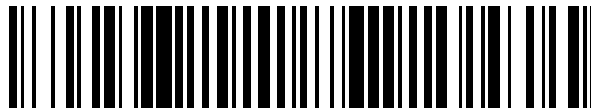


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 108**

51 Int. Cl.:

**A01N 37/46** (2006.01)

**C07K 7/08** (2006.01)

**A01N 63/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2008 E 08775240 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 2170928**

54 Título: **Péptidos antibióticos**

30 Prioridad:

**23.07.2007 DE 102007036128**

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

**13.11.2013**

73 Titular/es:

**AMP-THERAPEUTICS GMBH (100.0%)  
Deutscher Platz 5  
04103 Leipzig, DE**

72 Inventor/es:

**HOFFMANN, RALF y  
CZIHAL, PATRICIA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 429 108 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 antibióticos

Esta invención se refiere a nuevos péptidos antibióticos, especialmente para su uso en medicina.

Además, la invención se refiere a composiciones y métodos para eliminar microbios, tales como bacterias u hongos, y a los métodos para el tratamiento de infecciones microbianas. La invención se refiere además a un método para el análisis de escrutinio de fármacos.

La incidencia de las infecciones bacterianas y fúngicas graves está aumentando a pesar de los notables avances en la terapia con antibióticos. Cada año hay más de 40 millones de hospitalizaciones en los Estados Unidos, y aproximadamente 2 millones de pacientes adquieren infecciones nosocomiales, de las cuales 50 a 60% implican a bacterias resistentes a los antibióticos [1]. El número de muertes relacionadas con la enfermedad nosocomial se estima en 60.000-70.000 anualmente en los EE.UU. y hasta 10.000 en Alemania [2]. Si bien las bacterias Gram-negativas resistentes fueron un problema importante en la década de 1970, la última década ha visto un ascenso en el número de incidentes con cepas Gram-positivas resistentes a múltiples fármacos [3]. Actualmente, la rápida aparición de cepas resistentes implica tanto a patógenos Gram-positivos como Gram-negativos [4]. La resistencia se desarrolló primero en las especies en las que las eran suficientes mutaciones individuales para ocasionar niveles clínicamente importantes, tales como *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, seguido por las bacterias en la que se requieren múltiples mutaciones, tales como *E. coli* y *Neisseria gonorrhoea*. Esto se debe principalmente a la amplia utilización de fluoroquinolonas [5]. Las causas importantes de la resistencia de los Gram-negativos incluyen las lactamasas de amplio espectro en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* [6]. Casi la mitad de las cepas clínicas de *Haemophilus ducreyi*, el agente causante del chancroide, porta los genes que confieren resistencia a amoxicilina, ampicilina y una serie de otras  $\beta$ -lactamas [7]. Del mismo modo, para *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium, la resistencia a las tetraciclinas se ha incrementado de cero en 1948 a un nivel de 98% en 1998 [8].

Esto requiere una búsqueda continua de nuevos antibióticos. Los péptidos antibacterianos inducibles representan un campo de estudio en el que convergen la bioquímica, la inmunología y el diseño de fármacos contemporáneos. Los antibióticos peptídicos, que varían en tamaño de 13 a más de un centenar de residuos de aminoácidos, se han aislado a partir de plantas, animales y microbios [9]. Un solo animal produce cerca de 6-10 antibióticos peptídicos, mostrando cada péptido a menudo un espectro de actividad completamente diferente [10]. Está bien establecido que la inmensa mayoría de los péptidos antibacterianos, incluyendo las defensinas, cecropinas y magaininas bien estudiadas, funcionan a través de un mecanismo "lítico/ionofórico". Un punto común de todos los péptidos "líticos" es un efecto de permeabilización de las membranas citoplásmicas bacterianas [11,12,13]. Una estructura catiónica, anfipática que permite la formación de canales iónicos hidrófilos (protones) en una bicapa lipídica es fundamental para esta actividad; la fuga de protones ocasiona la disipación del potencial de membrana, necesario para muchos procesos vitales esenciales, causando así la muerte celular. Como la perturbación de las membranas por estos péptidos no es dependiente del reconocimiento de moléculas quirales, las sustituciones de aminoácidos que no anulan la estructura anfipática general o la carga neta básica son toleradas funcionalmente [14,15]. Los péptidos que actúan directamente sobre la membrana bacteriana a menudo tienen también efectos tóxicos sobre las membranas de mamíferos a concentraciones más altas, lo que limita su potencial como fármacos futuros. Cuando se insertan prolinas en las secuencias de los péptidos antimicrobianos  $\alpha$ -helicoidales, la capacidad de los péptidos para permeabilizar la membrana citoplasmática de *E. coli* disminuye sustancialmente como una función del número de residuos de prolina incorporados. A este respecto, es interesante que algunos de los péptidos antibacterianos nativos más activos, al menos frente a patógenos Gram-negativos seleccionados, pertenezcan a la familia de péptidos ricos en prolina [16].

Tales efectos secundarios pueden ser superados por otros péptidos antimicrobianos que se dirigen a proteínas bacterianas específicas u otros compuestos intra- o extracelulares sin reactividad cruzada con análogos de mamífero. Esto parece ser cierto para péptidos antimicrobianos ricos en prolina, incluyendo la apidaecina, originalmente aislada de insectos. Con esta enorme variación en el tamaño y las propiedades bioquímicas, no es sorprendente que las relaciones estructura-actividad y conformación-actividad sean el foco de los estudios de péptidos antibacterianos. Un reajuste completo del repertorio de péptidos antibacterianos naturales a sus potencias biológicas no sólo es importante en términos de la bioquímica general, sino que tiene un interés permanente para la industria farmacéutica. A pesar de los problemas con los ensayos in vitro de antibióticos basados en péptidos, unos pocos péptidos antibacterianos catiónicos nativos ya han alcanzado la fase de pruebas clínicas [17]. Mientras que algunos de ellos han dado muestras de eficacia en pruebas clínicas tempranas como agentes tópicos, otros muestran actividad como terapia sistémica. Por ejemplo, la proteína catiónica de rBPI 21 ha completado recientemente la fase III de pruebas clínicas para su uso parenteral en la meningococemia [17].

La apidaecina, que fue aislada originalmente de abejas, pertenece a la familia de péptidos antimicrobianos ricos en prolina y muestra similitudes de secuencia con pirrocoricina, drosocina y formaecina (Tabla 1) [18]. Las apidaecinas son péptidos de 18-20 residuos de longitud que contienen L-aminoácidos no modificados sólo con extremos C PRPPHPRI/L altamente conservados y un contenido de prolina relativamente alto (33%). Pueden ser fácilmente sintetizadas en fase sólida usando la estrategia Fmoc/<sup>t</sup>Bu normal. El péptido inhibe la viabilidad de muchas bacterias gram negativas en dosis nanomolares, mientras las gram positivas no se ven afectadas. La actividad letal es casi

inmediata y se demostró que era independiente del mecanismo "lítico" convencional [19]. Además, los mutantes resistentes a la apidaecina tienen una sensibilidad sin merma a los péptidos "formadores de poros" y el enantiómero D está desprovisto de actividad antibacteriana. El modelo actual es que los efectos antagónicos de la apidaecina sobre las bacterias implican el reconocimiento estereoselectivo de las dianas quirales [19]. Los péptidos antimicrobianos ricos en prolina que incluyen apidaecina como un miembro de esta familia no se limitan a eliminar las bacterias por permeabilización de sus membranas, sino que se unen estereoespecíficamente a una proteína diana, que no se ha identificado para la apidaecina, y en última instancia conducen a la muerte celular. Por otra parte, en agudo contraste con los AMP con estructuras secundarias definidas como la melitina o la gramcidina S, los péptidos ricos en prolina parecen no ser tóxicos in vitro para las células eucarióticas y no son hemolíticos. En suero de mamífero la apidaecina es completamente degradada en una hora debido a las divisiones en los extremos N y C, lo que podría ser el resultado de la escisión con amino- y carboxi-peptidasas, de la escisión con endoproteasas o de todo ello. Los metabolitos antes mencionados perdieron la actividad antimicrobiana con unos valores de CIM típicamente por encima de 125 µg/ml.

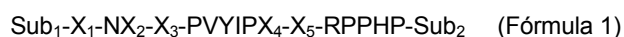
Tabla 1: Comparación de las secuencias de apidaecina 1a o 1b (*Apis mellifera*) [18], drosocina (*Drosophila melanogaster*) [20], formaecina 1 (*Myrmecia gulosa*) [21], y pirrococina (*Pyrrhocoris apterus*) [22].

| SEC ID NO | Péptido       | Secuencia            |
|-----------|---------------|----------------------|
| 1         | Apidaecina 1a | GNNRPVYIPQPRPPHPRI   |
| 2         | Apidaecina 1b | GNNRPVYIPQPRPPHPRL   |
| 161       | Drosocina     | GKPRPYSPRPTSHPRPIRV  |
| 162       | Formaecina 1  | GRPNPVNKNKTPYPHL     |
| 163       | Pirrococina   | VDKGSYLPRPTPPRPIYNRN |

Todavía existe una necesidad de nuevos compuestos anti-bacterianos y anti-fúngicos, nuevas composiciones farmacéuticas anti-bacterianas y anti-fúngicas, métodos de uso de los mismos, y compuestos novedosos que se puedan emplear en el análisis de escrutinio de fármacos para detectar nuevos antibióticos farmacéuticos.

Un objetivo de la invención es proporcionar nuevos péptidos antibióticos, preferiblemente con estabilidad elevada. Otro objetivo de la invención es proporcionar un método para el análisis de escrutinio de fármacos.

Este primer objetivo se resuelve mediante los péptidos de acuerdo con la invención, con al menos 16 residuos y la fórmula general



en donde

X<sub>1</sub> es un radical que tiene una carga neta positiva o una cadena lateral cargada positivamente en condiciones fisiológicas, que aún lleva una carga positiva después de la modificación con Sub<sub>1</sub>. Los residuos X<sub>1</sub> preferidos se seleccionan preferiblemente del grupo de residuos cargados positivamente, incluyendo arginina, δ-hidroxilisina, homoarginina, β-homoarginina, D-arginina, metilarginina (preferiblemente alfa-N-metilarginina), nitroarginina (preferiblemente N(G)-Nitroarginina), nitrosoarginina (preferiblemente N(G)-Nitrosoarginina), arginal (el -COOH de la arginina se sustituye por -CHO), ácido guanidinopropiónico, ácido 2,4-diaminobutírico, ε-N-metil lisina, alo-hidroxilisina, ácido 2,3-diaminopropionico, ácido 2,2'-diaminopimélico, lisina, ornitina, dimetilarginina simétrica, dimetilarginina asimétrica, ácido 2,6 -diaminohexinoico, histidina, 1-metil-histidina, 3-metil-histidina, ácido p-aminobenzoico, y 3-amino-tirosina;

X<sub>2</sub> es un residuo con una cadena lateral polar (tal como asparragina, serina, citrulina o glutamina) o un radical que tiene una carga neta positiva o una cadena lateral cargada positivamente en condiciones fisiológicas (tal como lisina o arginina, ornitina u homoarginina). Los residuos X<sub>2</sub> preferidos se seleccionan entre los grupos que incluyen asparragina, glutamina, serina, treonina, cis-4-hidroxiprolina, trans-4-hidroxiprolina, cis-3-hidroxiprolina, trans-3-hidroxiprolina, citrulina, N-metilserina, N-metilglicina, dihidroxifenilalanina, N-etilasparragina, N-etilglicina, homoserina, penicilamina, tetrahidropiraniilglicina, alo-treonina, 3,5-dinitrotirosina así como arginina, lisina, δ-hidroxilisina, homoarginina, ácido 2,4-diaminobutírico, β-homoarginina, D-arginina, metilarginina (preferiblemente alfa-N-metilarginina), nitroarginina (preferiblemente N(G)-Nitroarginina), nitrosoarginina (preferiblemente N(G)-Nitrosoarginina), arginal, ácido guanidinopropiónico, ε-N-metil lisina, alo-hidroxilisina, ácido 2,3-diaminopropionico, ácido 2,2'-diaminopimélico, ornitina, dimetilarginina simétrica, dimetilarginina asimétrica, ácido 2,6-diaminohexinoico, histidina, 1-metil-histidina, 3-metil-histidina, ácido p-aminobenzoico, y 3-amino-tirosina;

X<sub>3</sub> es un radical que tiene una carga neta positiva o una cadena lateral cargada positivamente en condiciones fisiológicas. Los residuos X<sub>3</sub> preferidos se seleccionan del grupo que incluye arginina, lisina, δ-hidroxilisina, homoarginina, ácido 2,4-diaminobutírico, β-homoarginina, D-arginina, metilarginina (preferiblemente alfa-N-metilarginina), nitroarginina (preferiblemente N(G)-Nitroarginina), nitrosoarginina (preferiblemente N(G)-

Nitrosoarginina), arginal, ácido guanidinopropiónico,  $\epsilon$ -N-metil lisina, alo-hidroxilisina, ácido 2,3-diaminopropionico, ácido 2,2'-diaminopimélico, ornitina, dimetilarginina simétrica, dimetilarginina asimétrica, ácido 2,6-diaminohexinoico, histidina, 1-metil-histidina, ácido p-aminobenzoico, 3-metil-histidina, y 3-amino-tirosina;

5  $X_4$  es un residuo neutro con una cadena lateral polar, tal como asparragina o citrulina, o un radical que tiene una carga neta positiva o una cadena lateral cargada positivamente en condiciones fisiológicas. Los residuos  $X_4$  preferidos se seleccionan entre los grupos que incluyen asparragina, homoglutamina, cis-4-hidroxiprolina, trans-4-hidroxiprolina, cis-3-hidroxiprolina, trans-3-hidroxiprolina, citrulina, N-metilserina, N-metilglicina, dihidroxifenilalanina, N-etilasparragina, N-etilglicina, homoserina, penicilamina, tetrahidropiraniilglicina, alo-treonina, y 3,5-dinitrotirosina así como arginina, lisina,  $\delta$ -hidroxilisina, homoarginina, ácido 2,4-diaminobutírico,  $\beta$ -homoarginina, D-arginina, metilarginina (preferiblemente alfa-N-metilarginina), nitro-arginina (preferiblemente N(G)-Nitroarginina), nitrosoarginina (preferiblemente N(G)-Nitrosoarginina), arginal, ácido guanidinopropiónico,  $\epsilon$ -N-metil lisina, alo-hidroxilisina, ácido 2,3-diaminopropionico, ácido 2,2'-diaminopimélico, ornitina, dimetilarginina simétrica, dimetilarginina asimétrica, ácido 2,6-diaminohexinoico, histidina, ácido p-aminobenzoico, 1-metil-histidina, 3-metil-histidina, y 3-amino-tirosina;

15  $X_5$  es prolina o un derivado de prolina, como cis-4-hidroxiprolina, trans-4-hidroxiprolina, cis-3-hidroxiprolina, trans-3-hidroxiprolina,  $\beta$ -ciclohexilalanina, 3,4-cis-metanoprolina, 3,4-deshidroprolina, homoprolina o pseudoprolina;

Un residuo neutro se define como un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral sin carga en condiciones fisiológicas. Las condiciones fisiológicas se definen como pH 7,4, 37°C y una presión osmótica de 300 mOsm/kg. Una cadena lateral polar se define como una cadena lateral que porta al menos un grupo polar (por ejemplo, un grupo hidroxilo, amino, amida, o sulfhidrilo) que permite la formación de un enlace de hidrógeno con otro grupo polar. Un derivado de prolina es una estructura derivada de prolina que contiene un anillo de pirrolidina sustituido o no sustituido. Un radical que tiene una carga neta positiva o una cadena lateral cargada positivamente en condiciones fisiológicas es un residuo de aminoácido alcalino. Un radical hidrófobo es un residuo neutro sin grupos polares en la cadena alifática o lateral de un aminoácido aromático, siendo preferiblemente más hidrófobo que la alanina.

25 Siendo  $Sub_1$  una guanidinación del grupo amino N-terminal (reemplazando el grupo amino N-terminal de la secuencia de aminoácidos  $X_1$  por  $Sub_1$ ).

Siendo  $Sub_2$  el grupo carboxilo C-terminal libre del aminoácido C-terminal o una modificación del grupo carboxilo C-terminal, preferiblemente con la fórmula general  $COR_3$  (reemplazando  $R_3$  el grupo hidroxilo del último aminoácido)  $X_6-COR_3$  o  $X_7-COR_3$  o  $X_6X_7-COR_3$ .

30  $COR_3$  se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en:

(i) carboxilo (siendo  $R_3$  un hidroxilo libre), un éster (siendo  $R_3$  alcoxi), una amida (siendo  $R_3$  una amina) o una imida;

(ii) junto con  $Sub_1$  un conector que une mediante puente los extremos N- y C-terminales del mismo para obtener un péptido cíclico

35 (iii)  $COR_3$ , siendo  $R_3$  un residuo de aminoácido adicional seleccionado del grupo que consiste en Pro, Ile, Leu, Arg, Val o siendo  $R_3$  un péptido, preferiblemente con dos a tres aminoácidos que contienen al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro, Ile, Leu, Arg, Val sustituido con un miembro del grupo que consiste en carboxilo (siendo  $R_3$  un hidroxilo libre), un éster (siendo  $R_3$  un alcohol, tal como metanol, etanol, propanol, isopropanol o butanol), una amida (siendo  $R_3$  una amina) o una imida (siendo  $R_3$  una alquilamina o dialquilamina, tal como metilamina, etilamina, dimetilamina, o ciclohexilamina).

40 (iv)  $COR_3$  siendo  $R_3$  un aminoácido ramificado adicional para formar una estructura oligomérica o dimérica, tal como lisina, hidroxilisina, ornitina, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 2,3-diaminopropiónico, ácido 2,2'-diaminopimélico, desmosina, isodesmosina o combinaciones de estos aminoácidos ramificados.

45 De esta manera, los péptidos C-terminales pueden estar formados, en particular, como un éster ( $R_3 =$  Alcoxi), una amida ( $R_3 =$  Amida), una imida o un péptido prolongado por aminoácidos adicionales seleccionados del grupo que consiste en Pro, Ile, Arg, Val modificado de nuevo en el extremo C-terminal en forma de éster, amida, o imida. Se pueden formar otros péptidos por modificaciones en los extremos N- o C-terminales del péptido. Estos cambios pueden ser, por ejemplo, la adición de un grupo alquilo o alcanoilo (o bien que tiene una cadena lineal o bien que es ramificado o cíclico o heterocíclico) o un grupo guanidino o la adición de una macromolécula o un radical informador, ya sea a través de un enlace permanente o una conexión que puede ser escindida bajo ciertas condiciones (tales como puentes disulfuro o conectores lábiles en medio ácido).

55 Todos los aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales o derivados de aminoácidos (tales como iminoácidos) que forman los péptidos o derivados de péptidos de la invención pueden estar o bien en configuración L o bien en configuración D. Sin embargo, si no se especifica lo contrario, los aminoácidos, elementos esenciales de las secuencias están preferiblemente en configuración L.

X<sub>6</sub> y X<sub>7</sub> son residuos adicionales opcionales. Así, en el caso en el que X<sub>6</sub> y X<sub>7</sub> están ausentes, la última Prolina (P) de la secuencia mencionada anteriormente tiene un grupo carboxilo C-terminal libre o está conectada a Sub<sub>2</sub>.

Por lo tanto en el caso en el que al menos uno de los residuos X<sub>6</sub> y X<sub>7</sub> están presentes, el péptido tiene por ejemplo una de las siguientes fórmulas generales:

5 Sub<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>-NX<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-PVYIPX<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-RPPHPX<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-COR<sub>3</sub> (Fórmula 2)

Sub<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>-NX<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-PVYIPX<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-RPPHPX<sub>6</sub>-COR<sub>3</sub> (Fórmula 3)

Sub<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>-NX<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-PVYIPX<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-RPPHPX<sub>7</sub>-COR<sub>3</sub> (Fórmula 4)

10 X<sub>6</sub> se selecciona entre prolina o un derivado de prolina o un residuo que tiene una carga neta positiva o una cadena lateral cargada positivamente en condiciones fisiológicas. Los residuos X<sub>6</sub> preferidos se seleccionan entre los grupos que incluyen prolina, cis-4-hidroxiprolina, trans-4-hidroxiprolina, cis-3-hidroxiprolina, trans-3-hidroxiprolina, β-ciclohexilalanina, 3,4-cis-metanoprolina, 3,4-deshidroprolina, preferiblemente D-arginina, δ-hidroxisina, homoarginina, ácido 2,4-diaminobutírico, β-homoarginina, ε-N-metil lisina, alo-hidroxisina, ácido 2,3-diaminopropionico, homoprolina, pseudoprolina, así como arginina, ácido 2,2'-diaminopimélico, lisina, ornitina, metilarginina (preferiblemente alfa-N-metilarginina), nitroarginina (preferiblemente N(G)-Nitroarginina), nitrosoarginina (preferiblemente N(G)-Nitrosoarginina), arginal, ácido guanidinopropiónico, dimetilarginina simétrica, dimetilarginina asimétrica, ácido 2,6-diaminohexanoico, histidina, 1-metil-histidina, 3-metil-histidina, o 3-amino-tirosina.

20 X<sub>7</sub> se selecciona entre prolina o derivados de prolina, un radical polar (tal como serina) o un radical hidrófobo. Los residuos X<sub>7</sub> preferidos se seleccionan entre los grupos que incluyen prolina, cis-4-hidroxiprolina, trans-4-hidroxiprolina, cis-3-hidroxiprolina, trans-3-hidroxiprolina, β-ciclohexilalanina, 3,4-cis-metanoprolina, 3,4-deshidroprolina, homoprolina o pseudoprolina, serina, treonina, δ-hidroxisina, citrulina, homoserina, o alo-treonina, así como fenilalanina, N-metil-leucina, leucina, isoleucina, valina, metionina, *terc*-butil-glicina, ciclohexilalanina, alanina, β-alanina, ácido 1-amino-ciclohexilcarbónico, N-metil-isoleucina, norleucina, norvalina, N-metilvalina, o una secuencia de péptido corta, preferiblemente con uno a 3 residuos, seleccionados preferiblemente entre prolina, isoleucina o cualquiera de los radicales anteriormente mencionados, o un conector ramificado que contiene varias unidades peptídicas, tales como lisina, hidroxisina, ornitina, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 2,3-diaminopropiónico, ácido 2,2'-diaminopimélico, desmosina, isodesmosina.

