95	133	>	>	>	>
FLAK50 Z3	96	134	>	>	>	>
FLAK50 Z4	97	135	110	115	215	310
FLAK50 Z5	98	136	>	450	400	900
FLAK50 Z6	99	137	>	>	>	>
FLAK50 Z7	100	138	>	>	>	>
FLAK50 Z8	101	139	550	850	>	>
FLAK50 Z9	102	140	>	>	285	>
FLAK94	103	141	420	>	>	NO
FLAK93B	104	142	73	115	55	60
FLAK50 Z10	105	143	>	>	>	>
FLAK96	106	144	750	225	275	350
FLAK97	107	145	>	>	240	>
FLAK98	108	146	270	93	640	440
FKRLA	109	147	83	93	>	340
FLAK91 B	110	148	380	660	>	>
FLAK92B	111	149	>	>	>	>
FLAK99	112	150	125	185	320	74
FLAK50T6	113	151	>	>	>	>
FLAK50T7	114	152	620	410	>	>
FLAK95	115	153	130	50	140	97
FLAK50T8	116	154	600	400	>	640
FLAK50T9	117	155	>	>	>	NO
FLAK100-C02H	118	156	230	NO	>	260
FAGVL	119	157	500	315	>	375
Modelina-5	120	159	82	74	275	145
Modelina-5-C02H	121	160	700	470	550	450
FLAK120	126	165	470	56	400	340
FLAK121	127	166	>	>	>	
FLAK96B	128	167	260	300	325	320

Nombre	SEC ID N°	P No.	W138	H1299	HeLaS3	PC3
FLAK96G	129	168	>	>	>	>
FLAK96F	130	169	>	640	>	>
FLAK96C	131	170	>	>	>	>
FLAK960	132	171	615	540	820	600
Modelina-80	135	174	>	>	>	>
Modelina-8E	136	175	>	>	510	>
Flak 96H	137	176	>	>	>	>
Flak 96I	138	177	270	240	380	120
Flak 96J	139	178	405	>	>	>
Flak 96L	140	179	540	>	>	>
FLAK-120G	141	180	940	>	760	>
FLAK-1200	142	181	500	>	>	>
FLAK-120C	143	182	>	>	>	>
FLAK-120B	144	183	>	>	>	>
FLAK-120F	145	184	800	370	302	570
Magainina2wisc	146	300	52	60	125	45
02A21	147	301	66	77	170	45
KSL-1	148	302	800	720	>	>
KSL-7	149	303	355	345	>	530
LSB-37	150	306	320	120	250	370
Anubis-2	151	307	75	160	100	66
O-Shiva 10 AC	163	100	95	220	150	NO
Shiva 10 (1-18)AM	164	69	101	71	190	81

En las Tablas 16 y 17 se puede ver que todas las dianas expuestas eran inhibidas por uno o más de los péptidos en una medida apreciable (es decir DL₅₀ menor de 50 µg/ml). La Tabla 18 siguiente muestra que 44 (29 %) de los 150 péptidos analizados eran activos con algunos valores de DL₅₀ iguales o menores de 50; 26 de los péptidos eran activos en algunas dianas en o por debajo del valor de DL₅₀ de 25-, y 16 péptidos eran muy activos en una o más cepas diana con valores de DL₅₀ iguales o menores de 10.

La Tabla 19 siguiente muestra un amplio espectro de actividad contra seis tipos de células cancerosas para varios péptidos activos. Se observa que cada diana tiene uno o más péptidos candidatos principales inhibidores del crecimiento celular a un nivel de DL₅₀ de 10 o menos.

Tabla 18: Péptidos FLAK que muestran una actividad sustancial contra las líneas de células cancerosas

Valores de DL ₅₀	Número de péptidos activos	Porcentaje de 150 péptidos analizados
< o =50 µg/ml	44	29%
< o =25 µg/ml	26	17%
< o =10 µg/ml	16	11%

Tabla 19: Actividad y especificidad de los péptidos FLAK contra seis células cancerosas diana

DL ₅₀	Número de péptidos activos por diana					
	MCF7 (mama)	SW480 (colon)	BMKC (melanoma)	H 1299 (pulmón)	HeLaS3 (cervix)	PC3 (próstata)
< o =50 µg/ml	31	25	19	19	17	20
< o =25 µg/ml	17	13	8	10	8	11
< o =10 µg/ml	6	5	3	4	1	5

Ejemplo 5: Estimulación y proliferación de leucocitos

La viabilidad in Vitro de leucocitos humanos en presencia de diferentes péptidos a diferentes concentraciones se determinó mediante un protocolo Alamar Blue. Alamar Blue (Promega, Madison, WI) es un pigmento indicador formulado para medir cuantitativamente la proliferación y citotoxicidad de las células. El pigmento consiste en un indicador de oxidación-reducción (redox) que da un cambio colorimétrico y una señal fluorescente en respuesta a la actividad metabólica celular.

Protocolo del ensayo: Se extrajo sangre de un varón de 50 años de edad y se centrifugó a 1.500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se aspiraron las células de la capa leucocítica en la interfaz glóbulos rojos-plasma. Las células de la capa leucocítica (principalmente linfocitos) se transfirieron después a tubos de centrifuga de 15 ml

que contenían 5 ml de medio RPMI 1640 + 10 % de suero bovino fetal (Gibco, Grand Island, NY). Se añadió medio adicional a los tubos para llevar el volumen hasta 10 ml. La suspensión de la capa leucocítica se estratificó cuidadosamente en 5 ml de Histopaque (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y se centrifugó a 1.500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. La interfaz, que es principalmente PBMC (células mononucleares de sangre periférica) se aspiró y transfirió a un tubo de centrifuga cónico de 15 ml y se resuspendió en 2 ml de RPMI 1640 frío y se llevó hasta 15 ml con medio RPMI 1640 frío. Las células se centrifugaron a 1.500 rpm durante 10 minutos. Después se aspiró el sobrenadante y se descartó. El sedimento celular se resuspendió en 1 ml de RPMI 1640 frío y se llevó hasta 15 ml con medio RPMI. Esta etapa se repitió dos veces, excepto que en la última etapa, las células se resuspendieron en 1 ml de RPMI 1640 frío y se realizaron recuentos celulares con un hemocitómetro de acuerdo con el catálogo de cultivo celular Sigma.

Como control se usó mitógeno de la hierba carmín, junto con controles positivos y negativos. Las células control negativo se destruyeron con metanol al 70 %. Las células control positivo (+) se incubaron en medio RPMI (sin tratar). A las células se añadieron 20 ml de AlamarBlue y las lecturas se realizaron tras 24 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas usando un fluorímetro (excitación 544/transmisión 590 nm).

Los cálculos se realizaron usando la fórmula siguiente. La muestra tratada con el péptido y el control positivo se ajustaron por el control negativo.

$$\% \text{ estimulación/proliferación de células tratadas} = \frac{\text{Muestra tratada con péptido}}{\text{Control positivo}} \times 100\%.$$

Usando el protocolo descrito justo antes se realizó detección selectiva de aproximadamente 100-150 péptidos por sus acciones estimuladoras y/o inhibitoras sobre el crecimiento de los leucocitos humanos ("WBC") en comparación con el crecimiento de células control positivo no tratadas. Los datos de la Tabla 20 siguiente muestran que varios péptidos FLAK seleccionados son estimuladores a concentraciones bajas (0,1 a 1,0 µg/ml), mientras que algunos de los péptidos se convierten en inhibidores (que producen la muerte celular) a concentraciones mayores. Varios de los péptidos (es decir, las SEC ID N° 5, 143 y 160) son estimuladores (y/o proliferativos) a todas las concentraciones hasta 500 µg/ml.

La tinción Alamar Blue usada en el protocolo atraviesa las membranas celulares y nucleares, y se metaboliza en las mitocondrias para producir el cambio de color. Por tanto, la respuesta fluorimétrica resultante es un resultado de la actividad total de las mitocondrias producida por la estimulación y/o mitosis celular (proliferación celular). El incremento de los valores (para las células tratadas, como porcentaje de los valores para las células no tratadas) con un incremento del tiempo de incubación (120 horas frente a 48 horas) se puede atribuir al incremento de la proliferación celular además de la estimulación de la actividad metabólica celular producida por el péptido.

La Tabla 20 presenta la estimulación/proliferación de células tratadas con péptido, como porcentaje de control positivo sin tratar, para leucocitos humanos (glóbulos blancos, "WBC") en presencia de determinados péptidos FLAK. La tabla también muestra para cada uno de estos péptidos su toxicidad (valores DL50) para los glóbulos rojos (RBC) humanos y para los fibroblastos humanos (WI38). Dichos péptidos determinados que son estimuladores para los glóbulos blancos a concentraciones peptídicas bajas (es decir, 10 µg/ml o menos) y son inhibidores o tóxicos para los glóbulos blancos a concentraciones más altas también son relativamente más tóxicos para los glóbulos rojos y para los fibroblastos que los péptidos que son estimuladores y no inhibidores para los glóbulos blancos incluso a concentraciones tan altas como de 500 µg/ml.

En experimentos limitados con otro protocolo distinto al Alamar Blue descrito anteriormente, se ha determinado cualitativamente que los péptidos que producen estimulación y proliferación de leucocitos son activos en los componentes de las células fagocíticas y linfocíticas del sistema linfático de los mamíferos. Como tales, ciertos de los péptidos FLAK estimuladores que son relativamente no tóxicos para las células de mamífero a niveles de dosis terapéuticas se pueden usar como inmunomoduladores para tratar seres humanos u otros mamíferos con sistemas inmunitarios comprometidos. Dicho tratamiento se puede administrar sistémicamente in vivo o mediante tratamiento extracorpóreo de sangre entera o de componentes de la sangre que se van a reinfundir en el donante. Dicha terapia serviría para contrarrestar la deficiencia inmunitaria en pacientes neutropénicos causada por la edad, la enfermedad o la quimioterapia, y estimularía respuestas inmunitarias naturales para prevenir o combatir infecciones patogénicas y el crecimiento de ciertas líneas celulares cancerosas o potenciar los procesos de cicatrización de heridas que implican al sistema linfoide. La Tabla 21 es un ejemplo más detallado (con un péptido, SEC ID N° 109 del fenómeno que muestra las relaciones entre la concentración y el tiempo a medida que efectúan la estimulación, proliferación e inhibición de los leucocitos.

Tabla 20: Estimulación/proliferación de linfocitos (WBC) humanos por determinados péptidos FLAK

Péptidos seleccionados		Porcentaje de estimulación de la actividad de las células tratadas con péptido con respecto al control					Toxicidad del péptido*	
SEC ID N°	PNO.	0,1 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	500 µg/ml	RBC DL/ 50	WI-38 DL/ 50
2	2	117	118	119	121	119	30	66
5*	12	111	115	118	116	101	>1000	950
10		117	104	99	27	27	60	24
12	27	108	110	99	30	23	125	37
17	35	82	76	61	18	16	200	8
20	38	79	82	78	37	36	350	12
25	43	78	82	71	14	12	20	5
30	48	74	68	62	13	13	130	60
58	92	112	112	98	35	26	300	25
61	95	110	115	116	124	114	>1000	>1000
165	97	107	109	106	27	22	350	850
66	102	100	102	97	37	17	500	210
71	107	101	100	108	109	110	>1000	>1000
115	153	93	92	37	72	29	780	130
119*	157	88	108	54	117	89	850	500
147*	301	100	94	83	22	20	10	66
150*	306	97	101	94	109	112	>1000	320

* no es un péptido FLAK; los tiempos de incubación fueron 48 horas para todas las muestras

5 Tabla 21: Estimulación/proliferación de leucocitos (WBC) humanos e inhibición por el péptido FLAK de SEC IND N° (P25)

Tiempo de incubación	0,1 µg/ml	1µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	500 µg/ml
24 horas	111	98	88	10	10
48 horas	117	104	99	27	27
72 horas	119	105	102	31	32
96 horas	128	112	110	38	40
120 horas	135	118	119	43	45

Nota: Los valores numéricos son el porcentaje de estimulación/proliferación de células tratadas con el péptido respecto a las células control (100 %)

10 Ejemplo 6: Estimulación y proliferación de fibroblastos

El ensayo de proliferación celular cyQUANT proporciona un procedimiento cómodo, rápido y sensible para determinar la densidad de las células en cultivo. El ensayo tiene un intervalo de detección lineal que se extiende desde 50 o menos hasta al menos 50.000 células en volúmenes de 200 µl usando una concentración de un solo pigmento. El ensayo es ideal para estudios de proliferación celular, así como para recuentos celulares de rutina y se puede usar para monitorizar la adhesión de las células a las superficies.