El aminoácido C-terminal es por ejemplo la última prolina (P) en la Fórmula 1, X<sub>6</sub> (en la Fórmula 3) o X<sub>7</sub> (en las Fórmulas 2 y 4).

30 Las secuencias naturales con la apidaecina 1a y 1b no modificadas de acuerdo con el SEQ ID NO: 1 (GNNRPVYIPQPRPPHPRI-OH) y el SEQ ID NO: 2 (GNNRPVYIPQPRPPHPRL-OH) en las que OH representa un grupo carboxilo libre en el extremo C-terminal (Sub<sub>1</sub> = NH<sub>2</sub> y Sub<sub>2</sub> = RI-OH o RL-OH, R<sub>3</sub> = OH), están excluidas del alcance de la invención.

35 Los péptidos descritos en este documento poseen al menos una de las siguientes ventajas en comparación con los péptidos naturales de apidaecina de origen natural:

- (i) un aumento de la vida media en suero de mamífero debido a una mayor resistencia a la proteasa y
- (ii) un aumento de la actividad antimicrobiana frente a una o varias cepas de bacterias, patógenos, especialmente humanos, u hongos u otras infecciones microbianas y
- (iii) los péptidos no son tóxicos para las células humanas incluyendo los eritrocitos.

40 Los ejemplos de los péptidos tienen las secuencias de acuerdo con los SEQ ID NO: 88, 120, 125, 128, 134, 137, 146, 147, 151, 155, 156, 157, y 158. (Véase también la Tabla 2 en el Ejemplo 1).

45 Los péptidos y/o constructos de péptidos multiméricos descritos en la presente memoria, que están modificados para mejorar la actividad antimicrobiana o antifúngica y para ampliar el espectro de actividad a otras bacterias u hongos y para mejorar la estabilidad frente a proteasas y peptidasas, se caracterizan por una elevada potencia antibacteriana y/o antifúngica y una buena estabilidad metabólica en el suero de mamíferos.

Las modificaciones apropiadas en las posiciones 3 (X<sub>2</sub>), 4 (X<sub>3</sub>), y 10 (X<sub>4</sub>) mejoran la actividad antibacteriana de la secuencia de apidaecina de tipo salvaje frente a diferentes bacterias, como se comenta a continuación y se muestra en los ejemplos.

50 Se supone que las primeras posiciones (Sub<sub>1</sub>, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub>) son responsables de un mejor transporte a través de la membrana al interior de la célula mientras que la posición 10 (X<sub>4</sub>) también puede contribuir a la inhibición de una diana intracelular. Por otra parte, el residuo X<sub>2</sub> puede estabilizar aún más la secuencia del péptido N-terminal frente a la degradación y por lo tanto aumentar la vida media en el suero.

Los ejemplos preferidos de acuerdo con la invención son las secuencias con un residuo cargado positivamente  $X_4$  (posición 10), al igual que las secuencias seleccionadas entre las secuencias de acuerdo con los SEQ ID NO: 88, 125, 128, 134, 137, 146, 147, 151 y 155 a 158. Menos preferidas son las secuencias con una glutamina (Q) en  $X_4$  (posición 10).

- 5 Los ejemplos preferidos de acuerdo con la invención son las secuencias con residuos de carga positiva como  $X_3$  (posición 4), al igual que las secuencias seleccionadas entre las secuencias de acuerdo con los SEQ ID NO: 125, 128, 134, 137, y 155.

Por otra parte, el grupo amino N-terminal y el grupo carboxilo C-terminal libres se modifican preferiblemente, ya que estos extremos son propensos a la degradación por peptidasa y proteasa en el suero, fluidos corporales en general, tejidos, órganos o células, y parecen ser muy críticos para la actividad antibiótica de los péptidos, derivados de péptidos y multímeros de los mismos. El aumento de la resistencia a la proteasa incrementa la vida media del péptido en el suero. Además, la modificación de los extremos también permite el acoplamiento del péptido a otros radicales, tales como otras secuencias de aminoácidos (creando posiblemente de ese modo péptidos o proteínas multiméricos), u otras biomoléculas que pueden funcionar como portador o marca. En una realización específica la molécula portadora también funciona como una molécula de redireccionamiento, que es capaz de localizar la infección bacteriana y se puede unir a la bacteria, con el fin de llevar el compuesto antibiótico a las proximidades de la célula (bacteriana) para atacarla o incluso transportarla a través de la membrana bacteriana al interior de la célula bacteriana. Tales radicales de redireccionamiento pueden ser moléculas que se sabe que se unen a moléculas de lipopolisacárido (LPS), que forman la parte exterior de las bacterias Gram-negativas. Los compuestos conocidos para este uso son, por ejemplo, péptidos de anclaje, tales como el motivo AcmA de *Lactobacillus*, o anticuerpos dirigidos a lipopolisacáridos. Se prefiere esto último ya que también tienen un efecto antibiótico intrínseco y por lo tanto podrían usarse para potenciar la acción del péptido de la invención.

Como aminoácido N-terminal, que es  $\text{Sub}_1\text{-X}_1$ , resulta muy ventajoso tener un radical que tenga una carga positiva bajo circunstancias fisiológicas, es decir, en el organismo (humano). Las circunstancias fisiológicas, por lo tanto, significan un pH de aproximadamente 6-8 y una temperatura de aproximadamente 30-40°C. Es muy probable que esta carga positiva, en  $\text{Sub}_1$  o en  $X_1$  en el péptido sea necesaria para la función antibacteriana.

La estabilización N-terminal frente a la escisión proteolítica se logra por guanidinación (siendo preferiblemente  $\text{Sub}_1 = \text{N}(\text{CH}_3)_2\text{-C-N}^+(\text{CH}_3)_2\text{-NH-}$ ), que introduce al mismo tiempo un grupo cargado positivamente en la posición 1.

- 30 Los ejemplos más preferidos de acuerdo con la invención son las secuencias con residuos de carga positiva como  $X_1$  y  $X_4$  (posición 1 y 10), al igual que las secuencias seleccionadas entre las secuencias de acuerdo con los SEQ ID NO: 88, 125, 128, 134 y 137.

Otros ejemplos preferidos son las secuencias con prolina, un derivado de prolina o un residuo cargado positivamente como  $X_6$  (posición 17), al igual que las secuencias seleccionadas entre las secuencias de acuerdo con los SEQ ID NO: 128, 134, 146, 151 y 155 al 158.

- 35 Otros ejemplos preferidos son las secuencias con prolina, un derivado de prolina, un radical polar o un radical hidrófobo como  $X_7$  (posición 18).

Los ejemplos muy preferidos son péptidos con un aminoácido con carga positiva en la posición 1 ( $X_1$ ) o 10 ( $X_4$ ) (como ornitina, arginina o lisina) y un extremo C-terminal modificado, en particular, los péptidos de acuerdo con los SEQ ID NO: 134 y 137.

- 40 Los péptidos más preferidos contienen ornitina en la posición 1 (residuos  $X_1$ ), arginina en la posición 10 (residuos  $X_4$ ), prolina o hidroxiprolina en la posición 11 (residuo  $X_5$ ), arginina o un derivado de la misma (como ornitina, homoarginina) en posición 17 (residuo  $X_6$  en  $\text{Sub}_2$ ) y un extremo N con guanidina añadida, tales como los SEQ ID NO: 88, 134 y 137.

45 A partir de los ejemplos se puede observar que ya una pequeña modificación del extremo C en una amida ( $\text{Sub}_2 = \text{-NH}_2$ ) mejora el efecto inhibitorio contra *E. coli* y *S. typhi* significativamente. La secuencia preferida con una amida como extremo C es el SEC ID NO: 134.

También se prefieren modificaciones, tales como metilo, propilo, amida y prolina, en la posición o posiciones 17 ( $X_6$ ) y/o 18 ( $X_7$ ) y/o el extremo C ( $\text{Sub}_2$ ) para reducir la degradación C-terminal. A partir de los resultados experimentales se puede deducir que al parecer los aminoácidos en las posiciones 17 y 18 también son muy críticos para la acción antibiótica, ya que el reemplazo de un solo aminoácido en estas posiciones por alanina suprimió la eficacia con respecto a la actividad antibiótica de la apidaecina de tipo salvaje.

50 Los ejemplos más preferidos son péptidos, que cumplen todas las ventajas:

- (i) un aumento de la vida media en suero de mamífero debido a una mayor resistencia a la proteasa y
- (ii) un aumento de la actividad antimicrobiana frente a una o varias cepas de bacterias, especialmente

patógenos de humanos, u hongos u otras infecciones microbianas y

(iii) los péptidos no son tóxicos para las células humanas incluyendo eritrocitos.

La acción de los péptidos antimicrobianos es muy compleja, ya que tienen que atravesar la membrana de la célula bacteriana y entrar en el citoplasma para inhibir específicamente una diana bacteriana intracelular sin ser tóxicos para las células de mamífero y las células de la sangre. Otro punto importante a tratar es la estabilidad de los péptidos o derivados de péptidos frente a la degradación por peptidasas o proteasas. Así, el péptido ideal tiene una alta actividad antibacteriana (bajos valores de CIM), sin toxicidad celular, sin actividad hemolítica, y una vida media en sangre de varias horas. Con respecto a las secuencias de apidaecina nativa, los mejores derivados peptídicos descritos en esta invención tienen un aumento de la actividad antimicrobiana de más de diez veces. Esto se logró en parte por la amidación del extremo C y la sustitución de la Gln en posición 10 (X<sub>4</sub>) por un residuo alcalino, más favorablemente arginina u ornitina. Como la vida media de estos péptidos es relativamente corta en el suero, el extremo N es modificado (por guanidación) para reducir la degradación por aminopeptidasas o aminoproteasas. En el extremo N-terminal se prefiere una carga positiva a fin de lograr una buena actividad antibacteriana. La glicina de la posición 1 (X<sub>1</sub>) de la secuencia de apidaecina nativa se sustituye preferiblemente por un residuo alcalino como arginina, lisina u ornitina, más favorablemente por ornitina, ya que su enlace peptídico C-terminal no es escindido por la tripsina y enzimas relacionadas. Por la misma razón la Arg-17 (X<sub>6</sub>) de la secuencia nativa de apidaecina se sustituye preferiblemente para reducir la escisión del enlace peptídico entre Arg-17 (X<sub>6</sub>) y Leu/Ile-18 (X<sub>7</sub>) por las endoproteasas. Los ejemplos son la sustitución de Arg-17 (X<sub>6</sub>) por ornitina o la N-metilación de Leu-18 (X<sub>7</sub>) que incrementan ambas la estabilidad en suero más de 24 veces desde una vida media de 15 minutos a más de 360 min. Aunque ninguno de los péptidos es tóxico para las líneas celulares COS-7 o los glóbulos rojos de la sangre, la sustitución de Pro-11 (X<sub>5</sub>) por trans-4-Hyp tiene el potencial de reducir aún más los posibles efectos secundarios, ya que las sustituciones polares reducen la tendencia de los péptidos o derivados de péptidos a unirse a las membranas de células de mamíferos sin una reducción de la actividad antibacteriana.

Ventajosamente, los péptidos descritos en la presente memoria no inducen resistencia o inducen menos resistencia que los péptidos de tipo salvaje.

Ventajosamente, numerosos péptidos descritos en la presente memoria muestran un espectro mayor de actividad antimicrobiana, que muestra actividad contra bacterias tales como *Bacillus Subtilis* y *Mycobacterium vaccae*, que no se observa para los péptidos de apidaecina de tipo salvaje nativos. La característica común de estas secuencias con actividad contra *B. subtilis* es un extremo N cargado positivamente. La característica común de estas secuencias con actividad contra *M. vaccae* es un extremo N cargado positivamente, un residuo cargado (preferiblemente arginina u ornitina) como X<sub>4</sub> (posición 10) y un residuo cargado (preferiblemente ornitina) como X<sub>1</sub> (posición 1). Un ejemplo de estas secuencias preferidas es el SEC ID NO: 155.

El término "péptido" según se utiliza en la presente memoria significa una secuencia de aminoácidos unidos por un enlace peptídico, en la que los aminoácidos son preferiblemente uno de los veinte aminoácidos constructores de péptidos de origen natural y en la que los aminoácidos pueden estar en la configuración L o en la configuración D, o, para isoleucina y treonina en la configuración D-alo (inversión solo en uno de los centros quirales).

También están incluidos los radicales que pueden formar un enlace covalente tanto con el grupo COOH del residuo aminoácido precedente como con el grupo NH<sub>2</sub> del siguiente residuo de aminoácido, y que por lo tanto no necesariamente tienen que mantener la estructura del esqueleto del péptido, tales como los isómeros dipeptídicos de aminoácidos azucarados, azapeptidos, 6-homopolímeros, γ-péptidos, análogos γ-lactámicos, oligo(fenilenoetileno), sulfonopéptidos vinílicos, glicinas, glicinas poli-N-sustituidas, u oligocarbamatos. Estas modificaciones se prefieren en las posiciones propensas a la degradación enzimática, especialmente en los tres residuos N-terminales (posiciones 1 a 3 - X<sub>1</sub>-N-X<sub>2</sub>) y los dos residuos C-terminales (después de la posición 16 - X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>). Por lo tanto, preferiblemente al menos uno de los enlaces entre X<sub>1</sub>-N (p. ej., Gly-Asn), N-X<sub>2</sub> (p. ej., Asn-Asn), X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub> (p. ej., Asn-Arg), X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub> (p. ej., Arg-Leu o Arg-Ile) es un enlace no escindible.

Este enlace no escindible se define como un enlace que no es susceptible de escisión por proteasas y se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en un enlace amida reducido, un enlace amida alquilado, o un enlace tioamida. Un enlace amida reducido es un enlace peptídico, en el que el radical carbonilo (C=O) o se reduce a un radical hidroxilo (HCOH) o a un radical metileno (CH<sub>2</sub>). Un enlace amida alquilado es un enlace peptídico en el que o bien el nitrógeno (N-alfa) o bien el carbono (C-alfa) está sustituido con alquilo, preferiblemente con 1 a 3 átomos de C, siendo un ejemplo preferido N-metilación.

Los péptidos como los descritos en la presente memoria pueden ser lineales, es decir, en los que el primer y el último aminoácidos de la secuencia están modificados por Sub<sub>1</sub> y Sub<sub>2</sub>, o tienen un grupo COOH libre, respectivamente, o pueden ser cíclicos, es decir, cuando el primer y el último aminoácidos están acoplados por medio de un enlace peptídico o un conector.

Otros objetos de la invención son los métodos para producir los nuevos compuestos antibióticos mencionados anteriormente.

Los péptidos descritos en la presente memoria pueden ser producidos sintéticamente o, cuando sea aplicable, de

manera recombinante mediante métodos convencionales. Las realizaciones específicas de los péptidos o derivados de péptidos antibióticos derivados de apidaecina se describen en detalle en la parte experimental a continuación. Preferiblemente, los péptidos o derivados de péptidos de la invención se preparan convencionalmente mediante técnicas de síntesis química conocidas, tales como, por ejemplo, las descritas por Merrifield [23].

5 Alternativamente, los péptidos pueden ser producidos por medio de técnicas de ADN recombinante por clonación y expresión en un microorganismo anfitrión o célula de un fragmento de ADN que porta una secuencia de ácido nucleico que codifica uno de los péptidos descritos anteriormente. Las secuencias codificantes de ácido nucleico pueden prepararse sintéticamente [24], o pueden derivar de secuencias de ácidos nucleicos existentes (p. ej., la secuencia codificante de apidaecina de tipo salvaje) mediante mutagénesis dirigida al sitio. Las secuencias codificantes así preparadas pueden ser amplificadas a partir de ARN (o ADN) usando cebadores diseñados en consecuencia en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por medio de técnicas conocidas. Después de la purificación por electroforesis en gel de agarosa por ejemplo, el producto de la PCR se liga en un vector, y en una célula anfitriona transformada finalmente con el plásmido recombinante apropiado. Varias células anfitrionas son bien conocidas en la tecnología recombinante, tales como *E. coli*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptomyces*, células de mamífero (p. ej., Células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS-1), levaduras (p. ej., *Saccharomyces*, *Schizosphaeria*), células de insecto o sistemas de expresión virales (p. ej., sistemas de baculovirus). La selección de otras células anfitrionas adecuadas y de los métodos para la transformación, el cultivo, la amplificación, el escrutinio, la producción y la purificación del producto se puede realizar por un experto en la técnica haciendo referencia a las técnicas conocidas [25]. Cuando se producen mediante medios recombinantes convencionales, los péptidos de esta invención se pueden aislar o bien a partir de la célula anfitriona mediante técnicas de lisis convencionales, o bien a partir del medio celular mediante métodos convencionales, tales como cromatografía líquida, preferiblemente cromatografía de afinidad. El péptido antimicrobiano puede ser expresado como un solo péptido, o un oligómero de varias secuencias de péptidos combinadas ya sea N- o C-terminalmente, o incluso una etiqueta N- o C-terminal para permitir la fácil purificación del péptido recombinante o de los constructos de proteínas. Se pueden emplear adicionalmente técnicas de biología molecular convencionales y de mutagénesis dirigida al sitio, para modificar las secuencias y proporcionar secuencias deseadas de péptidos no nativos. Todas estas técnicas recombinantes son conocidas por el experto en la técnica y se ha informado de muchos péptidos antimicrobianos incluyendo apidaecina [26], perinerina [27], y defensina [28].

También es posible incluir aminoácidos de origen no natural en los péptidos por medio de técnicas de ingeniería genética. Esto ha sido descrito exhaustivamente por Noren et al. y Ellman et al. [29,30].

Con posterioridad, el péptido se puede aislar a partir del cultivo de las células anfitrionas o de sistema de traducción in vitro. Esto se puede lograr mediante mecanismos de purificación y aislamiento comunes de proteínas que constituyen el estado de la técnica. Dichos mecanismos pueden implicar, por ejemplo inmunoadsorción o cromatografía. También es posible proporcionar a los péptidos una etiqueta (tal como una etiqueta de histidina) durante la síntesis, lo que permite una rápida unión y purificación, después de lo cual la etiqueta se retira enzimáticamente para obtener el péptido activo.

Si el propio péptido no puede ser codificado o expresado, pero es muy similar a un péptido que puede ser codificado o expresado, puede aplicarse el método para preparar el péptido al cual es similar el péptido, seguido de una o más etapas en las que dicho péptido es modificado mediante técnicas químicas o enzimáticas para preparar el péptido o peptidomimético finales. Algunos resúmenes más exhaustivos de los métodos que pueden ser aplicados en la preparación de los péptidos se describen en la bibliografía [31,32, 33,34,35].

Los péptidos descritos en la presente memoria se pueden usar solos, o combinados, o en forma de multímeros o en forma de multímeros ramificados. Las combinaciones adecuadas de péptidos comprenden concatámeros de los péptidos descritos en la presente memoria acoplados en serie entre sí a través de espaciadores, por ejemplo, en forma de un dímero peptídico, un trímero peptídico, etc., en donde los péptidos individuales se alinean con posterioridad. Este multímero puede estar compuesto por péptidos con secuencias idénticas o por varias de las secuencias de acuerdo con la fórmula 1.

Un único péptido puede estar acoplado a una proteína biocompatible, tal como albúmina de suero humano, un anticuerpo humanizado, liposomas, micelas, polímeros sintéticos, nanopartículas y fagos. Alternativamente, los multímeros de péptidos combinados individualmente se preparan en forma de dendrímeros, o agrupaciones, en donde tres o más péptidos están conectados a un centro común.

En una realización, múltiples péptidos de fórmula 1 descritos anteriormente se organizan en constructos o composiciones multiméricos. Por ejemplo, los aminoácidos opcionales (p. ej.,-Gly-Ser-) u otros espaciadores de aminoácidos o compuestos químicos se incluyen en los extremos N- o C-terminales de los péptidos con el propósito de conectar dos o más péptidos entre sí o a un portador. Esta composición puede tomar la forma de uno o más de los péptidos descritos anteriormente expresados como un péptido sintético acoplado a una proteína portadora. Alternativamente, una composición contiene múltiples péptidos, cada uno expresado como un péptido antigénico múltiple, opcionalmente acoplado a una proteína portadora. Alternativamente, los péptidos seleccionados están conectados sucesivamente y se expresan como una proteína o polipéptido producidos de forma recombinante. Como una realización, se conectan sucesivamente múltiples péptidos, con o sin aminoácidos espaciadores entre



ellos, para formar una proteína recombinante más grande. Alternativamente, la proteína recombinante se puede fusionar en marco con una proteína portadora.

En otra realización, el constructo multimérico contiene al menos dos de los péptidos definidos anteriormente (que pueden ser los mismos o diferentes péptidos de fórmula 1), un péptido está unido a cualquier aminoácido del otro péptido o de los otros péptidos. Cualquier número de péptidos adicionales puede estar anclado a cualquier aminoácido de los otros péptidos de la composición. En otra realización de una composición multimérica que contiene al menos dos péptidos, los segundos péptidos o péptidos adicionales están anclados a un constructo ramificado de los otros péptidos de la composición. Alternativamente, cada péptido adicional está conectado covalentemente al Sub<sub>1</sub> o Sub<sub>2</sub> de otro péptido de la composición.