15 Procedimiento: Diferentes líneas celulares se mantuvieron con diferente medio de acuerdo con la ATCC. Las células se digirieron con 8 ml de tripsina (0,25 % Fisher, Pittsburgh, PA). La suspensión celular se centrifugó durante 10 minutos a 100 rpm. El sobrenadante se retiró y desechó sin alterar el sedimento celular. Se preparó una suspensión celular concentrada en 1,0 ml de medio para obtener una densidad de aproximadamente 10⁵ a 10⁶ células/ml. La densidad celular real se determinó contando las células usando un hemocitómetro con el método de azul tripán. El número de células se ajustó para obtener un número igual de células por 200 µl de volumen. Las células se sembraron en placas con 0 % de FBS, 2 % de FBS, 3 % de FBS y 5 % de FBS. Las placas se incubaron a 37 °C durante un tiempo suficiente para dejar que las células se unan. Para los estudios de proliferación a largo plazo se retiraron 100 µl de medio de cada pocillo todos los días y se reemplazaron con medio fresco.

20 En el momento deseado se retiró el medio de las células adherentes en una placa de 96 pocillos. Estas células ya se trataron con agentes de ensayo. Las células se congelaron en la placa a -70 °C durante 30 minutos. Las células se descongelaron a temperatura ambiente. A cada célula de muestra se añadió CyQuant GR seco/tampón de lisis celular (200 µl). Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos protegidas de la luz. La fluorescencia se midió usando fmax a 485-538 nm.

30 Se usó el protocolo CyQuant anterior para examinar posible estimulación y/o proliferación peptídica de fibroblastos. En la Tabla 22 siguiente se muestran datos para determinados péptidos que demuestran su efecto sobre fibroblastos

(WI38). En la tabla, la sustancial propiedad estimuladora y/o proliferativa de determinados péptidos como función de la concentración es evidente. La Tabla 23 muestra que el efecto de estimulación y/o proliferación de fibroblastos se potencia para determinados péptidos en presencia de otros factores de crecimiento. Esto se muestra mediante la adición de suero bovino fetal (FBS) al medio. Valores numéricos mostrados en las Tablas 22 y 23 son la actividad de estimulación/proliferación expresada como un porcentaje del control (células no tratadas). Las células control y las células tratadas con péptido son con medio y FBS, como se ha indicado. Los valores inferiores al 100 % (para control) indican acción inhibitoria del péptido, especialmente a concentraciones superiores a 10 µg/ml.

Tabla 22: Estimulación de fibroblastos humanos (WI-38) por determinados péptidos FLAK

SEC ID N°	N° P	Tiempo de inc. (h)**	% FBS en serum	Estimulación de la actividad de las células tratadas con péptido con respecto al control			
				0,1 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
2	2	48	2	125	156	122	35
4	11	48	2	149	145	166	113
5*	12	48	3	111	116	109	120
10	25	48	2	137	143	120	73
12	27	48	2	134	115	104	116
25	43	48	3	93	99	83	14
30	48	48	3	117	117	109	110
		72	3	119	123	139	144
32	50	72	3	108	123	127	56
35	55	48	3	101	109	116	25
		72	3	91	98	101	6
61	95	72	3	101	90	94	93
66	102	72	3	123	121	126	122
71 *	107	72	3	114	104	98	86
80	118	72	3	163	193	192	184
108	146	72	3	109	101	84	74
115	153	72	3	125	125	132	106
119*	157	72	3	126	118	104	119
126	165	72	3	133	119	79	129
147*	301	48	3	87	98	95	58
150*	306	48	3	102	103	101	94

* no es un peptide FLAK. ** tiempo de incubación en horas.

Tabla 23: Efecto de los factores de crecimiento sobre la estimulación de fibroblastos (WI38)

SEC ID N°	Número P	% FBS en serum	Concentración del péptido*			
			0,1 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
2	2	0	-27	-3	27	-82
		2,5	26	57	23	-66
4	11	0	19	34	50	-40
		2,5	50	52	62	14
8	23	0	21	78	10	-48
		2,5	16	23	58	75
80	118	0	12	-4	-7	-1
		3	61	70	68	72

Nota: Los valores numéricos son el porcentaje de la viabilidad celular por encima o por debajo del control.

15 Ejemplo 7: Ensayo de toxicidad- Hemólisis de glóbulos rojos (RBC) e inhibición de leucocitos (WBC) y fibroblastos (WI38)

La Tabla 24 siguiente resume los datos de toxicidad de RBC, WBC, y WI38 para péptidos FLAK típicos. Los tres valores para RBC, WBC, y WI38 (DL₅₀) son, en general, indicadores direccionales consistentes de la toxicidad peptídica. Al elegir un péptido para un posible tratamiento de una indicación dada, es importante que coincida la actividad terapéutica y la especificidad del péptido con sus posibles propiedades tóxicas. El péptido de la SEC ID N° 5 no es un péptido FLAK, sino que es SB-37, un homólogo cercano de la cecropina B. Anteriormente se ha demostrado que no es tan activo como los péptidos FLAK como agente antibacteriano, pero posee propiedades de cicatrización de heridas, como se ha demostrado in vivo en un modelo de ratas. Probablemente esto es el resultado de sus efectos estimuladores y proliferativos sobre leucocitos y fibroblastos de mamífero.

Los protocolos para estimulación de glóbulos blancos y WI38 se han tratado anteriormente. El protocolo para glóbulos rojos se presenta en la Tabla 24.

5 Tabla 24: Toxicidad *in vitro* de determinados péptidos FLAK sobre los glóbulos rojos (RBC), leucocitos humanos (WBC) y fibroblastos humanos (WI38)

SEC ID N°	Número P	RBC DL ₅₀ µg/ml	WBC DL ₅₀ µg/ml	WI38 DL ₅₀ µg/ml
5	12	>1000	>500	60
10	25	60	79	60
11	26	900	185	100
12	27	125	78	60
16	34	200	77	200
17	35	200	64	25
20	38	350	160	100
25	43	20	70	25
30	48	130	78	70
35	55	30	80	28
58	92	300	51	400
66	102	300	115	45

10 El protocolo para glóbulos rojos es el siguiente: Las posiciones en los pocillos de cada dilución y los controles no tratados se registran en la tapa de una placa de 96 pocillos. Cuando las células habían llegado a la confluencia, se retiró el medio y se sustituyó con diluciones de la muestra preparadas recientemente hasta un volumen final de 200 µl.

15 El agente de ensayo se añadió a los pocillos designados de la placa de 96 pocillos. A los pocillos de control positivo se añadieron 200 µl de medio fresco y a los pocillos de control negativo se añadieron 200 µl de etanol al 70 %. La placa se incubó durante la noche a 37°C y 5 % de CO₂ y una humedad de al menos el 90 %. A todos los pocillos se añadió solución de AlamarBlue (20 µl) a temperatura ambiente. Las placas se leyeron espectrofluorométricamente (excitación 544 nm, emisión 590 nm). Las placas se incubaron durante 3 horas a 37°C 5 % de CO₂, y una humedad de al menos un 90 %. Las placas se leyeron de nuevo a 3 y 24 horas de incubación. El criterio de valoración DL₅₀ se determinó a partir del gráfico leyendo desde donde el punto del 50 por ciento hace intersección en la curva de respuesta a la dosis a la concentración a lo largo del eje x. Esta concentración es el valor de DL₅₀. El valor de DL₅₀ para los agentes de ensayo en una clase de agente de ensayo único se puede usar para clasificar-ordenar sus toxicidades relativas o correlacionar con los datos *in vivo*.

25 Este ensayo hemolítico se basa en el presentado en el Journal of Peptide Research 53: 82-90 (1999). La preparación de todos los medios, soluciones madre y diluciones se realizó en una campana de flujo laminar para evitar la contaminación. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con los protocolos de seguridad que pertenecen a la manipulación y eliminación de fluidos del cuerpo humano.

30 Los glóbulos rojos (TBC) se lavaron tres veces con PBS (tampón fosfato 35 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,0). Se prepararon glóbulos rojos suspendidos en PBS (0,4 % (v/v); aproximadamente 10 ml por 15 péptidos). Las suspensiones (100 µl) se alicuotaron a cada tubo con muestra y control. Las soluciones de péptido diluidos en serie (100 µl) se pipetearon en los tubos de muestra. Los tubos de control negativo contenían 100 µl de PBS; los tubos de control positivo contenían 100 µl de 1 % de detergente Triton-X100. Todos los tubos se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Los tubos se retiraron del incubador y se centrifugaron a 1.000 g durante 5 minutos. El sobrenadante (100 µl) se pipeteó en una placa de 96 pocillos de cloruro de polivinilo. Se midió la absorbancia a 414 nm (A₄₁₄) y se usó para calcular el porcentaje de hemólisis de acuerdo con la fórmula siguiente.

$$\frac{(A_{144} \text{ en solución peptídica} - A_{414} \text{ en PBS})}{(A_{414} \text{ en Triton-X 100} - A_{414} \text{ en PBS})} \times 100 \%$$

40 El porcentaje de hemólisis se representa contra la concentración de péptido y la concentración a la cual se determina el 50 % de hemólisis (DL₅₀). La Tabla 25 siguiente detalla los resultados del ensayo hemolítico usando los péptidos tratados en el presente documento.

ES 2 389 285 T3

Tabla 25

Nombre del péptido	SEC ID N°	Número P	DL5 ₀ µg/ml
Hecato AC#1 01 0	1	1	100
Hecato AM	2	2	10
SB-37 AC #1018	3	5	>
Shiva 10 AM	4	11	76
SB-37 AM	5	12	>
Shiva 10 AC #1015	6	13	50
Magainina 2	7	16	550
AM	8	23	300
FLAK03 AM	9	24	10
FLAK04 AM	10	25	16
FLAK05 AM	11	26	90
FLAK06 AM	12	27	125
FLAK06 AC	13	27B	700
FLAK06 R-AC	14	27C	250
KALV	15	30	150
FLAK 17 AM	16	34	200
FLAK 26 AM	17	35	200
FLAK 25 AM	18	36	85
Hecate 2DAc	19	37	30
FLAK43 AM	20	38	350
FLAK44AM	21	39	>
FLAK62 AM	22	40	>
FLAK 06R-AM	23	41	40
MSI-78 AM	24	42	300
FLAK50	25	43	20
FLAK51	26	44	90
FLAK57	27	45	700
FLAK71	28	46	900
FLAK77	29	47	>
FLAK50V	30	48	200
FLAK50F	31	49	225
FLAK26V AM	32	50	420
CAME-15	33	53	20
FLAK50C	34	54	250
FLAK500	35	55	20
FLAK50E	36	56	600
FLAK80	37	57	>
FLAK81	38	58	>
FLAK82	39	59	1000
FLAK83M	40	60	>
FLAK 26 Ac	41	61	390
Indolicidina	42	63	375
FLAK 17 C	43	64	6
FLAK50H	44	65	950
FLAK50G	45	66	600
Shiva deriv P69+KWKL	46	70	80
Shiva 10 (1-18_AC	47	71	>
Shiva 10 péptido 71 +KWKL	48	72	110
CA(1-7)Shiva10(1-16)	49	73	90
FLAK 54	50	74	>
FLAK 56	51	75	750
FLAK 58	52	76	>
FLAK 72	53	77	>
FLAK 75	54	79	>
Shiva 10(1-16) Ac	55	80	900
CA(1-7)Shiva10(1-16)-COOH	56	81	8
Indolocidina-ac	57	91	40
FLAK50B	58	92	300
FLAK50J	59	93	>
FLAK501	60	94	350

ES 2 389 285 T3

Nombre del péptido	SEC ID N°	Número P	DL5 ₀ µg/ml
FLAK50K	61	95	>
FLAK50L	62	96	>
Shiva-11	63	98	60
Shiva 11[(1-16)ME(2-9)]-COOH	64	99	25
FLAK50N	65	101	550
FLAK 500	66	102	500
FLAK50P	67	103	650
CA(1-&Hecato(11/23)	68	104	70
PYL-ME	69	105	ND
FLAG26-01	70	106	>
Vishnu3	71	107	>
Melitina	72	108	<
FLAK26-02	73	109	>
FLAG26-03	74	110	>
FLAK50 Q1	75	111	60
FLAK50 Q2	76	112	>
FLAK50 Q3	77	113	1000
FLAK50 Q4	78	114	>
FLAK50 Q5	79	117	>
FLAK50 Q6	80	118	700
FLAK50 Q7	81	119	400
FLAK50 Q8	82	120	>
FLAK50 Q9	83	121	>
FLAK50 Q10	84	122	>
FLAK50 T1	85	123	1000
FLAK50 T2	86	124	55
FLAK50 T3	87	125	>
FLAK50 T4	88	126	>
FLAK50 T5	89	127	>
FLAK90	90	128	>
FLAK91	91	129	>
FLAK92	92	130	>
FLAK93	93	131	>
FLAK50 Z1	94	132	>
FLAK50 Z2	95	133	>
FLAK50 Z3	96	134	>
FLAK50 Z4	97	135	900
FLAK50 Z5	98	136	>
Z6	99	137	>
FLAK50 Z7	100	138	20
FLAK50 Z8	101	139	>
FLAK50 Z9	102	140	>
FLAK94	103	141	900
FLAK93B	104	142	900
FLAK50 Z10	105	143	>
FLAK96	106	144	600
FLAK97	107	145	>
FLAK98	108	146	180
FKRLA	109	147	300
FLAK91 B	110	148	>
FLAK92B	111	149	>
FLAK99	112	150	650
FLAK50T6	113	151	>
FLAK50T7	114	152	880
FLAK95	115	153	800
FLAK50T8	116	154	450
FLAK50T9	117	155	>
FLAK100-C02H	118.	156	10
FAGVL	119	157	850
Modelina-5	120	159	ND
Modelina-5-C021 H	121	160	>
FLAK120	126	165	350

Nombre del péptido	SEC ID N°	Número P	DL ₅₀ µg/ml
FLAK121	127	166	>
FLAK96B	128	167	200
FLAK96G	129	168	600
FLAK96F	130	169	>
FLAK96C	131	170	>
FLAK960	132	171	550
Modelina-80	135	174	>
Modelina-8E	136	175	>
Flak 96	137	176	>
Flak 961	138	117	400
Flak 96J	139	178	>
Flak 96L	140	179	850
FLAK-120G	141	180	>
FLAK-1200	142	181	>
FLAK-120C	143	182	>
FLAK-120B	144	183	>
FLAK-120F	145	184	850
Magainina2wisc	146	300	250
02A21	147	301	10
KSL-1	148	302	>
KSL-7	149	303	500
LSB-37	150	306	>
Anubis-2	151	307	>
FLAK17CV	152	501	15
FLAK50Q1V	153	502	100
02A21 V	154	503	20
FLAK25AMV	155	504	70
FLAK43AMV	156	505	620
FLAK500V	157	506	120
HECATE AMV	158	507	20
HECATEACV	159	508	70
FLAK04AMV	160	509	40
FLAK03AMV	161	510	10
O-Shiva 10 AC	162	67	40
Shiva 11 AC	163	100	>
Shiva 10 (1-18)AM	164	69	900
NDta: > indica más de 1004; ND= ND determinado			

Ejemplo 8: Efectos de la sustitución de valina

5 Cambiar una secuencia peptídica en la que el primer aminoácido es valina y, en particular, cuando el primer aminoácido se cambia de fenilalanina a valina, puede conducir a propiedades deseables. La toxicidad para los glóbulos rojos y los fibroblastos (VJI38) se puede disminuir, aunque sin disminuir significativamente otras propiedades deseables. La Tabla 26 siguiente muestra numerosos ejemplos (¡4) de reducir la toxicidad indicada de un péptido como se ve a partir del incremento de la viabilidad de los glóbulos rojos y los fibroblastos cuando se tratan con el péptido. Los valores de DL₅₀ se expresan en µg/ml.

10

Tabla 26

SEC ID N°	N° P	Secuencia	Hemólisis RBC DL ₅₀	WI-38 DL ₅₀
2	2	FALALKALKKKALKKALKKALNH2	12	66
15	30	VALALKALKKKALKKALKKAL-NH2	150	93
17	35	FAKKLAKLAKKLAKLAL-NH2	150	25
32	50	VAKKLAKLAKKLAKLAL-N H2	420	45
25	43	FAKLLAKLAKKLL-NH2	20	25
30	48	VAKLLAKLAKKL-NH2	130	160
86	124	FAKLLAKLAKKVL-NH2	55	21
116	154	VAKLLAKLAKKVL-NH2	870	110

SEC ID N°	N° P	Secuencia	Hemólisis RBC DL ₅₀	WI-38 DL ₅₀
126	165	FALALKALKKL-NH2	350	850
141	180	VALALKALKKL-NH2	850	1000
43	64	FAKALKALLKALKAL-NH2	6	37
152	501	VAKALKALLKALKAL-NH2	15	26
75	111	FAKFLAKFLKKAL-NH2	5	25
153	502	VAKFLAKFLKKAL-NH2	100	64
147	301	FAKKFAKKFKKFAKKFAKFAF-NH2	10	66
154	503	VAKKFAKKFKKFAKKFAKFAF-NH2	20	150
18	36	FAKKLAKLAKKLALAL-N H2	12	19.
155	504	VAKKLAKLAKKLALAL-N H2	70	110
20	38	FAKKLAKLAKKLLAL-NH2	350	100
156	505	VAKKLAKLAKKLLAL-NH2	620	85
35	55	FAKLLAKALKKLL-NH2	20	32
157	506	VAKLLAKALKKLL-N H2	120	75
1	1	FALALKALKKALKKALKKAL-GOOH	20	27
159	508	VALALKALKKALKKALKKAL-GOOH	70	190
10	25	FALALKALKKALKKALKKAL-NH2	16	24
160	509	VALALKALKKALKKALKKAL-NH2	40	95
9	24	FALALKALKKLLKLLKLLAKKAL-NH2	10	55
161	510	VALALKALKKLLKLLKLLAKKAL-N H2	10	77

Aunque los efectos de la reducción de la toxicidad para las células de mamífero por la sustitución de valina se acompañan de modestas reducciones de la actividad terapéutica contra patógenos microbianos y células cancerosas, hay algunos casos en los que la sustitución de valina tiene como resultado un incremento deseable de la actividad terapéutica. Esto se puede ver en la Tabla 27 siguiente, en la que se muestra que la sustitución de valina, en algunos casos, ha aumentado la actividad del péptido contra la bacteria gramnegativa *Pseudomonas*.

La hemólisis y los valores de WI38 representan valores de DL₅₀. Los valores de P. aerug. Representan los valores de CMI en µg/ml contra *Pseudomonas aeruginosa*, número de registro en la ATCC 9027.

Tabla 27

SEC ID N°	N° P	Secuencia	Hemólisis	WI38	P. aerug
17	35	FAKKLAKLAKKLAKLAL	100	25	200
32	50	VAKKLAKLAKKLAKLAL	420	45	15
25	43	FAKLLAKLAKKLL	20	25	100
30	48	VAKLLAKLAKKLL	200	160	5
86	124	FAKLLAKLAKKVL	300	21	100
116	154	FAKLLAKLAKKVL	450	110	100

Ejemplo 9: Efectos de la sustitución de tirosina

Cambiar una secuencia peptídica en la que el segundo aminoácido es tirosina puede conducir a propiedades deseables. FLAK98 (P-146, SEC ID N° 108) es un péptido FLAK atípico debido a la presencia de una tirosina (Y) en la segunda posición. El significado de esta modificación y la secuencia global del péptido es que la estructura producida es probable que se pliegue fácilmente en una alfa-hélice a pH neutro (Montserret y col., Biochemistry 39: 8362-8373, 2000). La capacidad para asumir una estructura alfa-helicoidal a pH neutro puede justificar la potencia y el amplio espectro de actividad vistos con este péptido. Montserret y col. demostraron que las secuencias como estas son dirigidas hacia su plegamiento no solo por fuerzas hidrofóbicas sino también por fuerzas electrostáticas. La sustitución de la tirosina por un aminoácido en los péptidos FLAK puede conducir, en general, a mejores propiedades.

Ejemplo 10: Péptidos preferidos actualmente

- Los péptidos preferidos se pueden seleccionar a partir de los datos experimentales descritos anteriormente. Los péptidos antimicrobianos preferidos para bacterias grampositivas o gramnegativas se pueden seleccionar como valores de CMI inferiores o iguales a aproximadamente 10 µg/ml o como valores de CMB inferiores o iguales a aproximadamente 25 µg/ml. Los péptidos antifúngicos preferidos se pueden seleccionar por tener valores de CMI o CMB inferiores o iguales a aproximadamente 25 µg/ml. Los péptidos anticancerosos preferidos se pueden seleccionar por tener valores de DL₅₀ inferiores o iguales a aproximadamente 25 µg/ml.
- 10 La Tabla 28 siguiente enumera péptidos representativos preferidos actualmente en los que "X" indica que el péptido es un péptido preferido para la propiedad de dicha columna. La "longitud" del péptido es el número de residuos aminoacídicos en la secuencia.

Tabla 28

15

SEC ID Nº	Número P	Longitud (AA)	Anti-bacteriano	Antifúngico	Anticanceroso
1	1	23	X		X
2	2	23	X	X	X
4	11	23	X		
6	13	23	X		
8	23	23	X		X
10	25	23	X	X	
11	26	21	X	X	X
12	27	19	X	X	
13	27B	19	X	X	X
14	27C	19	X		
15	30	23	X		
16	34	16	X	X	X
17	35	17	X	X	X
18	36	19	X		X
19	37	23	X		X
20	38	15	X		X
23	41	19	X		
25	43	13	X	X	X
26	44	15	X		X
27	45	14	X		
28	46	15	X		
29	47	12			X
30	48	13	X	X	X
31	49	12	X		
32	50	17	X		X
34	54	13	X		
35	55	13	X	X	X
36	56	13	X		
39	59	10	X		
41	61	15	X		
43	64	15	X		
45	66	13	X		
46	70	23	X		X
47	71	18	X		
48	72	22	X		
50	74	13		X	
	75	13	X		X
52	76	14	X		
55	80	23	X		
56	81	23	X		X
57	91	15	X		X
58	92	13	X	X	X
60	94	13	X		X
65	101	13	X		
66	102	13	X	X	
67	103	12	X	X	
68	104	20	X		X

SEC ID Nº	Número P	Longitud (AA)	Anti-bacteriano	Antifúngico	Anticanceroso
74	110	12	X		
75	111	13	X		X
77	113	13	X		
80	118	13	X	X	
81	119	14	X	X	
84	122	13	X	X	
85	123	10		X	
86	124	13	X	X	X
87	125	13	X		
93	131	5	X		
106	144	12	X	X	
108	146	13	X	X	
112	150	17	X		
115	153	17	X	X	
116	154	13		X	
126	165	11	X	X	
128	167	12	X	X	
131	170	10		X	
143	182	10		X	
152	501	15	X		X
155	504	13	X		
157	506	23	X		X
161	510	23	X	X	
162	67	23	X		X
163	100	13	X	X	
164	69	23	X		
165	97	13	X	X	

Los péptidos preferidos para estimulación y proliferación también se pueden seleccionar. La Tabla 29 siguiente enumera péptidos representativos preferidos en los que "X" indica que el péptido es un péptido preferido para la propiedad de dicha columna. Se prefieren los péptidos que son estimuladores para leucocitos a una concentración de 0,1 µg/ml a 1,4 µg/ml, ya que a esta concentración los péptidos no son tóxicos para los glóbulos rojos, los fibroblastos WI-38 o leucocitos humanos. Se prefieren los péptidos que son estimuladores para fibroblastos a de 0,1 µg/ml a 1,0 µg/ml, ya que a esta concentración los péptidos no son tóxicos.

- 5
- 10 ➤ En la Tabla 29, añada péptidos P146 (SEC 108) (Longitud= 13) y P98 (SEC 165) (Longitud= 13). Estos péptidos deberían tener X en las columnas de leucocitos y de fibroblastos.