En otra realización de un constructo o composición multiméricos que contiene al menos dos de los péptidos, por lo menos uno o más de los péptidos están unidos a un portador. En otra realización, uno o más de dichos péptidos son péptidos sintéticos fusionados a una proteína portadora. También alternativamente muchos de los péptidos descritos anteriormente con o sin secuencias flanqueantes, pueden combinarse sucesivamente en un polipéptido. Los péptidos o este polipéptido o bien están acoplados al mismo portador, o bien se pueden acoplar individualmente diferentes péptidos como péptidos a las mismas o diferentes proteínas portadoras inmunológicamente inertes.

Los portadores adecuados pueden mejorar la estabilidad o la liberación, mejorar la producción, o cambiar el espectro de actividad del péptido. Los ejemplos de portadores son la albúmina humana, el polietilenglicol, otros biopolímeros u otros polímeros de origen natural o no natural. En una realización, el radical es deseablemente una proteína u otra molécula que puede mejorar la estabilidad del péptido. Un experto en la técnica puede seleccionar fácilmente un radical de conjugación adecuado.

Los ejemplos de una composición multimérica tienen la estructura (Ac-OrnAsnAsnArgProValTyrIleProArgProArgProProHisProArgLeu)<sub>2</sub>-Dab y (OrnAsnAsnArgProValTyrIleProArgProArgProProHisProArgLeu)<sub>2</sub>-Dab correspondiente a los SEC ID NO: 83 y 119.

Otros dímeros preferidos se seleccionan entre:

| SEC ID NO: | Secuencia/estructura                        |
|------------|---|
| 125        | (Guan-ONNRPVYIPRPRPPHRL) <sub>2</sub> -Dab  |
| 128        | (Guan-ONNRPVYIPRPRPPHPOL) <sub>2</sub> -Dab |
| 130        | (Guan-GNNRPVYIPQRPPHRL) <sub>2</sub> -Dab   |

En otra realización más, los péptidos están en forma de un péptido antigénico múltiple ("MAP"), que puede estar diseñado, p. ej., de acuerdo con el "sistema MAP" como describen Tam et al. [36]. Este sistema hace uso de una matriz central de residuos de lisina en la que se sintetizan múltiples copias del mismo péptido de la invención como se ha descrito [véase, p. ej., 37]. Cada MAP contiene múltiples copias de uno o más de los péptidos de esta invención. Una realización de un MAP contiene al menos tres, y preferiblemente cuatro o más péptidos. Un experto en la técnica puede elaborar fácilmente cualquier número de constructos multiméricos a partir de los péptidos de la fórmula identificada anteriormente recurriendo solamente a habilidades y conocimientos convencionales a la luz de esta memoria descriptiva. Se pretende que todas estas composiciones y constructos multiméricos estén incluidos en esta invención.

Sin embargo, otras combinaciones en forma de multímeros están formadas por cuentas sobre la superficie de las cuales están expuestos los péptidos o peptidomiméticos de la invención. La cuenta puede en ese caso funcionar como un portador para el péptido o peptidomimético, y puede funcionar de manera similar a la de una marca detectable. Los multímeros pueden ser preparados, por ejemplo, mediante biotilación del extremo N de las cadenas del péptido o peptidomimético y la subsiguiente formación de complejos con estreptavidina. Como la estreptavidina es capaz de unirse a cuatro moléculas o productos conjugados de biotina con alta afinidad, se pueden formar complejos peptídicos tetraméricos muy estables por este método. Los multímeros pueden estar compuestos de péptidos o peptidomiméticos idénticos o diferentes de acuerdo con la invención. Preferiblemente, sin embargo, los multímeros de la invención se componen de dos o más péptidos o peptidomiméticos, en los que cada componente constituye un factor positivo de la actividad biocida total (redireccionamiento, actividad antimicrobiana, captación).

Otro objetivo de la invención es el uso de los péptidos de la invención en medicina o farmacia, p. ej., para la terapia con antibióticos o en una composición antimicrobiana (en particular bactericida).

Un objeto adicional son las composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los péptidos o constructos multiméricos, ya sea en presencia o no de otros compuestos farmacéuticamente activos.

También es parte de la invención el uso de un péptido de acuerdo con la invención como un producto farmacéutico y/o para la preparación de un fármaco que puede ser usado como un antibiótico.

Los péptidos se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de forma individual. Alternativamente, con el propósito de mejorar la farmacocinética o la biodisponibilidad sin provocar respuestas inmunitarias, se fusionan o se conjugan uno o más péptidos con otros radicales como se describe anteriormente. Cualquier número de péptidos individuales o constructos multiméricos pueden mezclarse entre sí para formar una única composición.

5 Una composición farmacéutica de la invención comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más péptidos tal como se describe en la presente memoria. Una vez formuladas, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar directamente al sujeto en un método de tratamiento de una infección microbiana (bacteriana, en particular), que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición.

10 Las composiciones descritas en la presente memoria están diseñadas para tratar las infecciones por la bacteria u hongo seleccionados de un mamífero infectado, p. ej., un ser humano. Al menos uno, o alternativamente, varios de los péptidos o constructos multiméricos descritos en la presente memoria se pueden formular en una composición antimicrobiana (en particular anti-bacteriana o anti-fúngica) con un portador farmacéuticamente aceptable y otros componentes opcionales. Para el uso en tales composiciones, el péptido seleccionado puede ser producido preferiblemente sintéticamente, pero también recombinantemente, como se describe anteriormente.

La liberación directa de las composiciones generalmente se realizará mediante la aplicación tópica u otras formas de administración, ya sea por vía oral, parenteral, subcutánea, sublingual, intralesional, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, por vía pulmonar, o se libera en el espacio intersticial de un tejido.

20 La composición farmacéutica también puede comprender un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable adecuado y puede estar en forma de una cápsula, comprimido, pastilla, gragea, píldora, gota, supositorio, polvo, aerosol, vacuna, ungüento, pasta, crema, inhalantes, parche, aerosol, y similares. Como portador farmacéuticamente aceptable, se puede utilizar cualquier disolvente, diluyente u otro vehículo líquido, coadyuvante de dispersión o suspensión, agente tensioactivo, agente isotónico, agente espesante o emulsionante, conservante, agente de encapsulación, aglutinante sólido o lubricante que sea el más adecuado para una determinada forma de dosificación y que sea compatible con el péptido, los peptidomiméticos (derivado de péptido), producto conjugado de péptido o producto conjugado de peptidomimético.

25 La composición farmacéutica contiene por lo tanto preferiblemente un portador farmacéuticamente aceptable. El término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye también un portador para la administración de un agente terapéutico, tal como anticuerpos o un polipéptido, genes, y otros agentes terapéuticos. El término hace referencia a cualquier portador farmacéutico que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición, y que se pueda administrar sin toxicidad indebida. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados pueden ser macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, y partículas de virus inactivos. Tales portadores son bien conocidos por los expertos normales en la técnica.

35 Las sales de péptidos o los equivalentes funcionales se preparan por medio de métodos conocidos, que implican típicamente la mezcla del péptido o peptidomimético o el producto conjugado de péptido o el producto conjugado de peptidomimético con un ácido farmacéuticamente aceptable para formar una sal de adición de ácido, o con un álcali farmacéuticamente aceptable para formar una sal de adición de álcali. Que un ácido o una base sea farmacéuticamente aceptable puede ser fácilmente decidido por un experto en la técnica después de considerar el uso específico previsto del compuesto. Por ejemplo, no todos los ácidos y álcalis que son aceptables para aplicaciones ex vivo se pueden utilizar para composiciones terapéuticas. Dependiendo del uso pretendido, los ácidos farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos orgánicos e inorgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido maleico, ácido malónico, ácido cinámico, sulfúrico ácido, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fosfórico, y ácido tiociánico, que forman sales de amonio con grupos amino libres de péptidos y equivalentes funcionales. Los álcalis farmacéuticamente aceptables, que forman sales carboxilato con grupos carboxílicos libres de péptidos y equivalentes funcionales, incluyen etilamina, metilamina, dimetilamina, trietilamina, isopropilamina, diisopropilamina y otras mono-, di- y tri-alkilaminas, así como arilaminas. Por otra parte, también se incluyen los solvatos farmacéuticamente aceptables.

Se pueden utilizar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como hidrocloruros, hidrobromuros, fosfatos, sulfatos, y similares; y sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similares. Una discusión a fondo sobre los receptores farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N. J., 1991).

55 Los portadores farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden contener líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes en tales vehículos sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH, y similares. Típicamente, las composiciones terapéuticas se preparan en forma de inyectables, ya sea como disoluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la disolución, o suspensión, en

vehículos líquidos antes de la inyección. Los liposomas se incluyen dentro de la definición de portador farmacéuticamente aceptable.

Para el tratamiento terapéutico se pueden producir péptidos, derivados de péptidos, productos conjugados de péptidos o productos conjugados de derivados de péptidos como se describió anteriormente y aplicarlos al sujeto que lo necesite. El péptido, derivado de péptido, producto conjugado de péptido, o producto conjugado de derivado de péptido se pueden administrar a un sujeto por cualquier ruta adecuada, preferiblemente en forma de una composición farmacéutica adaptada a tal ruta, y en una dosis que es eficaz para el tratamiento pretendido.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden contener otros agentes activos, tales como los antibióticos convencionales (como p. ej., vancomicina, estreptomina, tetraciclina, penicilina) u otros compuestos antimicrobianos, tales como antifúngicos, p. ej., itraconazol o miconazol. También se pueden añadir compuestos que alivian otros síntomas de infección, tales como fiebre (p. ej., ácido salicílico), o erupciones en la piel.

Junto al uso terapéutico para el tratamiento de infecciones, también en la guerra biológica, es posible asimismo utilizar los péptidos descritos en la presente memoria en un agente de desinfección o limpieza (p. ej., una composición bactericida), que puede ser utilizada para desinfectar o limpiar superficies y/o equipamiento. Otro campo de aplicación es en el embalaje, en donde los péptidos se pueden vincular a o embeber en material de envasado o como un agente para la conservación de otro material que es fácilmente degradable por los microorganismos. Los péptidos son específicamente utilizables para el envasado de alimentos, ya que no son tóxicos al entrar en contacto o después de la ingestión.

Otra parte de la invención proporciona un método de tratamiento de una infección microbiana (en particular, bacteriana o fúngica) en mamíferos, que comprende administrar a un mamífero que tiene dicha infección una cantidad antimicrobiana eficaz de una composición farmacéutica descrita en la presente memoria.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a una cantidad de un agente terapéutico, que es un péptido, peptidomimético, producto conjugado de péptido o producto conjugado de peptidomimético de acuerdo con la presente invención, para reducir o prevenir el crecimiento y colonización de bacterias, o para mostrar un efecto terapéutico o profiláctico detectable. El efecto puede detectarse, por ejemplo, por medio del cultivo de biopsias y el análisis de la actividad bacteriana o por cualquier otro método adecuado para evaluar el progreso o la gravedad de la infección bacteriana. La cantidad eficaz precisa para un sujeto dependerá del tamaño y estado de salud del sujeto, de la naturaleza y el grado de la afección, y del agente terapéutico o combinación de agentes terapéuticos seleccionados para la administración. Específicamente, las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para reducir o prevenir la infección bacteriana y/o las manifestaciones biológicas o físicas que la acompañan, tales como la reducción de la fiebre. Los métodos que permiten al clínico establecer las dosis iniciales son conocidos en la técnica. Las dosis determinadas que se vayan a administrar deben ser seguras y eficaces.

La cantidad de proteínas, péptidos o secuencias de ácidos nucleicos descrita en la presente memoria presente en cada dosis antibacteriana eficaz se selecciona con respecto a la consideración del patógeno causante de la infección, la gravedad de la infección, la edad, el peso, el sexo, el estado físico general del paciente y similares. La cantidad de componente activo requerida para inducir un efecto anti-bacteriano o anti-fúngico eficaz sin efectos secundarios adversos significativos varía dependiendo de la composición farmacéutica empleada y de la presencia opcional de otros componentes, p. ej., antibióticos, antifúngicos y similares. Para los propósitos de la presente invención, una dosis eficaz será de aproximadamente 0,01 µg/kg a 50 mg/kg, preferiblemente de 0,5 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg del péptido, peptidomimético, producto conjugado de péptido, o producto conjugado de peptidomimético en el individuo al que se administra.

Las dosis iniciales de los péptidos, peptidomiméticos, multímeros, o productos conjugados de péptidos, producto conjugados de peptidomiméticos descritos en la presente memoria están opcionalmente seguidas de una administración repetida. La frecuencia de la dosificación depende de los factores identificados más arriba, y oscila preferiblemente de 1 a 6 dosis por día para una duración de aproximadamente 3 días a un máximo de aproximadamente 1 semana.

Sin embargo, en otra realización alternativa, el péptido o peptidomimético o producto conjugado de péptido o producto conjugado de peptidomimético o composición de la invención se administran a partir de una matriz de liberación controlada o sostenida insertada en el organismo del sujeto.

En una realización, un compuesto descrito en la presente memoria se administra en una forma de dosificación transmucosa. Esta vía de administración es no invasiva y agradable para el paciente y, al mismo tiempo conduce probablemente a una biodisponibilidad mejorada del compuesto en comparación con la administración oral, especialmente si el compuesto no es estable en los fluidos del sistema digestivo, o si es demasiado grande para ser absorbido eficazmente desde el intestino. La administración transmucosa es posible, por ejemplo, a través de formas de dosificación nasales, bucales, sublinguales, gingivales, o vaginales. Estas formas de dosificación se pueden preparar mediante técnicas conocidas; se pueden formular para que representen gotas o pulverizadores nasales,

insertos, películas, parches, geles, pomadas o comprimidos. Preferiblemente, los excipientes usados para una forma de dosificación transmucosa incluyen una o más sustancias que proporcionan mucoadherencia, prolongando de ese modo el tiempo de contacto de la forma de dosificación con el sitio de absorción y por lo tanto aumentando potencialmente el grado de absorción.

- 5 En una realización adicional, los compuestos se administran a través de la ruta pulmonar, usando un inhalador de dosis medidas, un nebulizador, un pulverizador de aerosol, o un inhalador de polvo seco. Las formulaciones adecuadas se pueden preparar por medio de métodos y técnicas conocidos. La administración transdérmica, rectal, u ocular también puede ser factible en algunos casos.

- 10 Puede ser ventajoso el uso de la liberación anticipada de fármacos o de métodos de redireccionamiento para liberar un compuesto de la invención con mayor eficacia. Por ejemplo, si se elige una vía de administración no parenteral, una forma de dosificación apropiada puede contener un agente potenciador de la biodisponibilidad, que puede ser cualquier sustancia o mezcla de sustancias que aumenta la disponibilidad del compuesto. Esto se logra, por ejemplo, por medio de la protección del compuesto de la degradación, tal como mediante un inhibidor enzimático o un antioxidante. Más preferiblemente, el agente potenciador aumenta la biodisponibilidad del compuesto mediante el aumento de la permeabilidad de la barrera de absorción, que es típicamente una mucosa. Los potenciadores de la penetración pueden actuar a través de diversos mecanismos; algunos aumentan la fluidez de las membranas mucosas, mientras que otros abren o ensanchan los espacios intersticiales entre las células de la mucosa. Otros reducen la viscosidad del moco que cubre la capa de células de la mucosa. Entre los potenciadores de la biodisponibilidad preferidos están las sustancias anfífilas tales como derivados de ácido cólico, fosfolípidos, etanol, ácidos grasos, ácido oleico, derivados de ácidos grasos, EDTA, carbómeros, policarbófilo y quitosano.

- 15 Las indicaciones para las cuales se pueden utilizar los péptidos, productos conjugados, o multímeros descritos en la presente memoria son las infecciones bacterianas por bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas, tales como *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Erwinia amylovora*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *Acinetobacter calcoaceticus*,  
25 *Agrobacterium tumefaciens*, *Francisella tularensis*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas syringae*, *Rhizobium meliloti*, *Haemophilus influenzae*.

Otro objeto de la invención es el uso de un péptido o un multímero como se describe en la presente memoria en la investigación biotecnológica o farmacéutica o en un análisis de escrutinio, en particular, para identificar un compuesto, que tiene un potencial efecto bactericida o antifúngico.

- 30 En este sentido, la invención proporciona un método para identificar un compuesto, que tiene un potencial efecto antibacteriano o antifúngico, que comprende:

(i) realizar un análisis competitivo con:

(a) un microorganismo susceptible a un péptido o multímero como se describe en la presente memoria,

(b) un péptido o multímero como se describe en la presente memoria,

- 35 (c) al menos un compuesto que se va a someter a ensayo;

mediante la exposición de (a) a (b) y (c); y

(ii) seleccionar un compuesto de ensayo que desplaza competitivamente la unión del péptido o multímero al microorganismo.

- 40 Este método de escrutinio identifica compuestos de ensayo que compiten con los péptidos, o composiciones multiméricas de esta invención para la unión al receptor desconocido en el patógeno. Por lo tanto pequeñas moléculas que se unen específicamente al mismo sitio elegido como diana por el péptido se pueden identificar de manera efectiva en un escrutinio de alto rendimiento. De este modo, los compuestos de ensayo poseen muy probablemente el mismo modo de acción que la secuencia del péptido original y por lo tanto serán activos también contra los microbios multirresistentes eliminados por la apidaecina o uno de sus análogos descritos en esta  
45 invención.

- Este método de escrutinio se lleva a cabo por medios conocidos, utilizando sin embargo al menos un péptido o derivado de péptido o multímero de acuerdo con la invención. En una realización, el péptido o multímero está marcado con un marcador fluorescente, radiactivo o de otro tipo y la unión del péptido o derivado de péptido o multímero marcado al microorganismo se detecta y se compara en presencia o ausencia de la sustancia o las  
50 sustancias que se van a someter a ensayo.

Preferiblemente, después de eso, los compuestos de ensayo, que compiten con los péptidos o constructos multiméricos por la unión al receptor se identifican y se escrutan para uso antibacteriano o antifúngico.

En una realización, se utiliza el método de complementación bimolecular de fluorescencia (BIFC) en el análisis competitivo. Este método permite la visualización directa de las interacciones de las proteínas intracelulares, que se

ejemplificó para la interacción del dominio SH3 de la c-Abl tirosina quinasa con dianas tanto naturales como diseñadas en *E. coli* [38]. El análisis es lo suficientemente sensible para permitir la detección de las interacciones entre las proteínas que son escasamente expresadas en bacterias. Se basa en la asociación de dos fragmentos de la proteína amarilla fluorescente funcional (YFP) después de que el dominio SH3 se una a su compañero. Una vez que estas dos proteínas se unen entre sí, los dos fragmentos de YFP forman un complejo muy similar a la estructura de la proteína nativa. Esto puede ser controlado por la fluorescencia obtenida del complejo YFP, ya que los fragmentos individuales no muestran ninguna actividad de fluorescencia. Se puede diseñar un constructo similar para el escrutinio de compuestos que compiten con los péptidos y derivados de péptidos descritos en esta invención. Un escrutinio de alto rendimiento puede ser fácilmente adaptado a placas de microtitulación de 386 pocillos por un experto en la técnica.

En otra realización se emplean los péptidos en un método de análisis competitivo adecuado con los compuestos de ensayo para evaluar la capacidad del compuesto de ensayo para desplazar competitivamente el péptido de la unión a su receptor actualmente desconocido en el patógeno. Cuando se desea, y dependiendo del análisis seleccionado, un microorganismo (por ejemplo, bacteria, virus u hongo) al que se sabe que se unen el péptido o los péptidos seleccionados, por ejemplo, cepas de *E. coli* o *K. pneumoniae*, se puede inmovilizar directamente o indirectamente sobre una superficie adecuada, p. ej., en un formato ELISA. Tales superficies de inmovilización son bien conocidas. Por ejemplo, se puede utilizar una cuenta inerte. Adicionalmente, el ligando puede estar unido a una placa de 96 pocillos. Después de eso, se exponen cantidades seleccionadas de los compuestos de ensayo y los péptidos de esta invención al microorganismo inmovilizado y aquellos compuestos de ensayo seleccionados que pueden competir con los péptidos por la unión al microorganismo inmovilizado. Una vez que se identifican los compuestos de ensayo, que compiten con los péptidos por la unión al receptor sobre las bacterias o los hongos, estos se pueden escrutar adicionalmente para determinar las actividades antibacterianas o anti-fúngicas en los métodos descritos en los ejemplos a continuación.

En otro aspecto más, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido o multímero como se describe en la presente memoria. El ácido nucleico codifica el péptido antibacteriano o anti-fúngico o las composiciones multiméricas de la invención en asociación operativa con una secuencia reguladora que dirige la expresión del mismo en una célula anfitriona. En otro aspecto más, la invención proporciona una célula anfitriona transfectada o transformada con la molécula de ácido nucleico descrita anteriormente.

#### 30 Ejemplo 1: Síntesis de péptidos en fase sólida

Todos los péptidos y derivados de péptidos se sintetizaron mediante síntesis peptídica en fase sólida convencional usando la estrategia Fmoc/<sup>t</sup>Bu [39]. Los derivados de aminoácidos fueron de MultiSynTech GmbH (Witten, Alemania). Los péptidos y derivados de péptidos con un extremo C (grupo COOH) libre se sintetizaron sobre resina de Wang con una base de poliestireno (capacidad de carga 1,33 mmoles/g) de Merck Biosciences (Schwalbach, Alemania). Los péptidos y derivados de péptidos con una amida C-terminal (grupo -CONH<sub>2</sub>) fueron sintetizados sobre resina de 4-metilbenzidrilamina con una base de poliestireno (MBHA) (capacidad de carga 0,64 mmoles/g) de Merck Biosciences. Los péptidos y derivados de péptidos se sintetizaron en un sintetizador de péptidos múltiple Syro2000 (MultiSynTech GmbH) utilizando cuatro equivalentes del derivado de aminoácido activado con 2-(1-H-benzotriazol-1-il)tetrametiluronio (HBTU; MultiSynTech GmbH) y N,N'-diisopropiletilamina (DIPEA; (Fluka, Buchs, Suiza) en dimetilformamida (DMF; Biosolve V. B., Valkenswaard, Países Bajos). Los grupos protectores de las cadenas laterales fueron trifenilmetilo (tritilo) para Asn, His, y Gln, éter terc-butílico para Tyr, Ser, y Thr, éster terc-butílico para Asp y Glu, N-omega-2, 2,4,6,8-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo para Arg y βHar, y terc-Butiloxicarbonilo para Lys y Orn. El grupo protector de Fmoc temporal se escindió con piperidina al 40% en DMF (v/v) durante 3 min y de nuevo con piperidina al 40% de nueva aportación en DMF (v/v) durante 10 min.