Tabla 29: Péptidos preferidos para estimulación/proliferación de leucocitos y fibroblastos

SEC ID Nº	Número P	Longitud	Leucocitos	Fibroblastos
1	29	23	X	X
2	2	23	X	X
5	12	38	X	X
6	13	23	X	X
8	23	23	X	X
10	25	23	X	X
11	26	21	X	X
12	27	19	X	X
13	27B	19	X	X
14	27C	19	X	X
15	30	23	X	X
16	34	16	X	X
17	35	17	X	X
20	38	15		X
27	45	14		X
28	46	15		X
30	48	13		X
32	50	17		X
34	54	13	X	
45	66	13	X	X
6	70	23	X	X

SEC ID N°	Número P	Longitud	Leucocitos	Fibroblastos
50	74	13	X	X
51	75	13	X	X
55	80	23		X
56	81	23		X
57	91	15	X	X
58	92	13	X	X
59	93	13		X
60	94	13		X
61	95	13	X	X
65	101	13		X
66	102	13		X
71	107	19	X	X
74	110	12		X
75	111	13		X
77	113	13		X
80	118	13		X
81	119	14		X
87	125	13	X	X
90	128	5	X	X
91	129	5		X
92	130	5		X
108	146	13	X	X
115	153	17		X
116	154	13	X	
126	165	11		X
127	166	11		X
129	168	6	X	X
132	171	11		X
137	176	11	X	
138	177	12	X	
139	178	11	X	X
140	179	11	X	X
141	180	11	X	X
142	181	10	X	X
143	182	10	X	X
144	183	5	X	X
145	184	5	X	X
159	508	23	X	X
162	67	23	X	X
164	69	18		X
165	97	13	X	X

Ejemplo 11: Efectos sinérgicos con lisozima

5 Se analizó la sinergia entre los péptidos líticos y la lisozima. Se inoculó leche esterilizada con bacterias hasta 5×10^5 por ml. Péptido Shiva-10 (SEC ID N° 4) se añadió a 10 µg/ml y se añadió lisozima de pollo a 1 mg/ml. Se determinó el porcentaje de destrucción de las bacterias.

Tabla 30

	<i>Staph. aureus</i>	<i>Pseudo aeruginosa</i>
Péptido y lisozima	0%	100%
Péptido	0%	0%
Lisozima	0%	0%

10 Se determinó la sinergia entre cecropina SB-37 (SEC ID N° 5) y la lisozima contra *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (PSPT), *Pseudomonas solanacearum* (PS), *Erwinia caratovora* subsp. *carotova* (EC), y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (XC). Se determinaron los valores de DL₅₀ (µM).

15

Tabla 31

	S8-37	Lisozima	S8-37 y Lisozima
PSPT	5,2	>	0,19
PS	64	>	16
EC	1,48	>	0,44
XC	0,57	>	0,027
> indica más de 1.000.			

5 Se determinó la sinergia entre Shiva-1 y la lisozima. El porcentaje de viabilidad de *Pseudomonas aeruginosa* se determinó respecto a los controles blanco. La lisozima se usó a la misma concentración molar que el péptido.

Tabla 32

Concentración del péptido (µM)	SB-37	Shiva-1	Lisozima (10x)	Shiva-1 y Lisozima (10x)
0	100	100	100	100
0,01	100	100	100	56,6
0,1	79,4	69,6	82,2	25,8
1	48,8	37,9	52,1	4,4
5	38,5	1,5	7,9	0,2
7,5	0,7	0,1	0,6	0
25	0	0	0,4	0

10 Se determinó la sinergia entre Shiva-1 y la lisozima. Se determinó el porcentaje de viabilidad de *S. intermedius* 19930, *S. intermedius* 20034 y *S. aureus* grampositivas respecto a los controles blanco. La lisozima se usó a diez veces la concentración molar que el péptido.

15 Tabla 33: *S. intermedius* 19930

Concentración del péptido (µM)	SB-37	Shiva-1	Lisozima (10x)	Shiva-1 y Lisozima (10x)
0	100	100	100	100
0,01	100	100	100	100
0,1	94,7	81,8	100	79,2
0,5	69,4	65	81,3	65,1
1	42,5	42,1	53	43
5	36,1	35,2	49,5	17,2
10	5,6	1,2	34,4	1,1
50	0	0	22	0

Tabla 34: *S. intermedius* 20034

Concentración del péptido (µM)	SB-37	Shiva-1	Lisozima (10x)	Shiva-1 and Lisozima (10x)
0	100	100	100	100
0,01	100	100	100	100
0,25	85,4	87,1	100	85,1
0,5	68	80	59	53,4
0,75	62,2	60,1	42,3	41
5	35,1	4,1	38,3	43
50	0	0	10	0

20

Tabla 35: *S. aureus*

Concentración del péptido (µM)	SB-37	Shiva-1	Lisozima (10x)	Shiva-1 y Lisozima (10x)
0	100	100	100	100
0,01	100	100	100	100
0,1	100	100	100	100
0,5	81	50,1	100	100
1	47,5	24,4	51	31,2
5	31,8	15,9	18,4	82
10	5,6	4,5	13,3	4,5
50	1,9	1,6	9,5	1,4

Los experimentos de sinergia también se pueden realizar usando péptidos en presencia de EDTA, que potencia los péptidos de forma aditiva o sinérgica.

Ejemplo 12: Efectos sinérgicos con antibióticos

5 Sinergia entre el péptido Shiva-1 (SEC ID N° 4) y varios agentes antimicrobianos se investigó contra *Escherichia coli* 25922. La tabla siguiente ilustra los efectos beneficiosos de la combinación del péptido con los agentes, en los que los números son la concentración bactericida mínima (CMB, µg/ml).

10 Tabla 36

Agente	Sin péptido	Con péptido
Shiva-10	50	n/a
Ticarcilina	100	50 (15 µg/ml péptido)
Cefoperazona	150	2,5 (15 µg/ml péptido)
Doxyciclina	5	1 (15 µg/ml péptido)
Neomycina	100	5 (5 µg/ml péptido)
Amikacina	150	50 (5 µg/ml péptido)
Tetracilina	10	2,5 (5 µg/ml péptido)

15 La sinergia entre el péptido Shiva-1 (SEC ID N° 4) y varios agentes antimicrobianos se investigó contra *Staph aureus* 29213. La tabla siguiente ilustra los efectos beneficiosos de la combinación del péptido con los agentes, en los que los números son la concentración bactericida mínima (CMB, µg/ml).

Tabla 37

Agente	Sin péptido	Con péptido
Shiva-10	200	n/a
Ampicilina	5	2,5
Ticarcilina	25	15
Cefoperazona	10	2,5
Tobramicina	25	10
Tetraciclina	10	1

20 La sinergia entre el péptido FLAK 26AM (P35; SEC ID N° 17) y varios agentes antimicrobianos se investigó contra la CMB de *Staph. aureus* 29213. La tabla siguiente ilustra los efectos beneficiosos de la combinación del péptido con los agentes, en los que los números son la concentración bactericida mínima (CMB, µg/ml).

25 Este experimento determinó la CMB del péptido en ausencia del agente antimicrobiano o en presencia de la concentración indicada del agente antimicrobiano.

Tabla 38

Agente	CMB del péptido
FLAK 26AM alone	50
Vancomicina (1 ppm)	32
Cefoperazona (0,25 ppm)	20

30 La sinergia entre la doxiciclina y varios péptidos se investigó contra *P. aeruginosa* 27853. La tabla siguiente ilustra los efectos beneficiosos de la combinación de doxiciclina y los péptidos, en los que los números son la concentración bactericida mínima (CMB, µg/ml). Cuando se combina con los péptidos, la doxiciclina se mantuvo a una concentración de 10 ppm.

35 Tabla 39

Agente	Sin doxiciclina	Con doxiciclina
Ooxaciclina	n/a	100
SB-37 (P5 SEC ID N° 3)	200	30
FLAK 26AM (P35 SEC ID N° 17)	50	32

40 Se investigó la sinergia entre tetraciclina y varios péptidos contra la CMB de *Escherichia coli* 25922. La tabla siguiente ilustra los efectos beneficiosos de la combinación de tetraciclina y los péptidos, en los que los números son la concentración bactericida mínima (CMB, µg/ml). Cuando se combina con los péptidos, la concentración de

tetraciclina se mantuvo a 1,5 ppm.

Tabla 40

AgentE	Sin tetraciclina	Con tetraciclina
Tetraciclina	n/a	10
FLAK06AM (P27 SEQ 10 NO:12)	75	25
FLAK 26AM (P35 SEQ 10 NO:17)	50	20

5

Ejemplo 13: Efectos sinérgicos con agentes quimioterapéuticos

Otros investigadores han notificado que los péptidos líticos que son inhibidores de las células cancerosas actuarán de forma sinérgica con los fármacos quimioterapéuticos del cáncer convencionales. Los péptidos FLAK no son una excepción. La Tabla 41 siguiente demuestra que, por ejemplo, determinados péptidos FLAK son sinérgicos con tamoxifeno en la inhibición de la línea MCF7 de las células de cáncer de mama. La Tabla 42 enumera otros candidatos peptídicos anticancerosos más activos para la aplicación sinérgica con tamoxifeno u otros fármacos de terapia contra el cáncer.

Las Tablas 41 y 42 también muestran toxicidad de los péptidos seleccionados contra glóbulos rojos, glóbulos blancos y células W138. Cuando se usan a niveles no tóxicos muy bajos, determinados péptidos anticancerosos pueden potenciar sinérgicamente otros agentes quimioterapéuticos para permitir su uso eficaz a niveles de dosis sustancialmente menores con los consiguientes efectos secundarios menores.

20

Tabla 41: Sinergia de los péptidos FLAK con tamoxifeno sobre las células MCF7

SEC ID N° (N° P)	AgentE	DL ₅₀ en células MCF7			
		Agente activo MCF7 DL ₅₀ µg/ml	Péptido conc. µg/ml	Tamo. conc. µg/ml	Total conc. µg/ml
	Tamoxifeno	20	0	20	20
164 (69)	Son con Tamox.	79	2,5	4,6	7,1
145 (184)	Son con Tamox.	240	10	4	14
121 (160)	Son con Tamox.	240	11	3,7	14,7
106 (144)	Son con Tamox.	310	35	7,7	42,7
SEC ID N° (N° P)	MCF7 DL ₅₀ µg/ml	RBC DL ₅₀ µg/ml	W138 DL ₅₀ µg/ml	WBC DL ₅₀ µg/ml	
164 (69)	79	900	60	140	
145(184)	240	850	1000	410	
121 (160)	240	> 1000	700	900	
106(144)	310	600	740	320	
17 (35)	9	200	25	25	
32(50)	32	420	40	420	
20 (38)	17	350	100	54	

Tabla 42: Otros candidatos peptídicos altamente activos para aplicaciones anticancerosas sinérgicas

SEC ID N° (N° P)	MCF7 DL ₅₀ µg/ml	RBC DL ₅₀ µg/ml	W138 DL ₅₀ µg/ml	WBC DL ₅₀ µg/ml
17 (35)	9	200	25	25
32 (50)	32	420	40	420
20 (38)	17	350	100	54

Ejemplo 14: Efectos sinérgicos con factores de crecimiento

Anteriormente en el Ejemplo 17 y la Tabla 23 se ha demostrado que ciertos de los péptidos FLAK son sinérgicos con otros mitógenos o factores de crecimiento en las propiedades estimuladoras y/o proliferativas de los péptidos.

Ejemplo 15: Efectos sinérgicos con ácido nalidíxico y cloranfenicol

Se investigaron los efectos sinérgicos de los péptidos de la invención con cloranfenicol o ácido nalidíxico contra los mutantes de eflujo de *Pseudomonas aeruginosa*. Los valores de CMI se determinaron para el ácido nalidíxico o el cloranfenicol solo como basales. Los péptidos se añadieron a su concentración CMI1/4 y se determinó la concentración de ácido nalidíxico o cloranfenicol hasta llegar a la CMI. La Tabla 43 muestra los efectos sinérgicos de

35

los péptidos con ácido nalidíxico contra *P. aeruginosa* H374, la Tabla 44 muestra los efectos sinérgicos de los péptidos con ácido nalidíxico contra *P. aeruginosa* H774 y la Tabla 45 muestra los efectos sinérgicos de los péptidos con cloranfenicol contra *P. aeruginosa* H374. El índice de concentración inhibidora fraccional (CIF) se usó para determinar la sinergia entre los péptidos y los antibióticos. Se analizaron diluciones en serie por dos en presencia de una cantidad constante de péptido, igual a un cuarto de la CMI del péptido. El índice CIF se determinó del siguiente modo: $CIF = 0,25 + CMI_{\text{antibiótico}} \text{ en combinación} / CMI_{\text{antibiótico}} \text{ solo}$. Un índice CIF de 0,5 o menor se considera sinergia.

Tabla 43

Péptido en combinación (1/4 CMI)	P. aeruginosa H374 CMI Nal-comb. FIC		Péptido en combinación (1/4 MIC) (µg/ml)	P. aeruginosa H374 MIC Nal-comb' FIC Index	
	(µg/ml)	Índice		(µg/ml)	
Nal solo	5000	-	P80	2500	0,75
P12	2500	0,75	P81	5000	1,25
P23	2500	0,75	P97	5000	1,25
P24	5000	1,25	P100	2500	0,75
P25	2500	0,75	P101	5000	1,25
P26	2500	0,75	P102	5000	1,25
P27	2500	0,25	P103	625	0,375
P30	5000	1,25	P109	2500	0,75
P31	2500	0,75	P110	2500	0,75
P34	2500	0,75	P111	2500	0,75
P35	10	2,25	P118	2500	0,75
P37	2500	0,75	p119	2500	0,75
P39	1250	0,5	P124	2500	0,75
P41	5000	1,25	P146	625	375
P42	5000	1,25	P150	1250	0,5
P43	5000	1,25	P153	5000	1,25
P44	5000	1,25	P157	2500	0,75
P45	2500	0,75	P177	5000	1,25
P46	2500	0,75	P300	312	0,312
P49	2500	0,75	P301	625	0,375
P50	5000	1,25	P306	5000	1,25
P54	5000	1,25	P307	625	0,375
P55	5000	1,25	P504	5000	1,25
P56	2500	0,75	P508	5000	1,25
P59	2500	0,75	P510	625	0,375
P60	1250	0,5			
P61	5000	1,25			
P64	5000	1,25			
P66	5000	1,25			
P69	2500	0,75			
P71	2500	0,75			
P72	2500	0,75			
P73	2500	0,75			
P75	2500	0,75			

10

Tabla 44

Péptido en combinación	P. aeruginosa H744		Péptido en combinación	P. aeruginosa H744	
	CMI de Nal-com. (µg/ml)	FIC Index		CMI Nal-com. (µg/ml)	FIC Index
Nal solo	624	-	P80	624	1,25
P12	312	0,75	P81	624	1,25
P23	624	1,25	P97	78	0,375
P24	624	1,25	P100	624	1,25
P25	156	0,5	P101	624	1,25
P26	624	1,25	P102	624	1,25
P27	624	1,25	P103	624	1,25
P30	624	1,25	P109	624	1,25
P31	624	1,25	P110	624	1,25
P34	624	1,25	P111	624	1,25

Péptido en combinación	P. aeruginosa H744		Péptido en combinación	P. aeruginosa H744	
	CMI de Nal-com. (µg/ml)	FIC _{Index}		CMI Nal-com. (µg/ml)	FIC _{Index}
P35	624	1,25	P118	624	1,25
P37	624	1,25	P119	624	1,25
P39	624	1,25	P124	624	1,25
P41	624	1,25	P146	624	1,25
P42	624	1,25	P150	312	0,75
P43	624	1,25	P153	624	1,25
P44	624	1,25	P157	624	1,25
P45	624	1,25	P177	312	0,75
P46	624	1,25	P300	156	0,5
P49	624	1,25	P301	624	1,25
P50	624	1,25	P306	312	0,75
P54	624	1,25	P307	156	0,5
P55	624	1,25	P504	1248	2,25
P56	624	1,25	P510	624	1,25
p59	624	1,25			
P60	624	1,25			
P61	624	1,25			
P64	624	1,25			
P66	624	1,25			
P69	312	0,75			
P71	624	1,25			
P72	312	0,75			
P73	624	1,25			
P75	624	1,25			

Tabla 45

Péptido en combinación (1/4 CMI)	P.aeruginosa H374		Péptido en combinación (1/4 CMI)	P. aeruginosa H374	
	CMI Cm-comb. (µg/ml)	FIC _{Index}		CMI Cm-comb' (µg/ml)	Índice FIC
Cm solo	16	-	P80	4	0,5
P12	16	1,25	P81	16	1,25
P23	8	0,75	P97	16	1,25
P24	16	1,25	P100	16	1,25
P25	4	0,5	P101	16	1,25
P26	8	0,75	P102	16	1,25
P27	8	0,75	P103	8	0,75
P30	16	1,25	P109	16	1,25
P31	16	1,25	P110	16	1,25
P34	16	1,25	P111	16	1,25
P35	16	1,25	P113	16	1,25
P37	4	0,5	P118	16	1,25
P39	8	0,75	P119	16	1,25
P41	16	1,25	P124	16	1,25
P42	16	1,25	P146	4	0,5
P43	16	1,25	P150	8	0,75
P44	16	1,25	P153	8	0,75
P45	16	1,25	P157	8	0,75
P46	8	0,75	P177	8	0,75
P49	8	0,75	P300	16	1,25
P50	16	1,25	P301	16	1,25
P54	16	1,25	P306	8	0,75
P55	16	1,25	P307	2	0,375
P56	16	1,25	P504	16	1,25
P59	8	0,75	P508	8	0,75
P60	4	0,5	P510	4	0,5
P61	16	1,25			
P64	16	1,25			
P66	16	1,25			
P69	8	0,75			

Péptido en combinación (1/4 CMI)	P.aeruginosa H374		Péptido en combinación (1/4 CMI)	P. aeruginosa H374	
	CMI Cm-comb. (µg/ml)	FIC Index		CMI Cm-comb' (µg/ml)	Índice FIC
P71	8	0,75			
P72	8	0,75			
P73	8	0,75			
P75	8	0,75			

Ejemplo 16: Actividad contra cepas resistentes a fármacos

Se analizaron los péptidos por su actividad contra cepas sensibles y resistentes a tobramicina. Como se muestra en la Tabla 46 siguiente, los péptidos P56 (SEC ID N° 36), P74 (SEC ID N° 50) y P25 (SEC ID N° 87) mostraron mayor actividad contra *Pseudomonas* ATCC 13096 resistente a tobramicina (tr) que contra *Pseudomonas* ATCC 27853 sensible a tobramicina (ts). Los mismos tres péptidos mostraron mayor actividad contra la cepa clínica 960890198-3c resistente a tobramicina (Tabla 46).

Tabla 46

Péptido	<i>Pseudomonas</i> 13096 tr	<i>Pseudomonas</i> 27853 ts
SEC ID N° 36 (P56)	16	125
SEC ID N°50 (P74)	16	125
SEC ID N° 87 (P125)	4	31

Tabla 47

Péptido	<i>Pseudomonas</i> 960890198-3c tr	ts <i>Pseudomonas</i> 27853 ts
SEC ID N° 36 (P56)	> 50	125
SEC ID N° 50 (P74)	25	125
SEC ID N° (P92)	50	63

Ejemplo 17: Cicatrización de heridas

Los péptidos de la invención se pueden usar en composiciones para liberación tópica o sistémica en aplicaciones de cicatrización de heridas. Las composiciones pueden ser un líquido, crema, pasta u otra formulación farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden contener otros agentes biológicamente activos. Las composiciones pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables.

Los péptidos FLAK han mostrado una potencia elevada contra las bacterias más asociadas con las infecciones de heridas.

S. aureus, *S. pyogenes* y *P. aeruginosa* (p.ej., Tablas 5, 6 y 7). Los péptidos han demostrado también la capacidad para ayudar en la cicatrización de heridas y, quizá, reducir la inflamación. Estas propiedades son todas características esenciales de productos de tratamiento de heridas y de infección de heridas.

Los péptidos preferidos actualmente para cicatrización de heridas mostrados en la Tabla 48 más adelante son péptidos que se prefieren para estimulación de leucocitos o fibroblastos o de ambos y para propiedades antibacterianas.

Tabla 48: Péptidos preferidos actualmente para cicatrización de heridas

SEC ID N°	N° P	SEC ID N°	N° P	SEC ID N°	N° P
1	1	50	74	93	131
2	2	51	75	108	146
5	12	55	80	115	153
6	13	56	81	116	154
8	23	57	91	126	165
10	25	58	92	127	166
11	26	59	93	129	168
12	27	60	94	132	171
13	278	61	95	137	176
14	27C	65	101	138	177
15	30	66	102	139	178
16	34	71	107	140	179
17	35	74	110	141	180
20	38	75	111	142	181
27	45	77	113	143	182
28	46	80	118	144	183
30	48	81	119	145	184

SEC ID N°	N° P	SEC ID N°	N° P	SEC ID N°	N° P
32	50	87	125	159	508
34	54	90	128	162	67
45	66	91	129	164	69
46	70	92	130	165	97

Ejemplo 18: Cicatrización de heridas con péptidos FLAK demostrada in vivo

5 La patente de EE.UU. N° 5,861,478 divulgó cicatrización de heridas in vivo en un modelo de ratas en el que el agente de cicatrización era el péptido LSB-37. LSB-37 se identifica en el presente documento como SEC ID N° 150 (péptido P306) y se evalúa en el presente documento a modo de comparación con los péptidos FLAK más pequeños que son objeto de la presente invención. Como se indica en el Ejemplo 17, los péptidos FLAK, basados en ensayos in Vitro extensos, son prometedores como agentes de cicatrización de heridas. Esto se ha demostrado en pruebas in vivo de determinados péptidos FLAK (y otros) en un modelo de cicatrización de heridas tópica en animales pequeños desarrollado para este fin.

10 El objetivo del estudio era evaluar los efectos de ciertos péptidos seleccionados sobre (i) el índice de cierre de heridas, (ii) la respuesta inflamatoria y (iii) el engrosamiento de la epidermis sobre una quemadura cutánea inducida químicamente. Se escogió la rata sin pelo como modelo de ensayo adecuado. En el estudio se usaron ratas hembra sin pelo de 100 a 150 gramos de peso y de 8 a 12 semanas de edad.

15 Se descubrió que pieles basadas en fenol comunicadas en la literatura y en comunicaciones privadas eran sistémicamente tóxicas para usar en este estudio, en el que seis parches de ensayo (pieles) con un área de superficie total de > 2 pulgadas cuadradas se indujeron en un único animal. Como alternativa, se usó ácido tricloroacético (TCA) al 70 % disuelto en etanol al 70 % para inducir los parches de erosión dérmica. Las oclusiones de piel de 30 minutos produjeron quemaduras de tercer grado con erosión completa de la epidermis y la dermis. Como agente de quemadura química, el tratamiento con TCA produjo en las ratas mucho menos trauma y mortalidad que lo observado con el modelo de fenol.

25 Las etapas del procedimiento del protocolo experimental fueron del siguiente modo:

1. Se anestesió al animal (40 mg/kg de fenobarbital).
2. Se tomaron fotografías en color del dorso del animal (con seis pieles separadas) antes de cada tratamiento y, después, a diario.
3. La superficie de la piel de la rata se preparó limpiando con etanol al 70 %. Los discos de papel de filtro (diámetro de 1,1 cm) se empaparon en TCA al 70 %/etanol.
- 35 4. Los discos se colocaron en el dorso de la rata sin pelo durante 30 minutos (6 discos que proporcionan 2 discos control (sin tratamiento con péptido) y 4 discos para pieles que van a recibir tratamiento con péptido).
- 40 5. Tras una quemadura de 30 minutos se retiraron los discos. Veinticuatro horas después se aplicaron diferentes soluciones peptídicas (1.500 ppm en solución salina) a cuatro pieles y se aplicó solución salina a las dos pieles control.
- 45 6. Las soluciones peptídicas (y solución salina para los controles) se aplicaron a las seis heridas con un cepillo suave cada día.
7. Llevó aproximadamente un mes para que las heridas cicatrizaran (cierre completo de la herida con epidermis estabilizada), tras lo cual se sacrificó al animal.
8. La piel tratada se recogió, se tiñó una sección con tricromo y se montó sobre portaobjetos.

50 EL porcentaje de cierre de heridas para cada piel (seis sitios) se midió todos los días hasta sacrificar al animal. El porcentaje de cierre se determinó midiendo sobre las fotografías del animal el área de calva restante respecto al área de la cicatriz inicial tras la quemadura. Estas mediciones se realizaron digitalizando y analizando las pieles usando el programa Sigma Plot ProScan 4.