Los extremos N de los péptidos o derivados de péptidos fueron acetilados con diez equivalentes de ácido acético activado con HBTU y DIPEA en DMF, como se describe anteriormente para los derivados de aminoácidos con Fmoc. La guanidación de los extremos N de los péptidos o derivados de péptidos se realizó con diez equivalentes de HBTU y DIPEA en DMF, como describen Gausepohl et al. [40].

Una vez completada la síntesis de los péptidos o derivados de péptidos, las resinas se lavaron a fondo con DMF y DCM y se secaron al vacío. Los péptidos unidos a la resina se escindieron del soporte sólido y al mismo tiempo se desprotegeron las cadenas laterales con una mezcla de agua al 5%, m-cresol al 4%, tianisol al 5% y etanoditilo al 2% (en vol.) en ácido trifluoroacético (TFA) a temperatura ambiente durante 4 h. Los péptidos o derivados de péptidos se precipitaron con éter dietílico frío y se centrifugaron a 3.000 G. El sedimento se lavó dos veces con éter frío, se secó y se disolvió en TFA acuoso al 0,1% (calidad de espectroscopía UV, Fluka). Las muestras se almacenaron a -20°C.

Los péptidos y derivados de péptidos metilados C-terminalmente, es decir, que contienen un éster metílico (CO-OMe) o propílico (CO-OPr), se sintetizaron en resina AM con ácido 4-hidroximetilbenzoico (resina HMBA-AM, capacidad de carga de 1,1 mmoles/g, Novabiochem, Merck-Biosciences, Darmstadt, Alemania). El primer aminoácido se acopló manualmente a la resina como un anhídrido simétrico utilizando 10 eq. del derivado de aminoácido Fmoc, 5 eq. de diisopropilcarbodiimida (DIC), y 0,1 eq. de N,N-dimetil-4-aminopiridina en DCM. La

- capacidad de carga se determinó en un análisis de fulveno-piperidina escindiendo el grupo Fmoc con piperidina al 50% en DMF durante 1 h, basándose en la absorción registrada a 301 nm [41]. Las capacidades de carga típicas fueron de aproximadamente 0,8 mmoles/g. La síntesis automática se realizó como se ha descrito anteriormente. Una vez completada la síntesis del péptido, la resina HMBA-AM con el péptido se lavó cuidadosamente con DMF y DCM y se secó a vacío. Los grupos protectores de los péptidos unidos a la resina se escindieron con agua al 5%, m-cresol al 4%, tioanisol al 5% y etanoditiol al 2% (en vol.) en ácido trifluoroacético (TFA) a temperatura ambiente durante 4 h. La resina se lavó con TFA y DMF. La resina se embebió en DMF y el péptido o derivado de péptido se escindió de la resina con DIPEA/MeOH/DMF (1:5:5 en volumen; 50 mL de disolución por g de resina) para obtener el éster metílico C-terminal. Para obtener el éster propílico C-terminal, el péptido o derivado de péptido se sintetizaron sobre resina AM con 4-sulfamilbutirilo (capacidad de carga 1,1 mmoles/g, Novabiochem, Merck-Biosciences, Darmstadt, Alemania) y se escindieron con 50 eq. de propilamina en DMF después de la activación con trimetilsilildiazometano en THF. Los disolventes se eliminaron a vacío, los péptidos (o derivados de péptidos) se precipitaron con éter dietílico frío y se centrifugaron a 3.000 G. El sedimento se lavó dos veces con éter frío, se secó y se disolvió en TFA acuoso al 0,1% (calidad espectroscopía de UV, Fluka ). Las muestras se almacenaron a -20°C. Para obtener derivados de péptidos diméricos, se acopló Fmoc<sub>2</sub>-DAB a la resina. Después de la escisión de los grupos protectores Fmoc, se obtuvieron dos extremos N libres y se sintetizaron los derivados de péptidos como se ha descrito anteriormente. Los derivados de péptidos con PEG3000 se sintetizaron mediante la activación de PEG3000-OH con HBTU y DIPEA en DMF y el acoplamiento al extremo N del péptido o derivados de péptido, como se describió anteriormente para los derivados de aminoácidos con Fmoc.
- Los péptidos brutos y derivados de péptidos se purificaron en un Sistema de HPLC Äkta (Amersham Bioscience GmbH, Freiburg, Alemania) utilizando una columna C18 Júpiter (20 mm x 250 mm, Phenomenex Inc., Torrance, EE.UU.). La elución se realizó por medio de un gradiente lineal de acetonitrilo, típicamente partiendo de acetonitrilo acuoso al 5%, con un aumento de acetonitrilo al 1% por minuto en presencia de TFA al 0,1% como reactivo de par iónico. La velocidad de flujo fue de 10 ml/min y los péptidos se detectaron por absorción a 220 nm. La pureza de los péptidos se determinó mediante RP-HPLC analítica usando una columna C18 Júpiter (4,6 mm x 150 mm, Phenomenex Inc., Torrance, EE.UU.) y espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo y desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS; analizador proteómico 4700, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Alemania).

Se sintetizaron los siguientes péptidos representados en la tabla 2:

Tabla 2

| SEC ID NO | Síntesis No. | Nombre              | Secuencia   |
|-----------|--------------|---------------------|---|
| 1         | A24 C3       | Apidaecina 1a ácido | GNNRPVYIPQPRPPHPRI-OH                                 |
| 2         | A24 C4       | Apidaecina 1b ácido | GNNRPVYIPQPRPPHPRL-OH                                 |
| 3         | A17 A3 ac.   | Api 1a Amida ác.    | Ac-GNNRPVYIPQPRPPHPRI-NH <sub>2</sub>                 |
| 4         | A17 A3       | Api 1a Amida        | GNNRPVYIPQPRPPHPRI-NH <sub>2</sub>                    |
| 5         | A17 A6 ac.   | Api 1b Amida ac.    | Ac-GNNRPVYIPQPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                 |
| 6         | A17 A6       | Api 1b Amida        | GNNRPVYIPQPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                    |
| 7         | A18 G5 ac.   | Api 1b O1 ac.       | Ac-ONNRPVYIPQPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                 |
| 8         | A18 G5       | Api 1b O1           | ONNRPVYIPQPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                    |
| 9         | A17 A4       | Api 1a, O10         | GNNRPVYIOPRPPHPRI-NH <sub>2</sub>                     |
| 10        | A21 E5       | Api.1b K4 R10 V19   | GNNKPVYIPRPPHPRLV-OH                                  |
| 11        | A18 B4       | Api 1b O10 Hyp 11   | GNNRPVYIPO-4 <sup>t</sup> Hyp-RPPHPRL-NH <sub>2</sub> |
| 12        | A20 B1       | Api 1b O1 O10       | ONNRPVYIOPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                     |
| 13        | A20 B1 ac.   | Api 1b O1 O10 ac.   | Ac-ONNRPVYIOPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                  |
| 14        | A14 B3       | Api 1a R10          | GNNRPVYIPRPPHPRI-NH <sub>2</sub>                      |
| 15        | A17 B3       | Api 1a R 10 Hyp 11  | GNNRPVYIPR-4 <sup>t</sup> Hyp-RPPHPRI-NH <sub>2</sub> |
| 16        | A17 B5       | Api 1a O1 R10       | ONNRPVYIPRPPHPRI-NH <sub>2</sub>                      |
| 17        | A14 B4       | Api 1a K10          | GNNRPVYIPKPPHPRI-NH <sub>2</sub>                      |
| 18        | A17 B5 ac.   | Api 1a R10 O1 ac.   | Ac-ONNRPVYIPRPPHPRI-NH <sub>2</sub>                   |

## ES 2 429 108 T3

| SEC ID NO | Síntesis No.   | Nombre                  | Secuencia  |
|-----------|----------------|-------------------------|--|
| 19        | A14 D1         | Api 1a, Hyp5            | GNNR-4 <sup>1</sup> Hyp-VYIPQPRPPHPRI-NH <sub>2</sub>    |
| 20        | A17 B2         | Api 1b R10 Hyp11        | GNNRPVYIPR-4 <sup>1</sup> Hyp-RPPHPRL-NH <sub>2</sub>    |
| 21        | A24 C1         | Api 1b K1 K10           | KNNRPVYIPKPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                       |
| 22        | A24 C1 ac.     | Api 1b K1 K10, ac.      | Ac-KNNRPVYIPKPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                    |
| 23        | A21 A5         | Api O1 R10 PIRV         | ONNRPVYIPRPRPPHPRPIRV-OH                                 |
| 24        | A21 A5 ac.     | Api O1 R10, PIRV, ac.   | Ac-ONNRPVYIPRPRPPHPRPIRV-OH                              |
| 25        | A5 A20         | Api 1b V19 R10          | GNNRPVYIPRPRPPHPRLV-NH <sub>2</sub>                      |
| 26        | A14 B5         | Api 1a, L8              | GNNRPVYLPQPRPPHPRI-NH <sub>2</sub>                       |
| 27        | A24 A1         | Api O1 R10 PIRV         | ONNRPVYIPRPRPPHPRPIRV-NH <sub>2</sub>                    |
| 28        | A24 A1 ac.     | Api O1 R10 PIRV ac.     | Ac-ONNRPVYIPRPRPPHPRPIRV-NH <sub>2</sub>                 |
| 29        | A21 B3         | Api 1b O1 V19 ácido     | ONNRPVYIPQPRPPHPRLV-OH                                   |
| 30        | A21 B3 ac.     | Api 1b O1 V19 ácido ac. | Ac-ONNRPVYIPQPRPPHPRLV-OH                                |
| 31        | A21 A6         | Api 1b V19 R10 ácido    | GNNRPVYIPRPRPPHPRLV-OH                                   |
| 32        | A25 D5 Orn ac. | Api MeLeu18 O1 ac.      | Ac-ONNRPVYIPQPRPPHPR-MeLeu-NH <sub>2</sub>               |
| 33        | A25 D5 Gly     | Api MeLeu18             | GNNRPVYIPQPRPPHPR-MeLeu-NH <sub>2</sub>                  |
| 34        | A26 C2         | Api MeLeu18 R10         | GNNRPVYIPRPRPPHPR-MeLeu-NH <sub>2</sub>                  |
| 35        | A26 C5 Orn     | Api Cha18 O10 O1        | ONNRPVYIPOP RPPHPR-Cha-NH <sub>2</sub>                   |
| 36        | A26 C3 Orn ac. | Api MeLeu R10 O1 ac.    | Ac-ONNRPVYIPRPRPPHPR-MeLeu-NH <sub>2</sub>               |
| 37        | A26 C4         | Api Cha18 R10           | GNNRPVYIPRPRPPHPR-Cha-NH <sub>2</sub>                    |
| 38        | A18 G6         | Api 1b O1 R10           | ONNRPVYIPRPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                       |
| 39        | A18 G6 ac.     | Api 1b O1 R10 ac.       | CA-ONNRPVYIPRPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                    |
| 40        | A26 B2 ac.     | Api 1b R10 Hyp11 O1 ac. | Ac-ONNRPVYIPR-4 <sup>1</sup> Hyp-RPPHPRL-NH <sub>2</sub> |
| 41        | A26 ac B4.     | Api F18 O1 ac.          | Ac-ONNRPVYIPQPRPPHPRF-NH <sub>2</sub>                    |
| 42        | A26 B4         | Api F18 O1              | ONNRPVYIPQPRPPHPRF-NH <sub>2</sub>                       |
| 43        | A26 B5         | Api 1b sin R17          | GNNRPVYIPQPRPPHPL-NH <sub>2</sub>                        |
| 44        | A26 B3         | Api F18                 | GNNRPVYIPQPRPPHPRF-NH <sub>2</sub>                       |
| 45        | A26 B2         | Api 1b O1 R10 Hyp11     | ONNRPVYIPR-4 <sup>1</sup> Hyp-RPPHPRL-NH <sub>2</sub>    |
| 46        | A26 C5 Orn ac. | Api Cha18 O10 O1 ac.    | Ac-ONNRPVYIPOP RPPHPR-Cha-NH <sub>2</sub>                |
| 47        | A26 C3 Orn     | Api MeLeu O1 R10        | ONNRPVYIPRPRPPHPR-MeLeu-NH <sub>2</sub>                  |
| 48        | A27 B6 ac.     | Api 1b met. O1 R10 ac.  | Ac-ONNRPVYIPRPRPPHPRL-OMe                                |
| 49        | A27 B5 ac.     | Api. 1b met O1 O10 ac.  | Ac-ONNRPVYIPOP RPPHPR-OMe                                |
| 50        | A27 ac B4.     | Api 1b met O1 ac.       | Ac-ONNRPVYIPQPRPPHPRL-OMe                                |
| 51        | A14 C3         | Api 1a K15              | GNNRPVYIPQPRPPKPRI-NH <sub>2</sub>                       |
| 52        | A14 C4         | Api K15 P18             | GNNRPVYIPQPRPPKPRP-NH <sub>2</sub>                       |
| 53        | A14 C5         | Api R15                 | GNNRPVYIPQPRPPRPRI-NH <sub>2</sub>                       |
| 54        | A14 A5         | Api I18 → PI            | GNNRPVYIPQPRPPHPRI-NH <sub>2</sub>                       |
| 55        | A14 B6         | Api L8, R10             | GNNRPVYLP RPRPPHPRI-NH <sub>2</sub>                      |
| 56        | A14 C1         | Api L8, K10             | GNNRPVYLPKPRPPHPRI-NH <sub>2</sub>                       |

ES 2 429 108 T3

| SEC ID NO | Síntesis No. | Nombre                    | Secuencia  |
|-----------|--------------|---------------------------|--|
| 57        | A14 D2       | Api 1a Hyp9               | GNNRPVYI-4 <sup>t</sup> Hyp-QPRPPHPRI-NH <sub>2</sub>    |
| 58        | A14 D3       | Api 1a Hyp11              | GNNRPVYIPQ-4 <sup>t</sup> Hyp-RPPHPRI-NH <sub>2</sub>    |
| 59        | A14 D4       | Api 1a Hyp13              | GNNRPVYIPQPR-4 <sup>t</sup> Hyp-PHPRI-NH <sub>2</sub>    |
| 60        | A14 D5       | Api 1a Hyp14              | GNNRPVYIPQPRP-4 <sup>t</sup> Hyp-HPRI-NH <sub>2</sub>    |
| 61        | A14 D6       | Api 1a Hyp16              | GNNRPVYIPQPRPPH-4 <sup>t</sup> Hyp-RI-NH <sub>2</sub>    |
| 62        | A18 A1       | Api 1a O1                 | ONNRPVYIPQPRPPHPRI-NH <sub>2</sub>                       |
| 63        | A18 A1 ac.   | Api 1a O1                 | Ac-ONNRPVYIPQPRPPHPRI-NH <sub>2</sub>                    |
| 64        | A18 A2       | Api 1a O1 R10             | ONNRPVYIPRPRPPHPRI-NH <sub>2</sub>                       |
| 65        | A18 A2 ac.   | Api 1a O1 R10 ac.         | Ac-ONNRPVYIPRPRPPHPRI-NH <sub>2</sub>                    |
| 66        | A18 A5       | Api. 1b R10               | GNNRPVYIPRPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                       |
| 67        | A18 A5 ac.   | Api. 1b R10 aceti.        | Ac-GNNRPVYIPRPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                    |
| 68        | A18 B1       | Api 1b K4 R10 V19         | GNNKPVYIPRPRPPHPRLV-NH <sub>2</sub>                      |
| 69        | A20 B4       | Api. 1b V19, R10          | GNNRPVYIPRPRPPHPRLV-OH                                   |
| 70        | A21 A6       | Api. I18 --> PIRV         | GNNRPVYIPQPRPPHPRIPIRV-OH                                |
| 71        | A25 D3 Orn   | Api. O1, Cha18, ac.       | Ac-ONNRPVYIPQPRPPHPR-Cha-NH <sub>2</sub>                 |
| 72        | A25 D4 Orn   | Api O1 D-Leu18 ac.        | Ac-ONNRPVYIPQPRPPHPR-(D-Leu)-NH <sub>2</sub>             |
| 73        | A25 D6 Orn   | Api O1 tercGly18 ac.      | Ac-ONNRPVYIPQPRPPHPR-tertGly-NH <sub>2</sub>             |
| 74        | A25 E1 Orn   | Api O1 βAla18 ac.         | Ac-ONNRPVYIPQPRPPHPR-βAla-NH <sub>2</sub>                |
| 75        | A25 E2 Orn   | Api O1 Chex18 ac.         | Ac-ONNRPVYIPQPRPPHPR-Chex-NH <sub>2</sub>                |
| 76        | A25 D3 Gly   | Api Cha18 ac.             | GNNRPVYIPQPRPPHPR-Cha-NH <sub>2</sub>                    |
| 77        | A25 D4 Gly   | Api D-Leu18 ac.           | GNNRPVYIPQPRPPHPR-(D-Leu)-NH <sub>2</sub>                |
| 78        | A25 D6 Gly   | Api tercGly18 ac.         | GNNRPVYIPQPRPPHPR-tertGly-NH <sub>2</sub>                |
| 79        | A25 E1 Gly   | Api βAla18 ac             | GNNRPVYIPQPRPPHPR-βAla-NH <sub>2</sub>                   |
| 80        | A25 E2 Gly   | Api Chex18 ac.            | GNNRPVYIPQPRPPHPR-Chex-NH <sub>2</sub>                   |
| 81        | A29 C1       | Api 1b O1 R10 O17         | ONNRPVYIPRPRPPHPOL-NH <sub>2</sub>                       |
| 82        | A29 C1 ac.   | Api 1b O1 R10 O17 ac      | Ac-ONNRPVYIPRPRPPHPOL-NH <sub>2</sub>                    |
| 83        | A29 C4 ac.   | Api. 1b O1 R10 Dab-Dímero | (Ac-ONNRPVYIPRPRPPHPRL) <sub>2</sub> -DAB                |
| 84        | A29 C5 FA    | Formil Api 1b             | For-GNNRPVYIPQPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                   |
| 85        | A29 C5 guan  | Api 1b N-guan.            | Guan-GNNRPVYIPQPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                  |
| 86        | A28 A3       | Api O1 R10 PIRV Amida     | ONNRPVYIPRPRPPHPRIPIRV-NH <sub>2</sub>                   |
| 87        | A28 A3 ac.   | Api O1 R10 PIRV Amida ac. | Ac-ONNRPVYIPRPRPPHPRIPIRV-NH <sub>2</sub>                |
| 88        | A30 C1 guan  | Api O1 R10 guan.          | Guan-ONNRPVYIPRPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                  |
| 89        | A17 A5       | Api Cit10                 | GNNRPVYIP-Cit-PRPPHPRI-NH <sub>2</sub>                   |
| 90        | A17 B1       | Api 1a R10 Hyp11          | GNNRPVYIPR-4 <sup>t</sup> Hyp-RPPHPRI-NH <sub>2</sub>    |
| 91        | A17 B4       | Api 1a Cit 10 Hyp11       | GNNRPVYIP-Cit-4 <sup>t</sup> Hyp-RPPHPRI-NH <sub>2</sub> |
| 92        | A17 C1       | Api 1a acortado           | NNRPVYIPQPRPPHPRI-NH <sub>2</sub>                        |
| 93        | A14 C6       | Api P15 P18               | GNNRPVYIPQPRPPPPRP-NH <sub>2</sub>                       |
| 94        | A14 A6       | Api.1a K15 I18 → PI       | GNNRPVYIPQPRPPKPRPI-NH <sub>2</sub>                      |



ES 2 429 108 T3

| SEC ID NO | Síntesis No. | Nombre                       | Secuencia  |
|-----------|--------------|------------------------------|--|
| 95        | A18-A6       | Api 1b K4                    | GNNKPVYIPQPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                       |
| 96        | A18 B2       | Api 1b S3 V19                | GNSRPVYIPQPRPPHPRLV-NH <sub>2</sub>                      |
| 97        | A18 B3       | Api 1b S3 R10 K4             | GNSKPVYIPRPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                       |
| 98        | A18 F4       | Api 1a β-Homoarg10           | GNNRPVYIP-βHar-PRPPHPRI-NH <sub>2</sub>                  |
| 99        | A18 F5       | Api 1b β-Homoarg10           | GNNRPVYIP-βHar-PRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                  |
| 100       | A19 C4       | Api 1b K4 R10                | GNNKPVYIPRPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                       |
| 101       | A19 C5       | Api S3 1b                    | GNSRPVYIPQPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                       |
| 102       | A6 A20       | Api 1b O1 O10 Hyp11          | ONNRPVYIPO-4 <sup>t</sup> Hyp-RPPHPRL-NH <sub>2</sub>    |
| 103       | A20 A6 ac.   | Api 1b O1 O10 Hyp11 ac       | Ac-ONNRPVYIPO-4 <sup>t</sup> Hyp-RPPHPRL-NH <sub>2</sub> |
| 104       | A20 B2       | Api 1b O10 Hyp11             | GNNRPVYIPO-4 <sup>t</sup> Hyp-RPPHPRL-NH <sub>2</sub>    |
| 105       | A20 B3       | Api. 1b O1 Hyp11             | ONNRPVYIPQ-4 <sup>t</sup> Hyp-RPPHPRL-NH <sub>2</sub>    |
| 106       | A20 B3 ac.   | Api 1b O1 Hyp11 ac.          | Ac-ONNRPVYIPQ-4 <sup>t</sup> Hyp-RPPHPRL-NH <sub>2</sub> |
| 107       | A21 E4       | Api V18                      | GNNRPVYIPQPRPPHPRV-NH <sub>2</sub>                       |
| 108       | A21 E6       | Api V18                      | GNNRPVYIPQPRPPHPRV-OH                                    |
| 109       | A24 A2       | Api PIPP Amida               | GNNRPVYIPQPRPPHPRIPIP-NH <sub>2</sub>                    |
| 110       | A24 A3       | Api pIRV Amida               | GNNRPVYIPQPRPPHPRIPIRV-NH <sub>2</sub>                   |
| 111       | A24 B5       | Api 1b, P17 Amida            | GNNRPVYIPQPRPPHPPL-NH <sub>2</sub>                       |
| 112       | A24 B6       | Api 1b O1 O10 P17 Amida      | ONNRPVYIPOP RPPHPPL-NH <sub>2</sub>                      |
| 113       | A24 B6 ac.   | Api 1b O1 O10 P17 amida ac.  | Ac-ONNRPVYIPOP RPPHPPL-NH <sub>2</sub>                   |
| 114       | A24 C2       | Api Y18                      | GNNRPVYIPQPRPPHPRY-NH <sub>2</sub>                       |
| 115       | A24 C5       | Api sin 18                   | GNNRPVYIPQPRPPHPR-NH <sub>2</sub>                        |
| 116       | A27 B1 ac.   | Api O1 ac. I18 met.          | Ac-ONNRPVYIPQPRPPHPRI-OMe                                |
| 117       | A27 B2 ac.   | Api O1 ac. O10 I18 met.      | Ac-ONNRPVYIPOP RPPHPRI-OMe                               |
| 118       | A27 B3 ac.   | Api O1 ac. R10 I18 met.      | Ac-ONNRPVYIPRPRPPHPRI-OMe                                |
| 119       | A29 C4       | Api O1 R10 Api.1b Dab-Dímero | (ONNRPVYIPRPRPPHPRL) <sub>2</sub> -DAB                   |
| 120       | A30 C3 guan. | Api O1 guan.                 | Guan-ONNRPVYIPQPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                  |
| 121       | A30 C6 ac.   | Api 1b β-Homoarg17           | ONNRPVYIPQPRPPHP-βHar-L-NH <sub>2</sub>                  |
| 122       | A32 C1       | Api 1b, R10, Dímero          | (GNNRPVYIPRPRPPHPRL) <sub>2</sub> -DAB                   |
| 123       | A32 C1 guan. | Api 1b, R10 guan, Dímero     | (Guan-GNNRPVYIPRPRPPHPRL) <sub>2</sub> -DAB              |
| 124       | A32 C2 ac.   | Api 1b O1 R10 Dímero         | (Ac-ONNRPVYIPRPRPPHPRL) <sub>2</sub> -DAB                |
| 125       | A32 C2 guan  | Api 1b O1 R10 Dímero         | (Guan-ONNRPVYIPRPRPPHPRL) <sub>2</sub> -DAB              |
| 126       | A6 A36       | Api 1b O1 R10 PIRV           | ONNRPVYIPRPRPPHPRIPIRV-OH                                |
| 127       | B2 A36 ac.   | Api 1b Dímero, O1 R10 O17    | (Ac-ONNRPVYIPRPRPPHPOL) <sub>2</sub> -DAB                |
| 128       | A36 B2 guan. | Api 1b Dímero, O1 R10 O17    | (Guan-ONNRPVYIPRPRPPHPOL) <sub>2</sub> -DAB              |
| 129       | A36 B3 ac.   | Api 1b Dímero                | (Ac-GNNRPVYIPQPRPPHPRL) <sub>2</sub> -DAB                |
| 130       | A36 B3 guan  | Api 1b Dímero                | (Guan-GNNRPVYIPQPRPPHPRL) <sub>2</sub> -DAB              |
| 131       | A36 B6 ac.   | Api 1b O1, R10, Har17        | Ac-ONNRPVYIPRPRPPHP-Har-L-NH <sub>2</sub>                |

ES 2 429 108 T3

| SEC ID NO | Síntesis No. | Nombre                          | Secuencia  |
|-----------|--------------|---------------------------------|--|
| 132       | A36 C1 ac.   | Api 1b Har17                    | Ac-GNNRPVYIPQPRPPHP-Har-L-NH <sub>2</sub>                  |
| 133       | A36 C1 guan. | Api 1b Har17                    | Guan-GNNRPVYIPQPRPPHP-Har-L-NH <sub>2</sub>                |
| 134       | A37 A1 guan. | Api. 1b O1 R10 O17 guan         | Guan-ONNRPVYIPRPRPPHPOL-NH <sub>2</sub>                    |
| 135       | A37 C3 PEG   | Api 1b O1 R10 PEG3000           | PEG-ONNRPVYIPRPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                     |
| 136       | A44 A4 FI    | Api 1b A7, A17                  | GNNRPVYIAQPRPPHPAL-NH <sub>2</sub>                         |
| 137       | A47 A1 guan. | Api 1b O1 R10 ácido, guan       | Guan-ONNRPVYIPRPRPPHPRL-OH                                 |
| 138       | A49 A1       | Api 1b O1 R10 Cit17             | ONNRPVYIPRPRPPHP-Cit-L-NH <sub>2</sub>                     |
| 139       | A49 A3       | Api 1b A17                      | GNNRPVYIPQPRPPHPAL-NH <sub>2</sub>                         |
| 140       | A49 A4       | Api 1b A9                       | GNNRPVYIAQPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                         |
| 141       | A49 A5       | Api. 1b inversa                 | LRPHPPRPQPIYVPRNNG-NH <sub>2</sub>                         |
| 142       | A49 A6       | Api 1b, GNN acortado            | RPVYIPQPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                            |
| 143       | A49 B1       | Api 1b E4                       | GNNRPVYIPQPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                         |
| 144       | A49 B2       | Api 1b-L acortado               | GNNRPVYIPQPRPPHPR-OH                                       |
| 145       | A49 B3       | Api 1b O1 R10 Arginal17         | ONNRPVYIPRPRPPHPArginal-Leu-NH <sub>2</sub>                |
| 146       | A53 G5 guan. | Api 1b O1 R10, Agp17            | Guan-ONNRPVYIPRPRPPHP-AgP-L-NH <sub>2</sub>                |
| 147       | A53 H1 guan. | Api 1b O, R10 propiléster, guan | Guan-ONNRPVYIPRPRPPHPRL-OPr                                |
| 148       | A34 B6 ac.   | Api 1b Cit17 ac                 | Ac-GNNRPVYIPQPRPPHP-Cit-L-NH <sub>2</sub>                  |
| 149       | A34 B6 guan. | Api 1b; Cit17 guan              | Guan-GNNRPVYIPQPRPPHP-Cit-L-NH <sub>2</sub>                |
| 150       | A34 C1 ac.   | Api 1b O1 R10 Cit17             | Ac-ONNRPVYIPRPRPPHP-Cit-L-NH <sub>2</sub>                  |
| 151       | A34 C1 guan. | Api 1b, O1 R10 Cit17            | Guan-ONNRPVYIPRPRPPHP-Cit-L-NH <sub>2</sub>                |
| 152       | A35 ac D2.   | Api 1b O1 R10 D-R17             | Ac-ONNRPVYIPRPRPPHP-DR-L-NH <sub>2</sub>                   |
| 153       | A35 D4 ac.   | Api 1b O1 R10 Me-R17            | Ac-ONNRPVYIPRPRPPHP-mer-L-NH <sub>2</sub>                  |
| 154       | A35 D5 ac.   | Api 1b O1 R10 NO2-R17           | Ac-ONNRPVYIPRPRPPHP-NO2R-L-NH <sub>2</sub>                 |
| 155       | A38 A1 guan. | Api 1b O1 R10 Har17             | Guan-ONNRPVYIPRPRPPHP-Har-L-NH <sub>2</sub>                |
| 156       | A57 A1 guan. | Api 1b O1 R10 4tHyp 5, guan     | Guan-ONNR-4 <sup>t</sup> Hyp-VYIPRPRPPHPRL-NH <sub>2</sub> |
| 157       | A57 A2 guan. | Api 1b O1 R10 4tHyp 9 guan      | Guan-ONNRPVYI-4 <sup>t</sup> Hyp-RPRPPHPRL-NH <sub>2</sub> |
| 158       | A57 A3 guan. | Api 1b O1 R10 4tHyp 11, guan    | Guan-ONNRPVYIPR-4 <sup>t</sup> Hyp-RPPHPRL-NH <sub>2</sub> |
| 159       | A32 C5 guan  | Api 1b R10 guan                 | Guan-GNNRPVYIPRPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>                    |
| 160       | Dy675 A36 B5 | Api 1b O1, R10, Dy675           | N-alfa-Dy675-ONNRPVYIPRPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>            |

DR: D-arginina, MER = metilarginina, preferiblemente alfa-N-metilarginina (ácido 5-(diaminometilidenamino)-2-metilaminopentanoico), NO2R = nitroarginina, preferiblemente N(G)-nitroarginina (ácido 2-amino-5-[(amino-nitramidometiliden)amino]pentanoico), Cit: citrulina; Ac = acetilo, For = formilo, Guan = grupo guanido son ejemplos de extremos N modificados (grupo alfa-amino modificado del aminoácido N-terminal, Sub<sub>1</sub> = Acetil-NH, formil-NH o guanido).

AGP: ácido alfa-Amino-beta-guanidinopropiónico, Arginal: el -COOH de la arginina se sustituye por -CHO, Cha: ciclohexilalanina, Chex: ácido 1-amino-ciclohexilcarbónico, Cit: citrulina, OMe representa un éster metílico en el extremo C (Sub<sub>2</sub> = OR<sub>3</sub> = OMe), OPr representa un éster propílico en el extremo C (Sub<sub>2</sub> = OR<sub>3</sub> = O-Pr); MeLeu = N-metilleucina - una leucina con una metilación en el enlace peptídico; Ac = acetilo, For = formilo, Guan = grupo guanido son ejemplos de extremos N modificados (grupo alfa-amino modificado del aminoácido N-terminal, Sub<sub>1</sub> = Acetil-NH, formil-NH o guanido); βAla y βHar son ejemplos de beta-aminoácidos.

Ejemplo 2: Estabilidad en suero

Los estudios de estabilidad en suero se llevaron a cabo por duplicado como describen Hoffmann et al. [42]. Brevemente, se añadieron 28 µl de una disolución acuosa de péptido o peptidomimético (0,5 mg/ml) a 0,2 ml de suero de ratón al 25% recién reunido (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Alemania) en agua. Las mezclas se incubaron a 37°C bajo agitación suave. Las proteínas se precipitaron con 40 µl de TCA acuoso al 15% después de tiempos de incubación de 0, 0,5, 1, 2, 4 y 6 h a 0°C durante 20 min antes de centrifugar (13.500 x g) a 4°C durante 5 min. Los sobrenadantes de todas las muestras (240 µl) se neutralizaron con 1 mol/L de NaOH acuoso e inmediatamente se almacenaron a -20°C. Los sobrenadantes se analizaron por medio de RP-HPLC utilizando un gradiente lineal de acetonitrilo como se ha descrito anteriormente con TFA al 0,1% como reactivo de par iónico. Las fracciones recogidas de los principales picos se analizaron adicionalmente mediante espectrometría de masas en tándem (MALDI-TOF/TOF-MS, 4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Alemania) en el modo reflector de ion positivo usando ácido α-cianohidroxicinámico (CH<sub>3</sub>CN al 50% en TFA acuoso al 0,1%) como matriz para identificar los productos de degradación de los péptidos y peptidomiméticos, es decir, metabolitos, en los diferentes momentos puntuales. Las muestras de suero de control consistieron en 200 µl de suero de ratón al 25% reunido en agua, que también se hicieron precipitar con 40 µl de TCA acuoso al 15%, como se ha descrito antes. Las muestras de referencia de péptidos consistieron en 28 µl de la disolución de partida de péptido diluida en 0,2 ml de agua y 40 µl de ácido tricloroacético acuoso al 15% (TCA).

Las estabildades en suero de varios péptidos están representadas en la tabla 3:

Tabla 3:

| SEC ID NO | Péptido        | Secuencia                                   | Tiempo de Vida media |
|-----------|----------------|---|----------------------|
| 1         | A24 C3         | GNNRPVYIPQPRPPHPRI-OH                       | 120 min              |
| 2         | A24 C4         | GNNRPVYIPQPRPPHPRL-OH                       | 120 min              |
| 4         | A17 A3 amida   | GNNRPVYIPQPRPPHPRI-NH <sub>2</sub>          | 15 min               |
| 6         | A29 C2         | GNNRPVYIPQPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>          | 15 min               |
| 7         | A18 G5 ac.     | Ac-ONNRPVYIPQPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>       | 15 min               |
| 8         | A18 G5         | ONNRPVYIPQPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>          | 30 min               |
| 12        | A20 B1         | ONNRPVYIPOP RPPHPRL-NH <sub>2</sub>         | 15 min               |
| 13        | A20 B1 ac.     | Ac-ONNRPVYIPOP RPPHPRL-NH <sub>2</sub>      | 15 min               |
| 23        | A21 A5         | ONNRPVYIPRPRPPHP RPIRV-OH                   | 240 min              |
| 24        | A21 A5 ac.     | Ac-ONNRPVYIPRPRPPHP RPIRV-OH                | 240 min              |
| 32        | A25 D5 Orn ac. | Ac-ONNRPVYIPQPRPPHP R-MeLeu-NH <sub>2</sub> | > 360 min            |
| 81        | A29 C1         | Ac-ONNRPVYIPRPRPPHPOL-NH <sub>2</sub>       | 120 min              |
| 82        | A29 C1 ac.     | Ac-ONNRPVYIPRPRPPHPOL-NH <sub>2</sub>       | > 360 min            |
| 83        | A29 C4 ac.     | (Ac-ONNRPVYIPRPRPPHPRL) <sub>2</sub> -DAB   | 15 min               |
| 88        | A30 C1 guan    | Guan-ONNRPVYIPRPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>     | 15 min               |
| 110       | A24 A3         | GNNRPVYIPQPRPPHP RPIRV-NH <sub>2</sub>      | 360 min              |
| 131       | A36 B6 ac.     | Ac-ONNRPVYIPRPRPPHP-Har-L-NH <sub>2</sub>   | 120 min              |
| 134       | A37 A1 guan    | Guan-ONNRPVYIPRPRPPHPOL-NH <sub>2</sub>     | > 360 min            |
| 137       | A47 A1 guan    | Guan-ONNRPVYIPRPRPPHPRL-OH                  | > 360 min            |
| 155       | A38 A1 guan    | Guan-ONNRPVYIPRPRPPHP-Har-L-NH <sub>2</sub> | > 360 min            |

Las secuencias de apidaecina nativa (tipo salvaje) SEQ ID NO. 1 y 2 están degradadas por los dos extremos, es decir, los residuos o péptidos N-terminales y C-terminales son escindidos.

De este modo, la secuencia del péptido se puede estabilizar preferiblemente en ambos extremos frente a exopeptidasas o exoproteasas, así como endoproteasas. Un enlace susceptible a endoproteasas es especialmente el enlace entre la arginina en la posición 17 y la isoleucina o leucina en la posición 18. La degradación se controló por medio de MALDI-MS determinando las masas moleculares de los metabolitos peptídicos y el espectro de masas en tándem de los péptidos correspondientes. La degradación del extremo N dio lugar a secuencias acortadas en uno a tres residuos.

La acetilación N-terminal (SEC ID NO: 7, 13, 24, y 32), por ejemplo, redujo esta vía de degradación

significativamente sin un impacto importante sobre la degradación del extremo C. Por ejemplo, los péptidos Ac-ONNRPVYIPQPRPPHPRL-NH<sub>2</sub> (SEC ID NO: 7) y Ac-ONNRPVYIPRPRPPHPRL-NH<sub>2</sub> (SEC ID NO: 13) no fueron degradados N-terminalmente, si no sólo en el extremo C escindiendo la amida de la leucina C-terminal o los dos residuos C-terminales (Fig. 1).

5 La guanidación N-terminal es incluso superior a la acetilación en la reducción de la degradación N-terminal (SEC ID NO: 134, 137 y 155).

La Fig.1 muestra las cantidades de péptido Ac-ONNRPVYIPQPRPPHPRL-NH<sub>2</sub> (SEC ID NO: 7) presentes en el suero acuoso al 25% después de 30, 60, 120, 240, y 360 minutos, así como los dos metabolitos detectados Ac-ONNRPVYIPQPRPPHPR-OH (SEC ID NO: 164 - escisión de la leucinamida C-terminal) y Ac-ONNRPVYIPQPRPPHP-OH (SEC ID NO: 165 - escisión de dos residuos C-terminales) según lo cuantificado por las áreas de los picos obtenidos mediante RP-HPLC utilizando detección UV.

Del mismo modo la degradación del extremo C se redujo por amidación del extremo C por ejemplo, que no afectó tampoco a la degradación del extremo N. Por lo tanto, la combinación de ambas modificaciones N- y C-terminales redujo significativamente la degradación por exopeptidasas o exoproteasas (SEC ID NO: 7, 13 y 32). La escisión C-terminal de Arg-17, es decir, Arg-Leu o Arg-Ile, se redujo eficazmente por medio de la N-metilación de este enlace peptídico. Preferiblemente, un péptido se estabiliza frente a las tres posibles rutas de degradación como se ilustra para Ac-ONNRPVYIPQPRPPHPRMeLeu-NH<sub>2</sub> (SEC ID NO: 32), que mostró una vida media (suero acuoso al 25%, 37°C) de más de 6 horas. La misma estabilidad se obtuvo para la secuencia Ac-ONNRPVYIPRPRPPHPOL-NH<sub>2</sub> (SEC ID NO: 82) mediante la sustitución de Arg-17 por ornitina, puesto que la ornitina no es un sitio de escisión por tripsina.

### Ejemplo 3: Análisis antibacterianos

#### 1. Análisis de la zona de inhibición (Análisis en placa de agar)

Los péptidos y derivados de péptidos derivados de apidaecina purificados se diluyeron a una concentración final de 500 µg/ml en agua. Se aplicaron alícuotas de 10 µl y controles (10 µl de agua o disolución de antibiótico) a una placa de agar sembrado con una suspensión de un cultivo bacteriano en fase semilogarítmica. Las placas se incubaron a 37°C en la oscuridad. El diámetro de las zonas de inhibición se midió después de 20 h. En general, las bacterias se hicieron crecer en caldo de cultivo de soja con tripsina añadida al 1% (TSB, Fluka, Neu-Ulm, Alemania) y agar al 1,2% (Fluka). Todos los ensayos se realizaron bajo condiciones aeróbicas.

Un barrido con alanina de la secuencia de apidaecina nativa identificó varios residuos responsables de la actividad antimicrobiana frente a tres diferentes cepas de *E. coli* (Fig. 2) y *K. pneumoniae* (Fig. 3).

La Figura 2 muestra la actividad antibacteriana de análogos de apidaecina 1a (barrido con alanina) frente a diferentes cepas de *E. coli* utilizando un análisis en placa de agar.

La Fig. 3 muestra la actividad antibacteriana de análogos de apidaecina 1a (barrido con alanina) frente a la cepa ATCC 10031 de *Klebsiella pneumoniae* utilizando un análisis en placa de agar.

35 En los diagramas mostrados en la Fig. 2 y la Fig. 3, se muestra la secuencia del péptido natural apidaecina 1a GNNRPVYIPQPRPPHPRI (SEQ ID NO. 1) en el eje de las X. Cada residuo representa el correspondiente péptido, en donde el residuo es remplazado por una alanina, p. ej. G en la posición 1 representa: ANNRPVYIPQPRPPHPRI (SEQ ID NO. 166), N en la posición 2 representa GANRPVYIPQPRPPHPRI (SEQ ID NO. 167), y así sucesivamente.

40 La barra representa el diámetro de la zona de inhibición. De este modo, cuanto más alta es la barra, más alta es la actividad antibacteriana del péptido modificado con alanina.

Con el barrido con alanina, se determinaron todas las posiciones responsables de la actividad antibacteriana en apidaecina 1. La actividad antibacteriana se redujo fuertemente si las posiciones Pro11 a Ile18, Arg4, Tyr7 y Pro9 eran remplazadas por alanina. En experimentos adicionales se remplazaron posiciones de aminoácidos específicos por otros aminoácidos similares para incrementar la actividad y la resistencia a las proteasas. En la mayor parte de los casos se obtuvo un fuerte descenso de la actividad.

Todas las cepas sometidas a ensayo de ambas bacterias mostraron una respuesta muy similar a las diferentes mutaciones en un solo sitio con Pro en la posición 11 y Arg en la posición 17 de la secuencia nativa que era obligatoria para restaurar al menos una actividad parcial.

#### 2. Análisis de inhibición del crecimiento

50 Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de los péptidos y derivados de péptidos derivados de apidaecina se determinaron por medio de un análisis de inhibición del crecimiento utilizando una dilución seriada de péptido en placas de 96 pocillos de fondo redondo esterilizadas (poliestireno, fondo en U, Greiner Bio-One GmbH) con un volumen final de 100 µL por pocillo. Las bacterias, p. ej., *E. coli* BL21 AI, se hicieron crecer en caldo nutriente (NB, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Alemania) a 37°C durante la noche. A cada pocillo de la placa de 96 pocillos,

## ES 2 429 108 T3

se le añadieron 50 µL del cultivo durante la noche ajustado con  $5 \times 10^6$  UFC/mL en TSB al 1%. Los péptidos y peptidomiméticos liofilizados se disolvieron en TSB (caldo de soja con tripsina añadida) al 1% o agua para dar una concentración final de 250 µg/mL. Se añadieron 50 µL de la disolución de péptido o peptidomimético al primer pocillo de una fila de la placa y se mezclaron. Se transfirieron 50 µL del primer pocillo que contenía la disolución de péptido al segundo pocillo, se mezclaron y de nuevo se transfirieron 50 µL al siguiente pocillo y así sucesivamente. De ese modo, se obtuvo una serie de diluciones a la mitad que empezaba en 250 µg/mL en el primer pocillo hasta 120 ng/mL en el 12º pocillo de una fila dando una concentración de péptido o peptidomimético final de 125 µg/mL (pocillo 1) a 60 ng/mL (pocillo 12). Las placas se incubaron a 37°C durante 20 hrs. Se midió la absorbancia a 595 nm utilizando un espectrómetro de microplaca TECAN (Tecan, Alemania). Todos los péptidos y peptidomiméticos se midieron por triplicado. Se utilizó agua esterilizada como control negativo. El valor de CIM expresa la concentración más baja a la cual no se observó crecimiento bacteriano después de la incubación a 37°C durante al menos 20 horas.