55 Tras un cierre completo de la herida, una porción de cada piel todavía tenía un área enrojecida inflamada que se cuantificó mediante el análisis Sigma Plot de la fotografía del animal, como un porcentaje de la cicatriz curada total. Esto proporcionó una medida del tratamiento de la quemadura tras TCA de la respuesta inflamatoria en cada sitio de la piel.

60

La extensión del engrosamiento de la epidermis (hiperqueratosis) en cada sitio también se determinó mediante medición con el programa Sigma Plot aplicado a los portaobjetos con la sección teñida de las diversas áreas de cicatrización y la piel sin tratar normal (control) rodeando a las pieles. A aumentos de 100X a 320X, las microfotografías de los portaobjetos de color proporcionaron una potente herramienta para dicha cuantificación de la extensión de hiperqueratosis evidente en cada piel.

El tratamiento de los portaobjetos de la sección con tinciones selectivas produjo evidencia identificable de la presencia de leucocitos y fibroblastos en las áreas heridas. Esto también se cuantificó mediante el programa Sigma Plot. Se ha probado que es una herramienta útil en la determinación in vivo de los mecanismos por los cuales diferentes péptidos afectaron al proceso de cicatrización de heridas, incluida la estimulación/proliferación de leucocitos y la estimulación/proliferación de fibroblastos, y los efectos quimiotácticos de los péptidos en la cicatrización de heridas *in vivo*.

El modelo animal descrito anteriormente y los protocolos se usaron en el ensayo de aproximadamente 20 de los péptidos indicados en la Tabla 48 (y otros péptidos por comparación) como péptidos FLAK preferidos para cicatrización de heridas. A modo de ejemplo, los resultados siguientes en un experimento con cuatro péptidos evaluados en un único animal se muestran en la Tabla 49.

Estos péptidos son las SEC ID N° 66 (P102), SEC ID N° 71 (P102), SEC ID N° 115 (P153) y la SEC ID N°: 119 (P157). El péptido de la SEC ID N° 71 (P107) no es un péptido FLAK, sino que es un derivado de LSB-37 (SEC ID N° 150; P06). En los experimentos anteriores, se ha mostrado que estos dos péptidos tienen propiedades de cicatrización de heridas similares in vivo. La SEC ID N° 119 (P157) es un péptido que no es FLAK, notificado en la literatura, que es un péptido de comparación.

La Tabla 49 soporta la conclusión de que varios péptidos evaluados para tras los tratamientos de heridas demostraron capacidad para limitar las respuestas inflamatorias de quemaduras tras TCA. La SEC ID N° 71 y la SEC ID N°: 115 fueron superiores a este respecto y también mostraron la menor evidencia de hiperqueratosis (engrosamiento epidérmico). Dado que el experimento se realizó para el cierre completo de heridas a los 26 días, estos mismos dos péptidos mostraron una pequeña ventaja en el índice de cierre de heridas sobre los otros péptidos y no péptidos en tratamiento posterior a la herida. Estos dos péptidos también mostraron sustancialmente ausencia de hiperqueratosis en comparación con el control no tratado de quemadura con TCA.

En general, los dos péptidos citados anteriormente mostraron la mejor actividad de cicatrización de heridas. No obstante, el experimento se realizó en condiciones estériles que normalmente no se producen en situaciones de heridas en un animal en la vida real. Dado que dichas heridas tóxicas son objeto de infección, debe considerarse que las mejores propiedades antibacterianas de la SEC ID N° 66 (P102) y la SEC ID N°: 115 (P153) los convierten en candidatos lógicos para aplicaciones de cicatrización de heridas.

Tabla 49: Ejemplo de cicatrización de heridas con el péptido FLAK in vivo seleccionado (modelo de rata)

	Cierre De heridas	Área de respuesta inflamatoria	Engrosamiento de la epidermis	Leucocitos en el área de ensayo	Fibroblastos en el área de ensayo
	% de herida inicial	% de cicatriz curada	% de Control (solo TCA)	% de piel normal	% de piel normal
MUESTRA DE PIEL					
Piel normal	N/A	N/A	N/A	100	100
Quemadura con TCA sin tratar (control)	98,4	15	30	200	275
Quemaduras tratadas con péptido:					
SEC ID N° 66 (P102)	96,7	27	50	370	220
SEC ID N° :71 (P107)	100	0	33	400	420
SEC ID N° 115(P153)	99,1	7	25	235	350
SEC ID N° : 119(P157):	95,2	25	80	265	450

Ejemplo 19: Tratamiento de la fibrosis quística (FQ)

La FQ es el trastorno genético autosómico recesivo más frecuente en Norteamérica, que produce inflamación e infección en los pulmones de 30.000 niños al año en EE.UU. Más del 90 % de las infecciones pulmonares de FQ se deben a *P. aeruginosa* y más del 95 % de estos pacientes mueren por daños pulmonares. Ciertos péptidos FLAK son activos contra cepas resistentes a múltiples fármacos *Pseudomonas aeruginosa* y contra aislamientos clínicos de pacientes con FQ (Tablas 9, 43 y 44). Estos incluyen cepas resistentes a TOBI, el actual fármaco de elección para esta afección. Además, anteriormente se ha demostrado que los péptidos tales como estos (péptidos en alfa-hélice) tienen propiedades antiinflamatorias (Scott y col., J. Immunol. 165: 3358-3365, 2000) y, por tanto, no sería

sorprendente si los péptidos FLAK también exhiben esta propiedad. La combinación de un antiinflamatorio y un papel antiinfeccioso hace de estos péptidos candidatos extremadamente buenos como nuevos agentes terapéuticos para el pulmón con FQ.

5 Ejemplo 20: Tratamiento de enfermedades de transmisión sexual (ETS)

Las enfermedades de transmisión sexual (ETS) son un problema significativo en Norteamérica que cuesta a los EE.UU. solos 1,0 billones de dólares americanos al año en costes de tratamiento. Uno de los problemas principales es la incidencia creciente de cepas de *Candida* resistentes a antifúngicos, principalmente a fluconazol, incluidas especies tales como *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*. Ciertos péptidos FLAK han mostrado una actividad significativa contra estas tres especies (Tablas 13 y 10) y presentan una oportunidad muy viable para el desarrollo de un agente antifúngico tópico para prevenir la diseminación de la enfermedad fúngica. Existen pruebas en la literatura que sugieren que los péptidos FLAK pueden también tener actividad contra otros agentes de ETS, incluidos virus y bacterias, que sugiere que también puede ser posible una aplicación de amplio espectro. Ciertos péptidos FLAK demuestran un espectro amplio de actividad (Tablas 12 y 13).

Ejemplo 21: Tratamiento del acné

El acné está causado por una combinación de infección e inflamación que conduce a daño tisular y formación de cicatriz. Se ha demostrado que los péptidos FLAK tienen actividad contra la bacteria principal aislada de úlceras producidas por acné, *Propionibacterium acne* y también probablemente exhiban actividades antiinflamatorias (Scott y col., J. Immunol. 165: 3358-3365, 2000). Además, los péptidos FLAK también han mostrado una tendencia a incrementar la velocidad y la eficiencia de la cicatrización de heridas, incrementar la proliferación de fibroblastos e incrementar la producción de colágeno y laminina. Todas estas características proporcionan evidencias convincentes para la aplicación de los péptidos FLAK para el tratamiento del acné como terapéutica clínica o como cosmético.

Ejemplo 22: Aplicaciones cosméticas

Las características de los péptidos FLAK, tales como estimulación de colágeno, estimulación de fibroblastos y cicatrización de heridas, hacen del potencial de uso de dichos péptidos en cosmética, tales como productos antienvjecimiento y de rejuvenecimiento algo muy atractivo.

Ejemplo 23: Uso de péptidos FLAK en la industria alimentaria

Las principales causas de enfermedades relacionadas con la industria alimentaria son bacterias gramnegativas, tales como *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*. Una serie de péptidos FLAK demostraron una actividad específica contra estos organismos (Tablas 7 y 12). La aplicación de estos péptidos al tratamiento y, también, la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos es, por tanto, una aplicación atractiva. Por ejemplo, el uso de dichos péptidos para la descontaminación de las superficies de preparación de alimentos es una aplicación específica y potencialmente nueva.

Ejemplo 24: Aplicación sistémica de los péptidos en suero

Una serie de péptidos se introdujo en suero de oveja a 1.280 ug/ml y se incubó a 37 °C durante 30 minutos o 2 horas (Tabla 50). Posteriormente, las CMI en suero contra *Pseudomonas aeruginosa* se obtuvieron para determinar la extensión de la inactivación en suero de los péptidos. De los péptidos analizados, dos (P153 y P508) fueron solubles a 1,280 µg/ml en 70 % de suero y sus actividades disminuyeron únicamente de un modo modesto por exposición a suero. Esto sugiere que P153 y P508 pueden funcionar en suero y son buenos candidatos para una aplicación sistémica.

Tabla 50: Inactivación en suero de los péptidos

Péptido	Solubilidad	CMI 30 min de tratamiento (µg/ml)	CMI 2 h de tratamiento (µg/ml)
P24	Precipitado	40	20
P31	Precipitado	20	20
P69	Precipitado	20	20
P81	Precipitado	20	20
P153	Soluble	10	5
P508	Soluble	40	20
KB142	Precipitado	20	20
KB146	Precipitado	20	20

Ejemplo 25: Estimulación de colágeno y laminina por los péptidos FLAK

Se cultivaron líneas celulares de fibroblastos en condiciones estándar y se analizaron por colágeno y laminina usando un sistema de ELISA fabricado por Panvera (Madison, WI). Los anticuerpos para colágeno y laminina fueron fabricados por Takara Shuzo Co., Ltd Japón. La Tabla 51 siguiente muestra que uno de los cuatro péptidos mostraba una estimulación significativa de la producción de colágeno y laminina. Los otros tres péptidos analizados no estimularon ni inhibieron la producción (es decir, no se observó ningún efecto).

Tabla 51: Estimulación de colágeno y laminina

10

Péptido	Estimulación de colágeno	Estimulación de laminina
TGFβ (control)	60%	--
P153 (SEC ID N° 115)	120%	32%
P165 (SEC ID N° : 126)	0%	0%
P94 (SEC ID N° 60)	0%	0%
P12 (SEC ID N° :5)	0%	0%

Listado de secuencias

15

<110> Owen, Donald R.

<120> PÉPTIDOS BIOACTIVOS CORTOS Y PROCEDIMIENTOS PARA SU USO

<130> HELIX028

20

<140>
<141>

<160> 165 <170> PatentIn Ver. 2.1

25

<210> 1
<211> 23
<212> PRT
<213> SINTÉTICO

30

<400> 1

Phe Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu Lys Lys Leu Lys
1 5 10 15

Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu
20

35

<210> 2
<211> 23
<212> PRT
<213> SINTÉTICO

40

<220>
<221> MOD RES
<222> (23)
<223> AMIDACIÓN

45

<400> 2

Phe Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu Lys Lys Leu Lys
1 5 10 15

Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu
20

<210> 3
 <211> 38
 <212> PRT
 5 <213> SINTÉTICO

<400> 3

Met Pro Lys Trp Lys Val Phe Lys Lys Ile Glu Lys Val Gly Arg Asn
 1 5 10 15

Ile Arg Asn Gly Ile Val Lys Ala Gly Pro Ala Ile Ala Val Leu Gly
 20 25 30

Glu Ala Lys Ala Leu Gly
 35

10 <210> 4
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (23)
 <223> AMIDACIÓN

20 <400> 4

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu
 1 5 10 15

Ala Lys Leu Ala Leu Ala Leu
 20

25 <210> 5
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

30 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (38)
 <223> AMIDACIÓN

35 <400> 5

Met Pro Lys Trp Lys Val Phe Lys Lys Ile Glu Lys Val Gly Arg Asn
 1 5 10 15

Ile Arg Asn Gly Ile Val Lys Ala Gly Pro Ala Ile Ala Val Leu Gly
 20 25 30

Glu Ala Lys Ala Leu Gly
 35

40 <210> 6
 <211> 23
 <212> PRT 35 <213> SINTÉTICO

<400> 6

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu
 1 5 10 15

Ala Lys Leu Ala Leu Ala Leu
 20

5 <210> 7
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

10 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (23)
 <223> AMIDACIÓN

15 <400> 7

Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser Ala Lys Lys Phe Gly Lys Ala Phe
 1 5 10 15

Val Gly Gly Ile Met Asn Ser
 20

20 <210> 8
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

25 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (23)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 8

Phe Ala Leu Ala Ala Lys Ala Leu Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Lys
 1 5 10 15