Los valores de CIM de los péptidos y derivados de péptidos sometidos a ensayo frente a bacterias de diversas bacterias resistentes a múltiples fármacos se resumen en la tabla 4.

Se sometieron a ensayo las siguientes cepas de bacterias resistentes a múltiples fármacos:

- *Escherichia coli* 45849 y D31,
- *Klebsiella pneumoniae* 123132 y K6,
- *Salmonella typhi* S5 y *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Typhimurium (ATCC 700408),
- *Rhizobium radiobacter* (ATCC 15955 depositada como *Agrobacterium tumefaciens*).

20

Tabla 4

| SEQ ID NO | Síntesis Núm. | <i>E. coli</i> | <i>K. Pneumonia</i> | <i>S. typhi</i> | <i>E. coli</i> | <i>K. Pneumonia</i> | <i>S. enterica subsp. Enterica serovar. typhi</i> | <i>R. radiobacter</i> |
|-----------|---------------|----------------|---------------------|-----------------|----------------|---------------------|---|-----------------------|
|           |               | 45849          | 123132              | S5              | D31            | K6, ATCC 700603     | G10215 ATCC 700408                                | ATCC 15955            |
| 1         | A24 C3        |                |                     |                 | 64             | 64                  | 2   |                       |
| 2         | A24 C4        |                |                     |                 | 32             | 64                  | 2   |                       |
| 6         | A29 C2        | 0,5            | 16                  | 0,125           | 1              | 16                  | 0,125   | n.t.                  |
| 7         | A18 G5 ac.    | 1              | 16                  | 2               | 4-8            | 64                  | 0,5-1   | < 0,16                |
| 8         | A18 G5        | < 0,25         | 1                   | < 0,5           | 2              | 16                  | < 0,25  | < 0,16                |
| 9         | A17 A4        | 1              | 8                   | 2               | 16             | 16                  | 0,5   | < 0,16                |
| 11        | A18 B4        | 1              | 8                   | < 0,5           | 8              | 8                   | < 0,25  | < 0,16                |
| 12        | A20 B1        | 1              | 4                   | < 0,5           | 4              | 4                   | < 0,25  | 0,65                  |
| 13        | A20 B1 ac.    | 2              | 8                   | < 0,5           | 4              | 8                   | < 0,25  | < 0,16                |
| 14        | A14 B3        |                |                     |                 | 64             | 8                   | 2   |                       |
| 15        | A17 B3        | 1              | 4                   | 2               | 64             | 16                  | 2   | 0,33                  |
| 16        | A17 B5        |                |                     |                 | 128            | 32                  | 2   |                       |
| 17        | A14 B4        | 8              | 16                  | 16              | 32             | 32                  | 4 a 8   | 0,65                  |
| 20        | A17 B2        | 1              | 4                   | < 0,5           | 32             | 8                   | 0,5   | 0,33                  |
| 21        | A24 C1        | < 0,25         | 4                   | 1               | 8              | 8                   | 0,25-0,5  | 0,65                  |
| 22        | A24 C1 ac.    | 1              | 16                  | 1               | 16             | 16                  | 1   | <0,16                 |
| 23        | A21 A5        | 8              | 16                  | 8               | 64             | 32                  | 8   | 0,65                  |
| 25        | A20 A5        | 1              | 16                  | 2               | 64             | 16                  | 1   | 0,65                  |

ES 2 429 108 T3

| SEQ ID NO | Síntesis Núm.  | <i>E. coli</i> | <i>K. Pneumonia</i> | <i>S. typhi</i> | <i>E. coli</i> | <i>K. Pneumonia</i> | <i>S. enterica subsp. Enterica serovar. typhi</i> | <i>R. radiobacter</i> |
|-----------|----------------|----------------|---------------------|-----------------|----------------|---------------------|---|-----------------------|
|           |                | 45849          | 123132              | S5              | D31            | K6, ATCC 700603     | G10215 ATCC 700408                                | ATCC 15955            |
| 26        | A14 B5         | 16             | 32                  | 32              | > 128          | 128                 | 4   | 2,6                   |
| 32        | A25 D5 Orn ac. | 8              | > 64                | 32              | 64             | > 128               | 8   | 1,3                   |
| 33        | A25 D5 Gly     |                |                     |                 | 32             | > 128               | 8   |                       |
| 34        | A26 C2         | 4              | 32                  | 8               | 8              | 32                  | 4 a 8   | 1,3                   |
| 35        | A26 C5 Orn     | 16             | 32                  | 16              | 8              | 16                  | 4 a 8   | 2,6                   |
| 36        | A26 C3 Orn ac. | 4              | 32                  | 16-32           | 8              | 64-128              | 4 a 8   | 1,3                   |
| 37        | A26 C4         | 16             | 16                  | 16              | 8              | 32                  | 8   | 10,5                  |
| 38        | A18 G6         | 0,5            | 2                   | < 0,5           | 2              | 4                   | 2   | 1,3                   |
| 39        | A18 G6 ac.     | 1              | 4                   | < 0,5           | 4              | 16                  | 4   | 0,33                  |
| 40        | A26 B2 ac.     | 1              | 4                   | < 0,5           | 8              | 16                  | 4   | 0,33                  |
| 41        | A26 B4 ac.     | 4              | 32                  | 8               | > 128          | 128                 | 8   | 5,25                  |
| 43        | A26 B5         |                |                     |                 | > 128          | > 64                | > 64  |                       |
| 44        | A26 B3         |                |                     |                 | 128            | 64                  | 4   |                       |
| 45        | A26 B2         | 1              | 4                   | < 0,5           | 8              | 4                   | 2   | 0,65                  |
| 46        | A26 C5 Orn ac. | 32             | 32-64               | 32              | 16             | 32-64               | 8   | 10,5                  |
| 47        | A26 C3 Orn     | 4              | 32                  | 32              | 8              | 32-64               | 8   | 1,3                   |
| 48        | A27 B6         | 4              | 32                  | 4               | 64             | 128                 | 16  | 1,3                   |
| 49        | A27 B5         | 2              | 64                  | 4               | 32             | 128                 | 8   | 1,3                   |
| 50        | A27 B4         |                |                     |                 | > 128          | > 128               | 32  |                       |
| 81        | A29 C1         | 8              | 8                   | 4               | 8              | 16                  | 4   | n.t.                  |
| 82        | A29 C1 ac.     | 16             | 8                   | 8               | 32             | 32                  | 8   | n.t.                  |
| 83        | A29 C4 ac.     | 8              | 8                   | 4               | 2              | 8                   | 4   | n.t.                  |
| 84        | A29 C5 guan    | 0,5            | 32                  | 0,25            | 1              | 32                  | 0,25  | n.t.                  |
| 85        | A29 C5 FA      | 2              | 16                  | 0,5             | 16             | 64                  | 0,5   | n.t.                  |
| 88        | A30 C1 guan    | 0,5            | 1                   | 0,125           | 0,5            | 0,5                 | 0,125   | n.t.                  |
| 120       | A30 C3 guan    | 0,25           | 4                   | 0,125           | 0,5            | 8                   | 0,125   | n.t.                  |
| 121       | A30 C6 guan    | 128            | 128                 | n.t.            | 16             | > 128               | n.t.  | n.t.                  |
| 133       | A37 A1 guan    | 16             | 16                  | 16              | 16             | 16                  | 2   | n.t.                  |

| SEQ ID NO | Síntesis Núm. | <i>E. coli</i> | <i>K. Pneumonia</i> | <i>S. typhi</i> | <i>E. coli</i> | <i>K. Pneumonia</i> | <i>S. enterica subsp. Enterica serovar. typhi</i> | <i>R. radiobacter</i> |
|-----------|---------------|----------------|---------------------|-----------------|----------------|---------------------|---|-----------------------|
|           |               | 45849          | 123132              | S5              | D31            | K6, ATCC 700603     | G10215 ATCC 700408                                | ATCC 15955            |
| 137       | A47 A1 guan   | < 1            | 1                   | < 1             | < 1            | 4                   | < 1   | n.t.                  |
| 155       | A38 A1 guan   | 4              | 2                   | 4               | 4              | 4                   | 0,5   | n.t.                  |
| 159       | A32 C5 guan   | 1              | 4                   | 0,25            | 1              | 4                   | 0,25  | n.t.                  |

Los SEQ ID NO: 1, 2 son las secuencias de tipo salvaje como ejemplos de comparación, los SEQ ID NO: 4, 19, 26, 32, 33, 41, 43, 44, 50, 121 y 133 son ejemplos menos preferidos de acuerdo con la invención (con una Q como X<sub>4</sub> - en la posición 10). Los otros SEQ ID NO: mostrados, son péptidos o derivados de péptidos preferidos de acuerdo con la invención. Los ejemplos más preferidos son los SEQ ID NO: 6, 7-8, 11-13, 20-22, 25, 39, 40, 45, 65, 67, 84, 85, 88, 137, 155 y 159.

La amidación del extremo C no solo da como resultado mejores actividades microbianas, es decir, valores de CIM más bajos, sino que también reduce la degradación C-terminal por las exoproteasas. De un modo similar la modificación, preferiblemente la acetilación o guanidación, del grupo amino N-terminal reduce la degradación N-terminal, como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, la acetilación N-terminal reduce los valores de CIM para algunas de las cepas bacterianas sometidas a ensayo (p. ej., el SEQ ID NO: 21 en comparación con el SEQ ID NO: 22 y el SEQ ID NO: 38 en comparación con el SEQ ID NO: 39), lo que indica que los residuos N-terminales deben llevar una carga positiva. Por consiguiente, la glicina de la posición X<sub>1</sub> se reemplazó por residuos que portaban una cadena lateral cargada positivamente, como lisina (p. ej. SEQ ID NO: 21), arginina y ornitina (p. ej. SEQ ID NO: 12). Otra posibilidad para introducir una carga positiva en el extremo N es la guanidación N-terminal, que al mismo tiempo estabiliza el extremo N frente a la degradación (p. ej. los SEQ ID NO: 133 y 137). Estos péptidos modificados N-terminalmente que portan un residuo con una cadena lateral cargada positivamente en la Posición X<sub>1</sub> mostraron mejores valores de CIM que las secuencias de apidaecina de tipo salvaje acetiladas. Otro residuo importante para mejorar la actividad antimicrobiana es la sustitución de la glutamina de la posición 10 (residuo X<sub>4</sub>) por un residuo que porta una cadena lateral cargada positivamente, tal como ornitina (p. ej. los SEQ ID NO: 12 y 13), lisina (p. ej. los SEQ ID NO: 21 y 22) o arginina (p. ej. los SEQ ID NO: 38 y 39). Esta sustitución en la posición 10 (residuo X<sub>4</sub>) por un residuo que porta una cadena lateral cargada positivamente no reduce la resistencia a la proteasa, ya que la siguiente posición contiene una prolina, que reduce eficazmente la escisión proteolítica del enlace peptídico N-terminal por las endoproteasas. La sustitución de la prolina de la posición 11 (residuo X<sub>5</sub>) por hidroxiprolina no influye en los valores de CIM dentro del intervalo de error del análisis ni reduce la resistencia a la proteasa de su enlace peptídico N-terminal. Mientras esta sustitución por hidroxiprolina en la posición 11 (residuo X<sub>5</sub>) no afecta a los valores de CIM ni a la estabilidad en suero, la polaridad más alta reduce adicionalmente la toxicidad celular y la actividad hemolítica, ya que péptidos más polares se unen a menos membranas celulares. De este modo un péptido muy preferido contiene ornitina en la posición 1 (residuo X<sub>1</sub>), arginina en la posición 10 (residuo X<sub>4</sub>) e hidroxiprolina en la posición 11 (residuo X<sub>5</sub>, un extremo N acetilado, y una amida C-terminal, tal como el SEQ ID NO: 40). Además, el enlace peptídico entre las posiciones 17 y 18, esto es, Arg y Leu/Ile de la secuencia original, es modificado para incrementar su resistencia a proteasa o peptidasa, tal como N-metilación (p. ej. los SEQ ID NO: 33, 34). Alternativamente la arginina de la posición 17 (residuo X<sub>6</sub>) es reemplazada por un residuo alcalino no propenso a proteólisis, tal como ornitina (p. ej. los SEQ ID NO: 38, 131 a 133, 146 a 155).

Los valores de CIM de los péptidos y derivados de péptidos sometidos a ensayo frente a bacterias de diversas especies se resumen en la tabla 5.

Se sometieron a ensayo las cepas de bacterias:

- *Escherichia coli* 1103, 10233, BL 21 AI, DC 2,
- *Klebsiella pneumoniae* 681,
- *Micrococcus luteus* ATCC 10240,
- *Mycobacterium vaccae*

ES 2 429 108 T3

- *Bacillus subtilis* 347.

Tabla 5

| SEQ ID NO: | Síntesis Núm. | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>M. luteus</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>K. pneumonia</i> | <i>Myco-bacterium</i> | <i>B. subtilis</i> |
|------------|---------------|----------------|----------------|------------------|----------------|----------------|---------------------|-----------------------|--------------------|
|            |               | 10233          | BL 21 AI       | ATCC 10240       | 1103           | DC 2           | 681                 | vaccae                | 347                |
| 1          | A24 C3        | 1,95           | 0,98           | 31,25            | 1,95           | 3,91           | 15,62               | > 125                 | >125               |
| 2          | A24 C4        | 1,95           | 0,98           | 31,25            | 7,81           |                | 62,5                |                       | > 125              |
| 7          | A18 G5 ac.    |                | 0,49           | 3,91             | 1,95           | 3,9            | 1,95                | 125                   | > 125              |
| 8          | A18 G5        |                | 0,24           | 7,84             | 1,95-0,95      | 0,98           | 1,95                | 125                   | > 125              |
| 9          | A17 A4        |                | 0,49           | 1,95             | 3,9            | 1,95           | 3,9                 | 125                   | > 125              |
| 11         | A18 B4        | 3,91           | 0,49           | 1,95             | 3,9            | 0,98           | 1,95                | 125                   | 125                |
| 12         | A20 B1        | 0,98-1,95      | 0,98           | 1,95             | 3,91           |                | 7,81                |                       | 62,5               |
| 13         | A20 B1 ac.    | 1,95           | 1,95           | 1,95             | 3,81           |                | 3,91                |                       | 125                |
| 14         | A14 B3        |                | 0,49           | 0,98             | 0,98           | 7,81           | 15,62               |                       |                    |
| 15         | A17 B3        |                | 0,98           | 1,95             | 1,95           | 3,9            | 3,9                 | 125                   | > 125              |
| 16         | A17 B5        |                | 0,98           | 3,91             |                |                |                     |                       |                    |
| 17         | A14 B4        |                | 0,98           | 0,98             | 1,95           | 31,25          | 31,25               |                       |                    |
| 20         | A17 B2        |                | 0,49           | 1,95             | 3,9            | 1,95-3,91      | 3,9                 | 125                   | > 125              |
| 21         | A24 C1        |                | 1,95-3,91      | 1,95-0,98        |                |                |                     |                       |                    |
| 22         | A24 C1 ac.    |                | 1,95           | 1,95             |                |                |                     |                       |                    |
| 23         | A21 A5        | 3,91           | 1,95-3,91      | 0,12             | 7,81           |                | 62,5                |                       | 125                |
| 25         | A20 A5        |                | 3,91           | 1,95             |                |                |                     |                       |                    |
| 26         | A14 B5        |                | 3,91           | 1,95             | 3,91           | 7,81           | 15,62               |                       |                    |
| 32         | A25 Orn ac.   | 31,25          | 15,63          | 7,81             | 31,4           |                | > 125               |                       | > 125              |
| 33         | A25 Gly       | 15,63          | 15,63          | 31,25            | 62,5           |                | > 125               |                       | > 125              |
| 38         | A18 G6        | 1,95           | 1,95           | 1,95             | 3,91           | 0,98           | 1,95                | 125                   | 62,5               |
| 39         | A18 ac.       | 1,95           | 1,95           | 0,98             | 3,91           | 0,98           | 3,9                 | 125                   | 125                |
| 40         | A26 ac.       | 1,95           |                |                  | 3,91           |                | 3,91                |                       | 125                |
| 45         | A26 B2        | 1,95-3,91      |                |                  | 7,81           |                | 7,81                |                       | 62,5               |
| 62         | A18 A1        |                | 1,95           | 7,81             |                |                |                     |                       |                    |
| 63         | A18 ac.       |                | 3,91           | 3,91             |                |                |                     |                       |                    |
| 65         | A18 ac.       |                | 0,98           | 0,98             | 1,95           | 7,81           | 7,81                | 62,5                  | 125                |
| 66         | A18 A5        |                | 1,95           | 1,95             | 3,9            | 1,95           | 3,9                 | 125                   | 62,5               |



ES 2 429 108 T3

| SEQ ID NO: | Síntesis Núm. | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>M. luteus</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>K. pneumonia</i> | <i>Mycobacterium</i> | <i>B. subtilis</i> |
|------------|---------------|----------------|----------------|------------------|----------------|----------------|---------------------|----------------------|--------------------|
|            |               | 10233          | BL 21 AI       | ATCC 10240       | 1103           | DC 2           | 681                 | vaccae               | 347                |
| 67         | A18 ac. A5    |                | 3,91           | 1,95             | 3,9            | 3,9            | 3,9                 | 125                  | 125                |
| 68         | A18 B1        |                | 7,81           | 0,24             | 3,9            | 7,81           | 31,25               | 125                  | > 125              |
| 69         | A20 B4        |                | 7,81           | 0,24             |                |                |                     |                      |                    |
| 70         | A21 A6        |                | 15,63          | 0,49             |                |                |                     |                      |                    |
| 71         | A25 Orn D3    |                | 62,5-31,25     | 7,81-3,91        |                |                |                     |                      |                    |
| 72         | A25 Orn D4    |                | > 125          | 7,81             |                |                |                     |                      |                    |
| 73         | A25 Orn D6    |                | 62,5           | 7,81             |                |                |                     |                      |                    |
| 74         | A25 Orn E1    |                | > 125          | 7,81             |                |                |                     |                      |                    |
| 75         | A25 Orn E2    |                | > 125          | 7,81             |                |                |                     |                      |                    |
| 76         | A25 Gly D3    |                | 62,5           | 15,63            |                |                |                     |                      |                    |
| 77         | A25 Gly D4    |                | > 125          | 31,25            |                |                |                     |                      |                    |
| 78         | A25 Gly D6    |                | 125-62,5       | 31,25            |                |                |                     |                      |                    |
| 79         | A25 Gly E1    |                | > 125          | 62,5             |                |                |                     |                      |                    |
| 80         | A25 Gly E2    |                | > 125          | 15,63            |                |                |                     |                      |                    |
| 83         | A29 ac. C4    | 31,25          | 1,95           | 1,95             |                |                | 125                 |                      | 15,6               |
| 84         | A29 C5 for    | 1,95           | 1,95           | 3,91             |                |                | 62,5                |                      | > 125              |
| 85         | A29 guan C5   | 1,95           | 0,24           | 15,63            |                |                | 31,25               |                      | > 125              |
| 86         | A28 A3        |                | 3,91           | 0,98             |                |                |                     |                      | 62,5               |
| 88         | A30 guan C1   | 1,95           | 0,98           | 1,95             |                |                | 7,81                |                      | 62,5               |
| 89         | A17 A5        |                | 1,95           | 15,63            |                |                |                     |                      |                    |
| 90         | A17 B1        |                | 0,98           | 7,81             |                |                |                     |                      |                    |
| 91         | A17 B4        |                | 1,95           | 7,81             |                |                |                     |                      |                    |
| 92         | A17 C1        |                | 3,91           | 31,25            |                |                |                     |                      |                    |
| 102        | A20 A6        |                | 1,95           | 1,95             |                |                |                     |                      |                    |
| 103        | A20 ac. A6    |                | 1,95           | 3,91             |                |                |                     |                      |                    |
| 131        | A36 ac. B6    |                | 4              | 0,5              | 16             |                | 16                  |                      | 32                 |
| 132        | A36 C1 ac     |                | 32             | 32               | 64             |                | 32                  |                      | 128                |

| SEQ ID NO: | Síntesis Núm. | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>M. luteus</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>K. pneumonia</i> | <i>Mycobacterium</i> | <i>B. subtilis</i> |
|------------|---------------|----------------|----------------|------------------|----------------|----------------|---------------------|----------------------|--------------------|
|            |               | 10233          | BL 21 AI       | ATCC 10240       | 1103           | DC 2           | 681                 | vaccae               | 347                |
| 133        | A36 guan C1   |                | 64             | 32               | 16             |                | 8                   |                      |                    |
| 134        | A37 guan A1   |                | 2              | 4                | 32             |                | 16                  |                      | > 128              |
| 135        | A37 PEG C3    | >125           | > 125          | 8                | > 125          |                | > 125               |                      | > 125              |
| 136        | A44 A4 FI     |                | > 125          | > 125            |                |                |                     |                      |                    |
| 137        | A47 guan A1   |                | < 0,5          | 8                | 8              |                | 2                   |                      | 64                 |
| 138        | A49 A1        |                | 64             | 64               |                |                |                     |                      |                    |
| 139        | A49 A3 FI     |                | > 125          | > 125            |                |                |                     |                      |                    |
| 140        | A49 A4 FI     |                | > 125          | 125              |                |                |                     |                      |                    |
| 141        | A49 A5        | > 125          | > 125          | > 125            | > 125          |                | > 125               |                      | > 125              |
| 142        | A49 A6 FI     |                | 125            | 125              |                |                |                     |                      |                    |
| 144        | A49 B2        |                | > 125          | > 125            |                |                |                     |                      |                    |
| 146        | A53 G5        |                | 32             | 4                | 64             |                | 32                  |                      | 125                |
| 147        | A53 guan H1   |                | 4              | 16               | 16             |                | 8                   |                      | 64                 |
| 148        | A34 ac. B6    |                | > 125          | > 125            |                |                |                     |                      |                    |
| 150        | A34 ac. C1    |                | 32             | 32               |                |                |                     |                      |                    |
| 151        | A34 guan C1   |                | 16             | 64               |                |                |                     |                      |                    |
| 152        | A35 ac. D2    |                | 32             | 32               |                |                |                     |                      |                    |
| 153        | A35 ac. D4    |                | 16             | 32               |                |                |                     |                      |                    |
| 154        | A35 ac. D5    |                | 16             | 32               |                |                |                     |                      |                    |
| 155        | A38 guan A1   |                | 4              | 1                | 4              |                | 4                   |                      | 32                 |

Los SEQ ID NO: 1, 2 son las secuencias de tipo salvaje como ejemplos de comparación. Los SEC ID NO: 32, 33, y 70-80, así como los SEC ID NO: 132, 133, 135, 136, 139, 140, 143, 144 y 148 son ejemplos menos preferidos de acuerdo con la invención (con Q como X<sub>4</sub> - posición 10). La apidaecina inversa (SEC ID NO: 141) y los péptidos de apidaecina acortados (SEC ID NO: 92 y 142) también son menos preferidos. Los otros SEQ ID NO: mostrados, son péptidos o derivados de péptidos preferidos de acuerdo con la invención. Los ejemplos más preferidos son los SEC ID NO: 7, 8, 9, 11-17, 20-23, 25, 38 40, 45, 65-67, 84, 85, 88, 134 y 137.