Lys Leu Ala Lys Lys Ala Leu
 20

30 <210> 9
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

35 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (23)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 9

Phe Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys Leu Lys
1 5 10 15

Lys Leu Ala Lys Lys Ala Leu

20

<210> 10
<211> 23
5 <212> PRT
<213> SINTÉTICO

<220>
10 <221> MOD RES
<222> (23)
<223> AMIDACIÓN

<400> 10

Phe Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Lys
1 5 10 15

Lys Leu Ala Lys Lys Ala Leu
20

15

<210> 11
<211> 21
20 <212> PRT
<213> SINTÉTICO

<220>
25 <221> MOD RES
<222> (21)
<223> AMIDACIÓN

<400> 11

Phe Ala Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Ala Lys Ala Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

Ala Leu Lys Ala Leu
20

30

<210> 12
<211> 19
35 <212> PRT
<213> SINTÉTICO

<220>
<221> MOD RES
<222> (19)
<223> AMIDACIÓN

40

<400> 12

Phe Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Leu Lys Lys Ala Leu Lys
1 5 10 15

Lys Ala Leu

<210> 13
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

5 <400> 13

Phe Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Leu Lys Lys Ala Leu Lys
 1 5 10 15

Lys Ala Leu

10 <210> 14
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

15 <400> 14

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Ala Leu

20 <210> 15
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

25 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (23)
 <223> AMIDACIÓN

30 <400> 15

Val Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu Lys Lys Leu Lys
 1 5 10 15

Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu
 20

35 <210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

40 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (16)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 16

Phe Ala Leu Ala Leu Lys Lys Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu
 1 5 10 15

45

<210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

50

<220>
 <221> MOD RES
 <222> (17)
 <223> AMIDACIÓN

5 <400> 17

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala
 1 5 10 15

Leu

10 <210> 18
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (19)
 <223> AMIDACIÓN

20 <400> 18

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Ala Leu

25 <210> 19
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

30 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (13).. (14)
 <223> Xaa = D-lysine

35 <400> 19

Phe Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu Xaa Xaa Leu Lys
 1 5 10 15

Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu
 20

40 <210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

45 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (15)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 20

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Leu Ala Leu
 1 5 10 15

50

<210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 5
 <220>
 <221> MOD-RES
 <222> (15)
 <223> AMIDACIÓN
 10
 <400> 21

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Ala Leu Ala Leu
1 5 10 15

15 <210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 20 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (15)
 <223> AMIDACIÓN
 25 <400> 22

Phe Ala Leu Ala Lys Lys Ala Leu Lys Lys Ala Lys Lys Ala Leu
1 5 10 15

30 <210> 23
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 35 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (19)
 <223> AMIDACIÓN
 40 <400> 23

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala
1 5 10 15

Leu Ala Lys

45 <210> 24
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 50 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (22)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 24

Gly Ile Gly Lys Phe Leu Lys Lys Ala Lys Lys Phe Gly Lys Ala Phe
 1 5 10 15

Val Lys Ile Leu Lys Lys
 20

5 <210> 25
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

10 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 25

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Leu
 1 5 10

15 <210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 20 <213> SINTÉTICO

<220>
 <221> MOD RES
 <222> (15)
 25 <223> AMIDACIÓN

<400> 26

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Lys Leu
 1 5 10 15

30 <210> 27
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

35 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (14)
 <223> AMIDACIÓN

40 <400> 27

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Leu
 1 5 10

45 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

50 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (15)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 28

Phe Ala Lys Lys Leu Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu
 1 5 10 15

5 <210> 29
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

10 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (12)
 <223> AMIDACIÓN

15 <400> 29

Phe Ala Lys Lys Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Leu
 1 5 10

20 <210> 30
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

25 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)
 <223> AMIDACIÓN

30 <400> 30

Val Ala Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Leu
 1 5 10

35 <210> 31
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

40 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (12)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 31

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu
 1 5 10

45 <210> 32
 <211> 17
 <212> PRT
 50 <213> SINTÉTICO

<220>
 <221> MOD RES
 <222> (17)
 55 <223> AMIDACIÓN

<400> 32

Val Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala
 1 5 10 15

Leu

5 <210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

10 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (15)
 <223> AMIDACIÓN

15 <400> 33

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu
 1 5 10 15

20 <210> 34
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

25 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)
 <223> AMIDACIÓN

30 <400> 34

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Ala Leu
 1 5 10

35 <210> 35
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

40 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 35

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Ala Leu Lys Lys Leu Leu
 1 5 10

45 <210> 36
 <211> 13
 <212> PRT
 50 <213> SINTÉTICO

<220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)

<223> AMIDACIÓN

<400> 36

Phe Ala Lys Leu Leu Lys Leu Ala Ala Lys Lys Leu Leu
1 5 10

5

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

10 <213> SINTÉTICO

<220>

<221> MOD RES

<222> (10)

15 <223> AMIDACIÓN

<400> 37

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Lys Leu Leu
1 5 10

20

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> SINTÉTICO

25

<220>

<221> MOD RES

<222> (10)

<223> AMIDACIÓN

30

<400> 38

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Ala Leu Leu
1 5 10

35

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> SINTÉTICO

40

<220>

<221> MOD RES

<222> (10)

<223> AMIDACIÓN

45

<400> 39

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Leu
1 5 10

50

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> SINTÉTICO

55

<220>

<221> MOD RES

<222> (9)

<223> AMIDACIÓN

<400> 40

Phe Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Leu
1 5

5

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

10 <213> SINTÉTICO

<400> 41

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala
1 5 10 15

Leu

15

<210> 42

<211> 13

<212> PRT

<213> SINTÉTICO

20

<220>

<221> MOD RES

<222> (13)

<223> AMIDACIÓN

25

<400> 42

Ile Leu Pro Trp Lys Trp Pro Trp Trp Pro Trp Arg Arg
1 5 10

30

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> SINTÉTICO

35

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)

<223> AMIDACIÓN

40

<400> 43

Phe Ala Lys Ala Leu Lys Ala Leu Leu Lys Ala Leu Lys Ala Leu
1 5 10 15

45

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

<213> SINTÉTICO

50

<220> <221> MOD_RES

<222> (13)

<223> AMIDACIÓN

<400> 44

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Lys Leu
1 5 10

5 <210> 45
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 <220>
 <221> MOD RES
 10 <222> (13)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 45

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Lys Leu Lys Leu
1 5 10

15 <210> 46
 <211> 22
 <212> PRT
 20 <213> SINTÉTICO
 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (22)
 25 <223> AMIDACIÓN
 <400> 46

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu
1 5 10 15

Ala Lys Lys Trp Lys Leu
20

30 <210> 47
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 35 <400> 47

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu
1 5 10 15

Ala Lys

40 <210> 48
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 45 <400> 48

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu

1 5 10 15

Ala Lys Lys Trp Lys Leu
20

5 <210> 49
<211> 23
<212> PRT
<213> SINTÉTICO

10 <220>
<221> MOD RES
<222> (23)
<223> AMIDACIÓN

<400> 49

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Lys Thr Lys Leu Phe Lys Lys Phe Ala
1 5 10 15

Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu
20

15
20 <210> 50
<211> 13
<212> PRT
<213> SINTÉTICO

25 <220>
<221> MOD RES
<222> (13)
<223> AMIDACIÓN

<400> 50

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Ala Leu
1 5 10

30 <210> 51
<211> 13
<212> PRT
<213> SINTÉTICO

35 <220>
<221> MOD RES
<222> (13)
<223> AMIDACIÓN

40 <400> 51

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Leu
1 5 10

45 <210> 52
<211> 14
<212> PRT
<213> SINTÉTICO

<220>
 <221> MOD RES
 <222> (14)
 <223> AMIDACIÓN

5
 <400> 52

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Ala Ala Leu
 1 5 10

10 <210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

15
 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (15)
 <223> AMIDACIÓN

20
 <400> 53

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu
 1 5 10 15

25 <210> 54
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

30 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (12)
 <223> AMIDACIÓN

35 <400> 54

Phe Ala Lys Lys Leu Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu
 1 5 10

40 <210> 55
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

45
 <400> 55

Lys Thr Lys Leu Phe Lys Lys Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu
 1 5 10 15

Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu
 20

50 <210> 56
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

<400> 56

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Lys Thr Lys Leu Phe Lys Lys Phe Ala
 1 5 10 15

Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu
 20

5 <210> 57
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 <400> 57

Ile Leu Pro Trp Lys Trp Pro Trp Trp Pro Trp Arg Arg
 1 5 10

10 <210> 58
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> SINTÉTICO
 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)
 20 <223> AMIDACIÓN
 <400> 58

Phe Ala Lys Ala Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Leu
 1 5 10

25 <210> 59
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 30 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)
 <223> AMIDACIÓN
 35 <400> 59

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Ala Ala
 1 5 10

40 <210> 60
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 45 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)
 <223> AMIDACIÓN
 50 <400> 60

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Leu Ala Leu Lys Leu Lys Leu
 1 5 10

5 <210> 61
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 <220>
 <221> MOD RES
 10 <222> (13)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 61

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Lys Ala
 1 5 10

15
 <210> 62
 <211> 13
 <212> PRT
 20 <213> SINTÉTICO
 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)
 25 <223> AMIDACIÓN
 <400> 62

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Lys Gly
 1 5 10

30
 <210> 63
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 35 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (31)
 <223> AMIDACIÓN
 40 <400> 63

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu
 1 5 10 15

Ala Lys Leu Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu
 20 25 30

45 <210> 64
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 50 <400> 64

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu
 1 5 10 15

Ile Gly Ala Val Leu Lys Val
 20

- <210> 65
- <211> 13
- 5 <212> PRT
- <213> SINTÉTICO
- <220>
- <221> MOD RES
- 10 <222> (13)
- <223> AMIDACIÓN
- <400> 65

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Ala Leu Lys Leu Lys Leu
 1 5 10

- 15 <210> 66
- <211> 13
- <212> PRT
- 20 <213> SINTÉTICO
- <220>
- <221> MOD RES
- <222> (13)
- 25 <223> AMIDACIÓN
- <400> 66

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu
 1 5 10

- 30 <210> 67
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> SINTÉTICO
- 35 <220>
- <221> MOD RES
- <222> (12)
- <223> AMIDACIÓN
- 40 <400> 67

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Ala Leu Lys Lys Leu
 1 5 10

- 45 <210> 68
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> SINTÉTICO
- 50 <220>
- <221> MOD RES
- <222> (20)
- <223> AMIDACIÓN

<400> 68

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ala Leu Lys Lys Leu Lys Lys Ala Leu
 1 5 10 15
 Lys Lys Ala Leu
 20

5 <210> 69
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

10 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (23)
 <223> AMIDACIÓN

15 <400> 69

Lys Ile Ala Lys Val Ala Leu Ala Lys Leu Gly Ile Gly Ala Val Leu
 1 5 10 15
 Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu
 20

20 <210> 70
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

25 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (12)
 <223> AMIDACIÓN

30 <400> 70

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu
 1 5 10

35 <210> 71
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

40 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (19)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 71

Met Pro Lys Glu Lys Val Phe Leu Lys Ile Glu Lys Met Gly Arg Asn
 1 5 10 15

45 Ile Arg Asn

<210> 72

<211> 26
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

5 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (26)
 <223> AMIDACIÓN

10 <400> 72

Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu
 1 5 10 15

Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln
 20 25

15 <210> 73
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

20 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (16)
 <223> AMIDACIÓN

25 <400> 73

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Ala Leu

1 5 10 15

30 <210> 74
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

35 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (12)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 74

Phe Ala Lys Lys Leu Leu Ala Lys Ala Leu Lys Leu
 1 5 10

40

45 <210> 75
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

50 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 75

Phe Ala Lys Phe Leu Ala Lys Phe Leu Lys Lys Ala Leu
1 5 10

5 <210> 76
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 <220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (13)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 76
 15

Phe Ala Lys Leu Leu Phe Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu
1 5 10

20 <210> 77
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 <220>
 25 <221> MOD RES
 <222> (13)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 77

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Phe Leu Lys Lys Ala Leu
1 5 10

30
 <210> 78
 <211> 13
 <212> PRT
 35 <213> SINTÉTICO
 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)
 40 <223> AMIDACIÓN
 <400> 78

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Ala Phe Lys Lys Ala Leu
1 5 10

45 <210> 79
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 50 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)
 <223> AMIDACIÓN
 55