En general, la actividad antibacteriana medida en el análisis de microdilución para las secuencias de péptidos sometidos a ensayo es muy similar a los datos presentados en la tabla 4 y discutidos posteriormente. En resumen, se desea la amidación del extremo C, ya que reduce significativamente los valores de CIM para las bacterias sometidas a ensayo. La acetilación del extremo N reduce la degradación N-terminal por las peptidasas o las proteasas, como se ha descrito anteriormente. Los mejores valores de CIM se obtuvieron para los péptidos y peptidomiméticos que llevaban un grupo cargado positivamente en el extremo N-terminal del péptido, por lo tanto, es ventajoso sustituir la glicina en la posición 1 por lisina (p. ej., SEC ID NO: 21 y 22), arginina u ornitina (p. ej., SEC ID NO: 7 y 8) ya que todos llevan una cadena lateral cargada positivamente. Se prefiere la ornitina puesto que no

introduce un sitio de escisión por tripsina. Estos péptidos acetilados N-terminalmente mostraron mejores valores de CIM que las secuencias de tipo salvaje acetiladas. Otro residuo importante para mejorar la actividad antimicrobiana es la sustitución de la glutamina de la posición 10 (residuo X<sub>4</sub>) por residuos que llevan una cadena lateral cargada positivamente, tales como ornitina (p. ej., SEC ID NO: 12 y 13), lisina (p. ej., SEC ID NO: 21 y 22) o arginina (p. ej., SEC ID NO: 38 y 39). Esta sustitución no reduce la resistencia a las proteasas, ya que la siguiente posición contiene una prolina, lo que reduce eficazmente la escisión proteolítica del enlace peptídico N-terminal. Como una alternativa a la acetilación N-terminal, la guanidación (p. ej., SEC ID NO: 88, 134 y 137) fue también muy eficaz y, además, prolongó la actividad para *B. subtilis* que es resistente a las secuencias de apidaecina de tipo salvaje así como a la mayoría de los análogos. La sustitución de la prolina de la posición 11 (residuo X<sub>5</sub>) por hidroxiprolina no reduce los valores de CIM ni la resistencia a la proteasa, pero como aminoácido más polar reduce aún más la toxicidad celular y la actividad hemolítica. De este modo, un péptido preferido contiene ornitina en la posición 1 (residuo X<sub>1</sub>), arginina u ornitina en la posición 10 (residuos X<sub>4</sub>) e hidroxiprolina en la posición 11 (residuo X<sub>5</sub>), un extremo N acetilado o guanidado, y una amida C-terminal, tal como los SEC ID NO: 40, 103.

Curiosamente, algunas modificaciones introdujeron una actividad contra *B. subtilis*, que no se observa para los péptidos de apidaecina nativa de tipo salvaje. La característica común de estas secuencias con actividad contra *B. subtilis* es un extremo N cargado positivamente, es decir, un grupo con amino libre o un extremo N guanidado, una arginina u ornitina en la posición 10 (residuos X<sub>4</sub>) y preferiblemente un ornitina en la posición 1 (residuo X<sub>1</sub>) de la secuencia de apidaecina 1b (leucina en la posición 18 - p. ej., los SEQ ID NO: 12, 38, 45, 66, 131 a 134 y 155). Los correspondientes péptidos de apidaecina 1a homólogos (isoleucina en la posición 18) no fueron activos contra *B. subtilis*. Las mismas modificaciones de secuencia (extremo N cargado, una arginina u ornitina en la posición 10 y una ornitina en la posición 1) de la secuencia de apidaecina 1a prologaron la actividad para *M. vaccae* (SEC ID NO: 65).

Ejemplo 4: Análisis para determinar la toxicidad para células de mamífero

#### 1. Análisis hemolítico

Para determinar si los péptidos y derivados de péptidos de acuerdo con la invención eran tóxicos para las células de mamíferos, se examinaron varios péptidos y peptidomiméticos del Ejemplo 1 de más arriba, un control positivo y un control negativo para determinar la actividad hemolítica. La actividad hemolítica se analizó con eritrocitos humanos [43]. Se proporcionó un producto concentrado de eritrocitos humanos en tampón de cloruro de sodio con adenina-glucosa-manitol del Hospital de la Universidad de Leipzig (Leipzig, Alemania). Los eritrocitos se centrifugaron a 1000 g y se lavaron tres veces con 10 volúmenes de solución salina fría tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4). Los eritrocitos se diluyeron a una concentración final de 1% en PBS. Se añadieron 100 microlitros de esta suspensión de eritrocitos humanos en PBS a cada pocillo de una placa de microtitulación de polipropileno de 96 pocillos en forma de V (Greiner Bio-One GmbH). A cada pocillo se le añadieron 100 µl de péptido disuelto en PBS para obtener una serie de diluciones que partía de 600 µg/ml hasta 4,8 µg/ml en siete etapas de dilución. La placa de microtitulación se incubó a 37°C durante 1 h y con posterioridad se centrifugó durante 10 min a 1000 g. Se transfirieron cien microlitros del sobrenadante a una placa de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (Greiner Bio-One GmbH) y se registró la absorción a 405 nm en un espectrofotómetro de microplaca (Tecan) para evaluar la liberación del grupo hemo. Se utilizaron PBS y Triton X-100 al 0,1% como controles negativos y positivos. El porcentaje de hemólisis se calculó por medio de la siguiente ecuación [44]:

$$(E_{\text{péptido}} - E_{\text{PBS}}) / (E_{\text{Triton}} - E_{\text{PBS}}) \times 100\% \quad \text{con } E = \text{Extinción a } 405 \text{ nm}$$

Todos los análisis hemolíticos se llevaron a cabo por duplicado. La Figura 4 y la tabla 6 muestran el promedio de tres experimentos independientes.

La Figura 4 muestra el resultado del análisis hemolítico para los péptidos A30 C1 guan. (SEC ID NO: 88) y A18 G6 ac. (SEC ID NO: 39) y A17 A6 (SEQ ID NO. 6), a una concentración de péptido de 600 µg/ml, PBS y Triton X-100<sup>®</sup> (p-terc-Octilfenoxi)polietoxietanol, 0,1%) como controles.

Los resultados para nuevos péptidos y derivados de péptidos se resumen en la tabla 6:

Tabla 6

| SEQ ID NO: | Síntesis Núm. | Tasa de hemólisis [%] |
|------------|---------------|-----------------------|
| 1          | A24 C3        | 0,9                   |
| 2          | A24 C4        | 0,8                   |
| 38         | A18 G6        | 1,0                   |
| 39         | A18 G6 ac.    | 1,4                   |
| 23         | A21 A5        | 1,1                   |

| SEQ ID NO: | Síntesis Núm. | Tasa de hemólisis [%] |
|------------|---------------|-----------------------|
| 24         | A21 A5 ac.    | 0,9                   |
| 83         | A29 C4 ac.    | 1,3                   |
| 84         | A29 C5 FA     | 0,8                   |
| 33         | A25 D5 Gly    | 0,6                   |
| 88         | A30 C1 guan.  | 1,3                   |
| 120        | A30 C3 guan   | <1                    |
| 131        | A36 B6 ac     | <1                    |
| 133        | A36 C1 guan   | <1                    |
| 134        | A37 A1 guan   | <1                    |
| 135        | A37 C3 PEG    | <1                    |
| 151        | A34 C1 guan   | <1                    |
| 155        | A38 A1 guan   | <1                    |
|            | Triton X-100® | 100                   |

Ninguno de los péptidos examinados mostró actividad hemolítica a una concentración de péptido de 600 µg/ml, es decir, ni siquiera a concentraciones de 100 hasta 1200 veces más altas que los valores de CIM obtenidos. Las tasas hemolíticas para todos los péptidos fueron sólo de alrededor de 1% con respecto a tritón, que está dentro del contexto de este análisis. El agente tensioactivo no iónico Triton X-100® se utilizó como control positivo, ya que destruye completamente los glóbulos rojos de la sangre en el entorno experimental en una hora. Este análisis de células indica que los péptidos y derivados de péptidos se pueden aplicar a la sangre a concentraciones altas, sin efectos secundarios sobre los glóbulos rojos de la sangre. En conclusión, todos los péptidos y derivados de péptidos sometidos a ensayo cumplen el requisito de que los compuestos antimicrobianos ideales no deben mostrar ninguna actividad hemolítica a concentraciones 100 veces más altas que los valores de CIM.

## 2. Análisis para determinar la toxicidad para las células COS

Se hicieron crecer células COS-7 en medio de Eagle modificado de Dulbecco (Cellgro, Meidatech Inc., Herndon, VA, EE.UU.) que contenía suero bovino fetal al 10% a 37°C en una atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub>. Las células (5 x 10<sup>3</sup> células/pocillo) se cultivaron en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos y se incubaron durante 24 h antes de la adición del péptido. Los péptidos se disolvieron en 0,5 ml de agua y se inocularon en 1 ml de medio a concentraciones finales de 60, 200 y 600 µg/ml por duplicado. Las placas se incubaron durante 24 h más a 37°C en una atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub>. El medio se aspiró y el análisis se terminó mediante la adición de 100 µl de tripsina-tetraacetato de etilendiamina (EDTA) (tripsina al 0,25%/EDTA al 0,1% en solución salina equilibrada de Hank; Cellgro). Las muestras tratadas y de control se cosecharon, se lavaron en PBS y se fijaron con etanol acuoso frío al 70% durante 2 horas. Las células se resuspendieron a continuación en PBS que contenía 10 µg/ml de yoduro de propidio (PI) y 250 µg/ml de ARNasa y se incubaron durante 30 min a 37°C. Las tasas de necrosis/apoptosis se evaluaron mediante análisis de citometría de flujo realizados en un Guava® EasyCyte™ Mini System (Guava Technologies, Hayward, CA, EE.UU.).

Este análisis estudia el efecto de los péptidos y derivados de péptidos sometidos a ensayo en dobletes a diferentes concentraciones sobre el ciclo celular de un cultivo de células COS-7, es decir, el porcentaje de células en fase G1, S, G2/M, así como de células necróticas y apoptóticas. Los datos se evalúan con respecto a un blanco (sin péptidos y derivados de péptidos añadidos) y una disolución de DMSO al 10%, que destruye completamente las células.

Los resultados se resumen en la tabla 7. Como se muestra en la tabla anterior, ninguno de los péptidos y derivados de péptidos tuvo ninguna influencia detectable sobre la distribución del ciclo celular, ya que todos estuvieron dentro del intervalo de error de los dos blancos, incluso a las más altas concentraciones de 600 µg/ml. La necrosis y la apoptosis más importantes no fueron elevadas en comparación con el blanco. Estos datos, combinados con las actividades hemolíticas (Tab. 6) son la prueba de que los péptidos y derivados de péptidos estudiados no son citotóxicos a nivel celular ni siquiera a concentraciones de hasta 600 µg/ml, que es más de 100 veces por encima de los valores de CIM.

Tabla 7

| SEC ID NO: | Péptido        | Concentración [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] | Necrosis y apoptosis | G1 | S1 | G2/M |
|------------|----------------|---|----------------------|----|----|------|
|            |                |   | %                    | %  | %  | %    |
| 8          | A18 G5         | 600                                       | 11                   | 39 | 26 | 24   |
|            |                | 600                                       | 15                   | 38 | 26 | 21   |
|            |                | 200                                       | 17                   | 47 | 26 | 9    |
|            |                | 200                                       | 16                   | 43 | 27 | 14   |
|            |                | 60  | 18                   | 44 | 29 | 9    |
| 32         | A25 D5 Orn ac. | 600                                       | 10                   | 35 | 28 | 27   |
|            |                | 600                                       | 13                   | 42 | 28 | 17   |
|            |                | 200                                       | 29                   | 29 | 27 | 15   |
|            |                | 200                                       | 18                   | 37 | 32 | 13   |
|            |                | 60  | 18                   | 39 | 29 | 14   |
| 45         | A26 B2         | 600                                       | 11                   | 40 | 25 | 23   |
|            |                | 600                                       | 16                   | 43 | 27 | 14   |
|            |                | 200                                       | 20                   | 49 | 26 | 6    |
|            |                | 200                                       | 18                   | 50 | 24 | 9    |
|            |                | 60  | 18                   | 45 | 25 | 13   |
| 23         | A21 A5         | 600                                       | 11                   | 40 | 27 | 22   |
|            |                | 600                                       | 11                   | 38 | 28 | 24   |
|            |                | 200                                       |                      |    |    |      |
|            |                | 200                                       | 19                   | 39 | 29 | 13   |
|            |                | 60  | 20                   | 40 | 28 | 13   |
| controles  | blanco         |   | 12                   | 35 | 28 | 25   |
|            | blanco 1       |   | 23                   | 33 | 33 | 10   |
|            | blanco 2       |   | 17                   | 41 | 22 | 20   |
|            | DMSO 1 al 10%  | 10% (v/v)                                 | 0                    | 0  | 0  | 0    |
|            | DMSO 2 al 10%  | 10% (v/v)                                 | 0                    | 0  | 0  | 0    |

## Ejemplo 5: Inducción de resistencia

La inducción de cepas de resistencia se determinó de acuerdo con el método de dilución macro en las condiciones del NCCLS (Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico - ahora Normas de Laboratorios Clínicos Instituto Wayne, PA, EE.UU., Pauta de NCCLS, M7-A5, vol. 20, Núm. 2; 2000).

En primer lugar, se determinaron las concentraciones inhibitoras mínimas (CIM) para los péptidos que se van examinar como se describe en el ejemplo 3.2. Para determinar la inducción de resistencia se seleccionaron diluciones continuas del péptido con concentraciones que oscilaban de 3 veces a 4 veces por encima y por debajo de la CIM. El ensayo se llevó a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos estériles con fondo redondo (poliestireno, de fondo en U, Greiner Bio-One GmbH, Alemania) y 200  $\mu\text{l}$  de volumen final por pocillo. El péptido o derivado de péptido liofilizados se disolvieron en agua y se diluyeron en relación con la CIM en TSB al 1% (caldo de soja con tripsina) para obtener un volumen de 100  $\mu\text{l}$ . Como ejemplo para un valor de CIM de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  se seleccionaron series de dilución de 32  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a 0,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Las diluciones dentro de la serie fueron a la mitad.

Las bacterias, *E. coli* BL21 AI, se cultivaron durante la noche a 37°C en caldo nutriente (NB, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Alemania) y se diluyeron a  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC)/ml en TSB al 1%. Para iniciar el análisis se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de la dilución de bacterias por pocillo de la placa de microtitulación cargada con el péptido. Después de incubar las placas durante 24 horas a 37°C, se determinó la absorción a 595 nm utilizando un lector de placas de microtitulación TECAN (Tecan, Alemania).

Los valores de CIM se calcularon como se describe en el ejemplo 3.2. El ensayo se repitió utilizando una nueva serie de dilución con concentraciones de péptido adaptadas a los nuevos valores de CIM determinados y utilizando el cultivo de bacterias que creció a pesar de la presencia del péptido inhibidor. Este cultivo de bacterias (1<sup>er</sup> pase) se diluyó a  $5 \times 10^6$  UFC/ml en TSB al 1%. Después de la incubación con la nueva serie de dilución de péptido durante 24 horas a 37°C, se determinó la absorción a 595 nm y de nuevo se calcularon valores de CIM. El ensayo se repitió de nuevo con el uso de nueva serie de dilución con concentraciones de péptido adaptadas a los nuevos valores de CIM determinados y utilizando el cultivo de bacterias que creció a pesar de la presencia del péptido inhibidor (2<sup>o</sup> pase). El mismo procedimiento se aplicó durante aproximadamente 8 pases más.

Como control se eligió un cultivo de *E. coli* BL21 AI sin tratar y se hizo pasar sin péptidos inhibidores. Todos los péptidos y derivados de péptidos se midieron por triplicado. El número de pases fue elegido dependiendo de la rapidez de inducción de resistencia y comúnmente fue de 10 pases a lo largo de 10 días continuos.

La Figura 5 muestra la inducción de resistencia, comparando la Apidaecina 1b de tipo salvaje (SEC ID NO: 2) y dos secuencias optimizadas de acuerdo con la invención (SEC ID NO: 88 y 137):

| SEC ID NO: | Nombre                   | Secuencia                               |
|------------|--------------------------|---|
| 2          | Apidaecina 1b ácido      | GNNRPVYIPQPRPPHPRL-OH                   |
| 88         | Api 1b O1 R10 guan.      | Guan-ONNRPVYIPRPRPPHPRL-NH <sub>2</sub> |
| 137        | Api 1b O1 R10 ácido guan | Guan-ONNRPVYIPRPRPPHPRL-OH              |

Para la secuencia de Apidaecina de tipo salvaje se obtuvieron las primeras cepas de resistencia ya después del segundo pase. La resistencia aumentó hasta un valor de CIM de 128 µg/ml en el 10<sup>o</sup> pase.

Sin embargo, para las dos secuencias de acuerdo con la invención (SEC ID NO: 88 y 137) no se observó inducción de resistencia en absoluto. Por lo tanto, la inducción de resistencia no depende del extremo C.

Los valores de CIM del control de *E. coli* BL21 AI no tratado, que se hizo pasar, no cambiaron durante el ensayo.

Estos resultados ilustran que los compuestos de acuerdo con la invención se pueden aplicar ventajosamente durante un largo periodo de tiempo como nuevos antibióticos sin la inducción de la resistencia en *E. coli*.

#### Ejemplo 6: Medición de la distribución *in vivo*

La distribución *in vivo* se midió en ratones usando derivados de péptidos marcados con fluorescencia.

Se activó el colorante fluorescente que absorbía cerca de infrarrojo Dy675 (Dyomics GmbH, Jena, Alemania) con DIC y se acopló al extremo N de los derivados de péptidos una vez completada la síntesis de péptidos en fase sólida (véase el ejemplo 1). Después, los péptidos se escindieron con TFA y se purificaron mediante RP-HPLC (véase el ejemplo 1).

Se inyectaron 40 µg de los derivados de péptido marcados por vía subcutánea (sc) o intra-peritoneal (ip) en ratones Balb/c hembra anestesiados con isoflurano y afeitados. Los animales se colocaron en la cámara del microscopio de fluorescencia bajo una exposición continua a isoflurano. Las fotografías de exposición a fluorescencia se tomaron con un microscopio IVIS ajustado a 695 nm de longitud de onda de emisión a cada minuto en los primeros 10 minutos después de la adición del péptido y cada 5 min posteriormente, hasta 65 min.

La Figura 6 muestra la formación de imágenes *in vivo* y la biodistribución del péptido marcado con fluorescencia Dy675-ONNRPVYIPRPRPPHPRL-NH<sub>2</sub> (SEC ID NO: 160) 60 y 65 minutos después de la inyección intra-peritoneal. Se muestran las imágenes después de 60 min (Fig. 6A, vientre, de baja intensidad), 65 min (Fig. 6B, vientre, de alta intensidad) y después de 65 min (Fig. 6C, dorso, de alta sensibilidad). La barra de color indica la intensidad de fluorescencia. El derivado de péptido marcado con fluorescencia se inyectó i.p. y se estudió su distribución mediante la formación de imágenes *in vivo* en varios momentos puntuales (Fig. 6). La Fig. 6C tomada del dorso demuestra claramente que los péptidos fueron enriquecidos en el cerebro, el hígado, y los dos riñones. En la Fig. 6B el cerebro también se tiñe mientras que los riñones y el hígado no se observan debido a la alta concentración de péptido en el sitio de la inyección.

La mayor parte del péptido inoculado se mantuvo después de 60 min en el sitio de la administración del fármaco. Pequeñas cantidades del péptido se distribuyeron por todo el cuerpo.

La promesa farmacéutica de los nuevos derivados de péptidos es que llegan a los diferentes órganos de los animales en 60 min incluyendo el cerebro, el hígado y el riñón, lo que demuestra claramente que los péptidos son distribuidos por la sangre a todos los órganos en el cuerpo.