<400> 79

Phe Ala Lys Leu Phe Ala Lys Ala Phe Lys Lys Ala Leu
1 5 10

5 <210> 80
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

10 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)
 <223> AMIDACIÓN

15 <400> 80

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Ala Leu Lys Lys Phe Leu
1 5 10

20 <210> 81
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

25 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (14)
 <223> AMIDACIÓN

30 <400> 81

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Ala Leu Lys Lys Phe Ala Leu
1 5 10

35 <210> 82
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

40 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (14) <223> AMIDACIÓN

<400> 82

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Phe Ala Leu
1 5 10

45 <210> 83
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

50 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (14)
 <223> AMIDACIÓN

55

<400> 83

Phe Ala Lys Leu Phe Ala Lys Leu Ala Lys Lys Phe Ala Leu
 1 5 10

5 <210> 84
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

10 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)
 <223> AMIDACIÓN

15 <400> 84

Phe Lys Leu Ala Phe Lys Leu Ala Lys Lys Ala Phe Leu

1 5 10

20 <210> 85
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

25 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (10)
 <223> AMIDACIÓN

30 <400> 85

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Lys
 1 5 10

35 <210> 86
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

40 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 86

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Val Leu
 1 5 10

45 <210> 87
 <211> 13
 <212> PRT
 50 <213> SINTÉTICO

<220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)
 <223> AMIDACIÓN

5 <400> 87

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Ile Leu
 1 5 10

10 <210> 88
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

15 <220>
 <221> MOD RES
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

20 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)
 <223> AMIDACIÓN

25 <400> 99

Phe Ala Lys Gly Val Gly Lys Val Gly Lys Lys Ala Leu
 1 5 10

30 <210> 100
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)
 <223> AMIDACIÓN

40 <400> 100

Phe Ala Phe Gly Lys Gly Ile Gly Lys Ile Gly Lys Lys Gly Leu
 1 5 10 15

45 <210> 101
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

50 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (16)
 <223> AMIDACIÓN

55 <400> 101

<400> 105

Phe Ala Lys Ile Ile Ala Lys Ile Ala Lys Lys Ile
1 5 10

5 <210> 106
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

10 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (12)
 <223> AMIDACIÓN

15 <400> 106

Phe Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu
1 5 10

20 <210> 107
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

25 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (8)
 <223> AMIDACIÓN

30 <400> 107

Phe Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys
1 5

35 <210> 108
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

40 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)
 <223> AMIDACIÓN

45 <400> 108

Lys Tyr Lys Lys Ala Leu Lys Lys Leu Ala Lys Leu Leu
1 5 10

50 <210> 109
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

55 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (17)
 <223> AMIDACIÓN

<211> 11
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

5 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (11)
 <223> AMIDACIÓN

10 <400> 113

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys
 1 5 10

15 <210> 114
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

20 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)
 <223> AMIDACIÓN

25 <400> 114

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Gly Leu
 1 5 10

30 <210> 115
 <211> 1
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

<400> 115

Met
 1

35

40 <210> 116
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

45 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 116

Val Ala Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Val Leu
 1 5 10

50

<210> 117
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

55

<210>121
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> SINTÉTICO
 <400> 121

Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu
 1 5 10 15

10 <210> 122
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 15 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (9)
 <223> AMIDACIÓN
 20 <400> 122

Lys Trp Lys Lys Leu Ala Lys Lys Trp
 1 5

25 <210> 123
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 30 <400> 123

Lys Trp Lys Lys Leu Ala Lys Lys Trp
 1 5

35 <210> 124
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 <220>
 40 <221> MOD RES
 <222> (17)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 124
 45

Lys Leu Trp Lys Lys Trp Ala Lys Lys Trp Leu Lys Leu Trp Lys Ala
 1 5 10 15

Trp

<210> 125
 <211> 16
 50 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 <400> 125

Lys Leu Trp Lys Lys Trp Ala Lys Lys Trp Leu Lys Leu Trp Lys Ala
 1 5 10 15

5 <210> 126
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

10 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (11)
 <223> AMIDACIÓN

15 <400> 126

Phe Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Leu
 1 5 10

20 <210> 127
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

25 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (11)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 127

Phe Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu
 1 5 10

30 <210> 128
 <211> 12
 <212> PRT
 35 <213> SINTÉTICO

40 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (12)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 128

Phe Ala Leu Ala Leu Lys Leu Ala Lys Lys Ala Leu
 1 5 10

45 <210> 129
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)
 <223> AMIDACIÓN

55 <400> 129

Phe Ala Leu Leu Lys Leu
1 5

5 <210> 130
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

<220>
 10 <221> MOD RES
 <222> (10)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 130
 15

Phe Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys
1 5 10

<210>131
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

<220>
 <221> MOD_RES
 25 <222> (10)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 131

Phe Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu
1 5 10

30
 <210> 132
 <211> 11
 <212> PRT
 35 <213> SINTÉTICO

<220>
 <221> MOD RES
 <222> (11)
 40 <223> AMIDACIÓN

<400> 132

Phe Ala Leu Leu Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu
1 5 10

45 <210> 133
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

50 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (4)

<223> AMIDACIÓN

<400> 133

Lys Trp Lys Lys
1

5

<210> 134

<211> 5

<212> PRT

10 <213> SINTÉTICO

<220>

<221> MOD RES

<222> (5)

15 <223> AMIDACIÓN

<400> 134

Lys Trp Lys Lys Leu
1 5

20

<210> 135

<211> 9

<212> PRT

<213> SINTÉTICO

25

<220>

<221> MOD RES

<222> (9)

30

<400> 135

Lys Phe Lys Lys Leu Ala Lys Lys Phe
1 5

35

<210> 136

<211> 9

<212> PRT

<213> SINTÉTICO

40

<220>

<221> MOD RES

<222> (9)

<223> AMIDACIÓN

45

<400> 136

Lys Phe Lys Lys Leu Ala Lys Lys Trp
1 5

50

<210> 137

<211> 11

<212> PRT

<213> SINTÉTICO

<220>

ES 2 389 285 T3

<221> MOD RES
 <222> (11)
 <223> AMIDACIÓN

5 <400> 137

Phe Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Ala
 1 5 10

10 <210> 138
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)
 <223> AMIDACIÓN

20 <400> 138

Phe Ala Leu Leu Lys Ala Leu Leu Lys Lys Ala Leu
 1 5 10

25 <210> 139
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 139

Phe Ala Leu Ala Leu Lys Leu Ala Lys Lys Leu
 1 5 10

35

<210> 140
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

40 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (11)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 140

Leu Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Leu Ala Phe
 1 5 10

50

<210> 141
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

ES 2 389 285 T3

<220>
 <221> MOD RES
 <222> (11)
 <223> AMIDACIÓN

5 <400> 141

Val Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Leu
1 5 10

10 <210> 142
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

15 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (10)
 <223> AMIDACIÓN

20 <400> 142

Phe Ala Leu Ala Leu Lys Leu Lys Lys Leu
1 5 10

25 <210> 143
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

30 <221> MOD RES
 <222> (10)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 143

Phe Ala Leu Ala Leu Lys Ala Lys Lys Leu
1 5 10

35 <210> 144
 <211> 4
 <212> PRT

40 <213> SINTÉTICO

<220>
 <221> MOD RES
 <222> (4)
 <223> AMIDACIÓN

45 <400> 144

Phe Ala Leu Ala
1

50 <210> 145
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

55

ES 2 389 285 T3

<220>
<221> MOD RES
<222> (5)
<223> AMIDACIÓN

5
<400> 145

Trp Ala Leu Ala Leu
1 5

10 <210> 146
<211> 23
<212> PRT
<213> SINTÉTICO

15 <220>
<221> MOD RES
<222> (23)
<223> AMIDACIÓN

20 <400> 146

Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ala Ala Lys Lys Phe Ala Lys Ala Phe
1 5 10 15

Val Ala Glu Ile Met Asn Ser
20

25 <210>147
<211> 23
<212> PRT
<213> SINTÉTICO

30 <220>
<221> MOD RES
<222> (23)
<223> AMIDACIÓN

35 <400> 147

Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Lys Phe Lys Lys Phe Ala Lys Lys Phe
1 5 10 15

Ala Lys Phe Ala Phe Ala Phe
20

40 <210> 148
<211> 10
<212> PRT
<213> SINTÉTICO

45 <220>
<221> MOD RES
<222> (10)
<223> AMIDACIÓN

<400> 148

Lys Lys Val Val Phe Lys Val Lys Phe Lys
 1 5 10

5 <210> 149
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 <220>
 <221> MOD RES
 10 <222> (10)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 149

Phe Lys Val Lys Phe Lys Val Lys Val Lys
 1 5 10

15 <210> 150
 <211> 38
 <212> PRT
 20 <213> SINTÉTICO
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (38)
 25 <223> AMIDACIÓN
 <400> 150

Leu Pro Lys Trp Lys Val Phe Lys Lys Ile Glu Lys Val Gly Arg Asn
 1 5 10 15

Ile Arg Asn Gly Ile Val Lys Ala Gly Pro Ala Ile Ala Val Leu Gly
 20 25 30

Glu Ala Lys Ala Leu Gly
 35

30 <210>151
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 35 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (23)
 <223> AMIDACIÓN
 40 <400> 151

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu
 1 5 10 15

Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu
 20

45 <210> 152

Val Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Ala Leu

<210> 156
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 <220>
 <221> MOD RES
 10 <222> (15)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 156

Val Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Leu Ala Leu
 1 5 10 15

15
 <210> 157
 <211> 13
 <212> PRT
 20 <213> SINTÉTICO
 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (13)
 25 <223> AMIDACIÓN
 <400> 157

Val Ala Lys Leu Leu Ala Lys Ala Leu Lys Lys Leu Leu
 1 5 10

30
 <210> 158
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 35
 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (23)
 <223> AMIDACIÓN
 40
 <400> 158

Val Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu Lys Lys Leu Lys
 1 5 10 15

Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu
 20

45 <210> 159
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO
 50 <400> 159

Val Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu Lys Lys Leu Lys
 1 5 10 15

Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu
 20

5 <210> 160
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

10 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (23)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 160

Val Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Lys
 1 5 10 15

Lys Leu Ala Lys Lys Ala Leu
 20

15
 20 <210> 161
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

<220>
 <221> MOD RES
 <222> (23)
 25 <223> AMIDACIÓN

<400> 161

Val Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys Leu Lys
 1 5 10 15

Lys Leu Ala Lys Lys Ala Leu
 20

30 <210> 162
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> SINTÉTICO

35 <400> 162

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu
 1 5 10 15

Ala Lys Leu Ala Leu Ala Leu
 20

40 <210> 163
 <211> 30
 <212> PRT

<213> SINTÉTICO

<400> 163

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu
1 5 10 15

Ala Lys Leu Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Ala Leu Lys Ala
20 25 30

5

<210> 164

<211> 18

<212> PRT

10 <213> SINTÉTICO

<220>

<221> MOD RES

<222> (18)

15 <223> AMIDACIÓN

<400> 164

Phe Ala Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu Lys Lys Leu Ala Lys Lys Leu
1 5 10 15

Ala Lys

20

<210> 165

<211> 13

<212> PRT

<213> SINTÉTICO

25

<220>

<221> MOO RES

<222> (13)

<223> AMIDACIÓN

30

<400> 165

Phe Ala Lys Leu Leu Ala Leu Ala Leu Lys Lys Ala Leu
1 5 10

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido aislado, en el que la secuencia de aminoácidos del péptido consiste en la SEC ID N° 43, SEC ID N° 20, SEC ID N° 25, SEC ID N° 26, SEC ID N° 35, SEC ID N° 39, SEC ID N° 81, SEC ID N° 91, SEC ID N° 92, SEC ID N° 129 o la SEC ID N° 138.
2. El péptido de la reivindicación 1, en el que la secuencia del péptido es SEC ID N° 43.
- 10 3. El péptido de la reivindicación 1, en el que la secuencia del péptido es SEC ID N° 129.
4. El péptido de la reivindicación 1, en el que la secuencia del péptido es SEC ID N° 91 o la SEC ID N° 92.
5. El péptido de la reivindicación 1, en el que el extremo C del péptido está amidado.
- 15 6. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, para su uso como medicamento.
7. Una composición que comprende un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un transportador farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 20 8. La composición de la reivindicación 7, en la que la composición está en forma de un aerosol, emulsión, líquido, loción, crema, pasta, pomada o espuma.
9. La composición de la reivindicación 7 para usar en administración tópica en la piel.