Abreviaturas:

## ES 2 429 108 T3

Las siguientes abreviaturas se utilizan para referirse a los aminoácidos:

|   |                    |   |
|---|--------------------|---|
|   | Agp                | Ácido guanidinopropiónico                   |
| A | Ala                | Alanina                                     |
|   | $\beta$ Ala o bAla | beta-Alanina,<br>Ácido beta-aminopropiónico |
| R | Arg                | Arginina                                    |
|   | Har                | Homoarginina                                |
|   | $\beta$ Har o bHar | beta-Homoarginina                           |
|   | Cha                | Ciclohexilalanina                           |
|   | Chex               | Ácido 1-amino-ciclohexilcarbónico           |
|   | Dab o Dbu:         | Ácido diaminobutírico                       |
| D | Asp                | Ácido aspártico                             |
| N | Asn                | Asparragina                                 |
|   | Cit                | Citrulina                                   |
| C | Cys                | Cisteína                                    |
|   | GABA               | Ácido gamma ( $\gamma$ )-aminobutírico      |
| Q | Gln                | Glutamina                                   |
| E | Glu                | Ácido glutámico                             |
| G | Gly                | Glicina                                     |
| H | His                | Histidina                                   |
|   | Hyl                | $\delta$ -Hidroxilisina                     |
| I | Ile                | Isoleucina                                  |
| L | Leu                | Leucina                                     |
|   | MeLeu              | N-Metil Leucina                             |
| K | Lys                | Lisina                                      |
| M | Met                | Metionina                                   |
| O | Orn                | Ornitina                                    |
| P | Pro                | Prolina                                     |
|   | 3Hyp               | 3-Hidroxiprolina en cis o trans             |
|   | 4Hyp               | 4-Hidroxiprolina en cis o trans             |
|   | 3 <sup>c</sup> Hyp | cis-3-Hidroxiprolina                        |
|   | 3 <sup>t</sup> Hyp | trans-3-Hidroxiprolina                      |
|   | 4 <sup>c</sup> Hyp | cis-4-Hidroxiprolina                        |
|   | 4 <sup>t</sup> Hyp | trans-4-Hidroxiprolina                      |
| F | Phe                | Fenilalanina                                |
| T | Thr                | Treonina                                    |
|   | tercGly            | terc-butilglicina                           |
| Y | Tyr                | Tirosina                                    |
| S | Ser                | Serina                                      |
| W | Trp                | Triptófano                                  |
| V | Val                | Valina                                      |

Otras abreviaturas incluyen las siguientes:

- Ac: Acetilo
- Api: Apidaecina
- AMP: Péptidos antimicrobianos,
- 5 BSA: Albúmina de suero bovino,
- UFC: Unidades formadoras de colonias,
- DCM: Diclorometano,
- DMF: Dimetilformamida,
- EDTA: Tetraacetato de etilendiamina,
- 10 ESI: Ionización por electropulverización,
- DIPEA: N,N'-Diisopropiletilamina,
- For: Formilo (Metanoílo),
- Fmoc: 9-Fluorenilmetoxicarbonilo,
- Guan: grupo guanidino,
- 15 HBTU: hexafluorofosfato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-tetrametiluronio,
- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución,
- HMBA: Ácido 4-Hidroximetilbenzoico,
- MALDI: Desorción/ionización por láser asistida por matriz,
- Me: Metilo,
- 20 MeCN: Acetonitrilo,
- MeOH: Metanol,
- CIM: Concentración inhibidora mínima,
- MS: Espectrometría de masas,
- NB: Caldo nutriente,
- 25 OMe: Éster metílico,
- PBS: Solución salina tamponada con fosfato,
- PI: Yoduro de propidio,
- RP: Fase inversa,
- RT: Temperatura ambiente,
- 30 <sup>t</sup>Bu: *terc*-butilo,
- TCA: Ácido tricloroacético,
- TFA: Ácido trifluoroacético,
- TOF: Tiempo de vuelo,
- TSB: Caldo de agar con tripsina,
- 35 UV: Ultravioleta.



**Bibliografía**

En la solicitud se cita la siguiente bibliografía no de patente:

1. Thomasz, A. (1994) Multiple-antibiotic-resistant bacteria. *New Engl. J. Med.* 330: 1247-1251.
- 5 2. Wenzel, R.P. (1988) The mortality of hospital-acquired bloodstream infections: need for a vital statistic? *Int. J. Epidemiol.* 17: 225-227.
3. Moellering, R.C, Jr. (1998) Problems with antimicrobial resistance in Gram-positive cocci. *Clin. Infect. Dis.* 26: 1177-1178.
4. Hand, W.L. (2000) Current challenges in antibiotic resistance. *Adolesc. Med.* 11: 427-438.
5. Hooper, D.C. (2001) Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 337-341.
- 10 6. Jones, R.N. (2001) Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. *Chest* 119: 397S-404S.
7. Prachayasittikul, V., Lawung, R., y Bulow, L. (2000) Episome profiles and mobilizable beta lactamase plasmid in *Haemophilus ducreyi*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 31: 80-84.
- 15 8. Teuber, M. (1999) Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cell. Mol. Life Sci.* 30: 755-763.
9. Boman, H.G. (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 61-92.
10. Barra, D., Simmaco, M., y Boman, H.G. (1998) Gene encoded peptide antibiotics and innate immunity. Do 'animacules' have defense budgets? *FEBS Lett.* 430: 130-134.
- 20 11. Ludtke, S., He, K., y Huang, H. (1995) Membrane thinning caused by magainin 2. *Biochemistry* 34: 16764-16769.
12. Wimley, W.C., Selsted, M.E., y White, S.H. (1994) Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci.* 3: 1361-1373.
13. Shai, Y. (1995) Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. *Trends Biochem. Sci.* 20: 460-464.
- 25 14. Wade, D., Boman, A., Wahlin, B., Drain, C. M., Andreu, D., Boman, H. G., y Merrifield, R. B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4761-4765.
15. Steiner, H., Andreu, D., y Merrifield, R. B. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 939: 260-266.
- 30 16. Otvos, L., Jr., Bokonyi, K., Varga, I., Otvos, B.I., Hoffmann, R., Ertl, H.C.J., Wade, J.D., McManus, A.M., Craik, D.J., y Bulet, P. (2000) Insect peptides with improved protease-resistance protect mice against bacterial infection. *Protein Sci.* 9: 742-749.
17. Boman, H.G. (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 61-92.
18. Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., y Tempst, P. (1989) Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* 8: 2387-2391.
- 35 19. Casteels, P., y Tempst, P. (1994) Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-poreforming mechanism involving stereospecificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199: 339-45.
20. Bulet, P., Dimarcq, J.-L., Hetru, C., Lagueux, M., Charlet, M., Hegy, G., van Dorsselaer, A Hoffmann, J.A. (1993) A novel inducible antibacterial peptide from *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J. Biol. Chem.* 268: 14893-14897.
- 40 21. Mackintosh, J.A., Veal, D.A., Beattie, A.J., y Gooley, A.A. (1998) Isolation from an ant *Myrmecia gulosa* of two inducible O-glycosylated proline-rich antibacterial peptides. *J. Biol. Chem.* 273: 6139-6143.
22. Cociancich, S., Dupont, A., Hegy, G., Lanot, R., Holder, F., Hetru, C., Hoffmann, J.A., y Bulet P. (1994) Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, the sap sucking-bug *Pyrrhocoris apterus*. *Biochem. J.* 300: 567-575.
- 45 23. Merrifield, R.B. (1963) Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2154

24. Stemmer, W.P., Cramer, A., Ha, K.D., Brennan, T.M., Heyneker, H.L. (1995) Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene* 164: 49-53.
25. Gething, M.J. y Sambrook, J. (1981) Cell-surface expression of influenza haemagglutinin from a cloned DNA copy of the RNA gene. *Nature*. 293: 620-625.
- 5 26. Maeno, M., Taguchi, S., Momose, H. (1993) Production of antibacterial peptide 'apidaecin' using the secretory expression system of *Streptomyces*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57: 1206-1207.
27. Zhou, Q.F., Luo, X.G., Ye, L., Xi, T. (2007) High-level production of a novel antimicrobial peptide perinerin in *Escherichia coli* by fusion expression. *Curr. Microbiol.* 54: 366-370.
- 10 28. Si, L.G., Liu, X.C., Lu, Y.Y., Wang, G.Y., Li, W.M. (2007) Soluble expression of active human beta-defensin-3 in *Escherichia coli* and its effects on the growth of host cells. *Chin. Med. J. (Engl.)*. 120: 708-713.
29. Noren, C.J., Anthony-Cahill, S.J., Griffith, M.C. y Schultz, P.G. (1989) A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Science* 244: 182-188.
30. Ellman, J., Mendel, D., Anthony-Cahill, S., Noren, C.J., Schultz, P.G. (1991) Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins. *Meth. Enzymol.* 202: 301-336.
- 15 31. W. F. Anderson (1998) Human gene therapy. *Nature* 392 Supp., 25-30
32. *Pharmaceutical Biotechnology* (Ed. D. J. A. Crommelin y R. D. Sindelar), Harwood Academic Publishers, 1997, pp. 8-20, 53-70, 123-152, 167-180.
33. *Protein Synthesis: Methods and Protocols*, Ed. R. Martin, Humana Press, 1998, pp. 1-442.
34. *Amino Acid and Peptide Synthesis*, Oxford University Press, 1997, pp. 1 -89.
- 20 35. *Solid-Phase Peptide Synthesis* (Ed. G. B. Fields) Academic Press, 1997, p. 1-780
36. Tam, J.P. (1998) Synthetic Peptide Vaccine Design: Synthesis and Properties of a High-Density Multiple Antigenic Peptide System, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5409-5413.
37. Posnett, D.N., McGrath, H. y Tam, J.P. (1988) A novel method for producing anti-peptide antibodies. Production of site-specific antibodies to the T cell antigen receptor beta-chain. *J. Biol. Chem.* 263: 1719-1725.
- 25 38. Morell, M., Espargaró, A., Avilés, F.X. y Ventura, S. (2007) Detection of transient protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation: The Abl-SH3 case. *Proteomics* 7: 1023-1036.
39. G. B. Fields y Noble, R. (1990) Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* 35: 161-214
- 30 40. Gausepohl, H., Pielers, H., Frank, R.W. (1992) in "Peptides: chemistry, structure and biology" (ed. J. A. Smit J.E. Rivier), p.523, ESCOM, Leiden.
41. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis (Ed. W.C. Chan y P.D. White) in *The Practical Approaches Series* (Ed. B.D. Hames), University Press, Oxford, p. 63.
- 35 42. Hoffmann, R., Vasko M. y Otvos, L., Jr. 1997. Serum stability of phosphopeptides. *Anal. Chim. Acta* 352: 319-325.
43. Ryge, T.S. y Hansen, P.R. (2006) Potent antibacterial lysine-peptoid hybrids identified from a positional scanning combinatorial library. *Bioorg. Med. Chem.* 14: 4444-4451
44. Park, Y., Lee, D.G., Jang, S.H., Woo, E.R., Jeong, H. G., Choi, C.H., y Hahm, V.S. (2003). A Leu-Lys-rich antimicrobial peptide: activity and mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1645: 172-182.
- 40

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- <110> Universität Leipzig
- <120> Péptidos antibióticos
- <130> 00401P0026DEWO
- 5 <150> DE 10 2007 036 128
- <151> 23.07.2007
- <160> 167
- <210> 1
- <211> 18
- 10 <212> PRT
- <213> Apis mellifera
- <400> 1
- Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro
- 1 5 10 15
- Arg Ile**
- 15 <210> 2
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> Apis mellifera
- <400> 2
- Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro
- 1 5 10 15
- Arg Leu**
- 20 <210> 3
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> artificial
- <220>
- 25 <221> característica\_miscelánea <222> (1)..(1)
- <223> Xaa es N-Acetilglicina
- <220>
- <221> característica\_miscelánea
- <222> (18)..(18)
- 30 <223> Xaa es Isoleucina-amida
- <400> 3
- Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro
- 1 5 10 15
- Arg Xaa**
- 35 <210> 4
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> artificial
- <220>
- <221> característica\_miscelánea
- <222> (18)..(18)
- 40 <223> Xaa es Isoleucina-amida
- <400> 4

Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

- <210> 5
- <211> 18
- <212> PRT
- 5 <213> artificial
- <220>
- <221> característica\_misclánea
- <222> (1)..(1)
- <223> Xaa es N-Acetilglicina

- 10 <220>
- <221> característica\_misclánea
- <222> (18)..(18)
- <223> Xaa es Leucina-amida

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

- <210> 6
- <211> 18
- <212> PRT
- 15 <213> artificial
- <220>
- <221> característica\_misclánea
- <222> (18)..(18)
- <223> Xaa es Leucina-amida

Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

- <210> 7
- <211> 18
- <212> PRT
- 25 <213> artificial
- <220>
- <221> característica\_misclánea
- <222> (1)..(1)
- <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

- 30 <220>
- <221> característica\_misclánea
- <222> (18)..(18)
- <223> Xaa es Leucina-amida

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

- 40 <210> 8

- <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial
- <220>  
 5 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida
- <400> 8  
 O r n A s n A s n A r g P r o V a l T y r I l e P r o G n P r o A r g P r o P r o H i s P r o  
 1 5 10 15
- A r g X a a**
- 10 <210> 9  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial
- <220>  
 15 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-amida
- <400> 9  
 G y A s n A s n A r g P r o V a l T y r I l e P r o O r n P r o A r g P r o P r o H i s P r o  
 1 5 10 15
- A r g X a a**
- 20 <210> 10  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> artificial
- <400> 10  
 G y A s n A s n L y s P r o V a l T y r I l e P r o A r g P r o A r g P r o P r o H i s P r o  
 1 5 10 15
- A r g L e u V a l**
- 25 <210> 11  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial
- <220>  
 30 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida
- <400> 11  
 G y A s n A s n A r g P r o V a l T y r I l e P r o O r n 4 H y p A r g P r o P r o H i s P r o  
 1 5 10 15
- A r g X a a**
- 35 <210> 12  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial
- <220>  
 40 <221> característica-misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 12  
 Orn Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Orn Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 13  
 <211> 18  
 5 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 10 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

15 <400> 13  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Orn Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 14  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 20 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-amida

25 <400> 14  
 Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 15  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 30 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-amida

35 <400> 15  
 Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg 4Hyp Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 16  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 40 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)

<223> Xaa es Isoleucina-amida

<400> 16

Or n Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

Arg Xaa

5  
<210> 17  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> artificial

10  
<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (18)..(18)  
<223> Xaa es Isoleucina-amida

<400> 17

Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Lys Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

Arg Xaa

15  
<210> 18  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> artificial

20  
<220>  
<221> característica-misclánea  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

25  
<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (18)..(18)  
<223> Xaa es Isoleucina-amida

<400> 18

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

Arg Xaa

30  
<210> 19  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> artificial

35  
<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (18)..(18)  
<223> Xaa es Isoleucina-amida

<400> 19

Gly Asn Asn Arg 4Hyp Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

Arg Xaa

40  
<210> 20  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>

<221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 20  
 G y Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg 4Hyp Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

5 Arg Xaa

<210> 21  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 21  
 Lys Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Lys Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

15 Arg Xaa

<210> 22  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-lisina

25 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 22  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Lys Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

30 <210> 23  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<400> 23  
 Orn Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

35 Arg Pro Ile Arg Val  
 20

<210> 24  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> artificial

40 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(1)



<223> Xaa es alfa-Acetil-ornitina

<400> 24

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

Arg Pro Ile Arg Val  
20

5 <210> 25  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> artificial

10 <220>  
<221> característica-miscelánea  
<222> (18)..(18)  
<223> Xaa es Valina-amida

<400> 25

Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

Arg Leu Xaa

15 <210> 26  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> artificial

20 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (18)..(18)  
<223> Xaa es Isoleucina-amida

<400> 26

Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Leu Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

Arg Xaa

25 <210> 27  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> artificial

30 <220>  
<221> característica-miscelánea  
<222> (21)..(21)  
<223> Xaa es Valina-amida

<400> 27

Orn Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

Arg Pro Ile Arg Xaa  
20

35 <210> 28  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> artificial

40 <220>  
<221> característica-miscelánea  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa es alfa-Acetil-ornitina

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa es Valina-amida

5 <400> 28  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15  
 Arg Pro Ile Arg Xaa  
 20

<210> 29  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 10 <213> artificial

<400> 29  
 Orn Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15  
 Arg Leu Val

<210> 30  
 <211> 19  
 15 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 20 <223> Xaa es alfa-Acetil-ornitina

<400> 30  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15  
 Arg Leu Val

<210> 31  
 <211> 19  
 25 <212> PRT  
 <213> artificial

<400> 31  
 Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15  
 Arg Leu Val

<210> 32  
 <211> 18  
 30 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 35 <223> Xaa es alfa-Acetil-ornitina

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 40 <223> Xaa es N-Metil-leucina-amida

<400> 32

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

5 <210> 33  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es N-Metil-leucina-amida

10 <400> 32  
 Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

15 <210> 34  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es N-Metil-leucina-amida

<400> 34  
 Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

25 <210> 35  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

30 <220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Ciclohexilalanina-amida

<400> 35  
 Orn Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Orn Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

35 <210> 36  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

40 <220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es N-Metil-leucina-amida

<400> 36  
**Xaa** Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 37  
 <211> 18  
 5 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 10 <223> Xaa es Ciclohexilalanina-amida

<400> 37  
**Gly** Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 38  
 <211> 18  
 15 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 20 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 38  
**Orn** Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 39  
 <211> 18  
 25 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 30 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 39  
**Xaa** Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 40  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 40 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-miscelánea

<222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 5 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 40  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg 4Hyp Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

**Arg Xaa**

<210> 41  
 10 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 15 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 20 <223> Xaa es Fenilalanina-amida

<400> 41  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro G n Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

**Arg Xaa**

<210> 42  
 <211> 18  
 25 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 30 <223> Xaa es Fenilalanina-amida

<400> 42  
 Or n Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro G n Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

**Arg Xaa**

<210> 43  
 <211> 17  
 35 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (17)..(17)  
 40 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 43  
 Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro G n Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

**Xaa**

<210> 44  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Fenilalanina-amida

<400> 44  
 G y Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro G n Pro Arg Pro Pro Hi s Pro  
 1 5 10 15

10 Ar g Xaa

<210> 45  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

15 <220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 45  
 Or n Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg 4Hyp Arg Pro Pro Hi s Pro  
 1 5 10 15

20 Ar g Xaa

<210> 46  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

25 <220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-Acetil-ornitina

30 <220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Ciclohexilalanina-amida

<400> 46  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Or n Pro Arg Pro Pro Hi s Pro  
 1 5 10 15

Ar g Xaa

35 <210> 47  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

40 <220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es N-Metil-leucina-amida

<400> 47

Or n Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

- <210> 48
- <211> 18
- <212> PRT
- 5 <213> artificial
- <220>
- <221> característica\_misclánea
- <222> (1)..(1)
- <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina
- 10 <220>
- <221> característica-misclánea
- <222> (18)..(18)
- <223> Xaa es Leucina-metiléster

<400> 48  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

- <210> 49
- <211> 18
- <212> PRT
- 15 <213> artificial
- <220>
- 20 <221> característica-misclánea
- <222> (1)..(1)
- <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina
- <220>
- 25 <221> característica-misclánea
- <222> (18)..(18)
- <223> Xaa es Leucina-metiléster

<400> 49  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Or n Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

- <210> 50
- <211> 18
- <212> PRT
- 30 <213> artificial
- <220>
- 35 <221> característica\_misclánea
- <222> (1)..(1)
- <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina
- <220>
- 40 <221> característica\_misclánea
- <222> (18)..(18)
- <223> Xaa Leucina-metiléster
- <400> 50

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

Arg Xaa

5 <210> 51  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> característica-miscelánea  
<222> (18)..(18)  
<223> Xaa es Isoleucina-amida

10 <400> 51  
Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro Lys Pro  
1 5 10 15

Arg Xaa

15 <210> 52  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (18)..(18)  
<223> Xaa es Prolina-amida

20 <400> 52  
Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro Lys Pro  
1 5 10 15

Arg Xaa

25 <210> 53  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (18)..(18)  
<223> Xaa es Isoleucina-amida

30 <400> 53  
Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro Arg Pro  
1 5 10 15

Arg Xaa

35 <210> 54  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> característica-miscelánea  
<222> (19)..(19)  
<223> Xaa es Isoleucina-amida

40 <400> 54



Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Pro Xaa

<210> 55  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 5 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-amida

10 <400> 55  
 Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Leu Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 56  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 15 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-amida

20 <400> 56  
 Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Leu Pro Lys Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 57  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 25 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-amida

30 <400> 57  
 y

<210> 58  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 35 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-amida

40 <400> 58  
 Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln 4Hyp Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 59

<211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 5 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-amida

<400> 59  
 G y Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg 4Hyp Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

10 <210> 60  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 15 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-amida

<400> 60  
 G y Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro 4Hyp His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

20 <210> 61  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 25 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-amida

<400> 61  
 G y Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His 4Hyp  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 62  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 35 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-amida

<400> 62  
 Q n Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 63  
 <211> 18  
 <212> PRT

<213> artificial

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Xaa es alfa-Acetil-ornitina

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-amida

10 <400> 63  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 64  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 15 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-amida

20 <400> 64  
 Orn Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 65  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 25 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

30 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-amida

<400> 65  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

35 Arg Xaa

<210> 66  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

40 <220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 66

Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

5 <210> 67  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es N-Acetil-glicina

10 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 67  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

15 Arg Xaa

<210> 68  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Xaa es Valina-amida

<400> 68  
 Gly Asn Asn Lys Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

25 Arg Leu Xaa

<210> 69  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> artificial

30 <400> 69  
 Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Leu Val

35 <210> 70  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<400> 70  
 Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Pro Ile Arg Val  
 20

<210> 71

<211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 5 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-Acetil-ornitina  
  
 <220>  
 10 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Ciclohexilalanina-amida  
  
 <400> 71  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15  
  
 Arg Xaa  
  
 15 <210> 72  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 20 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-Acetil-ornitina  
  
 <220>  
 25 <221> característica-misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es D-Leucina-amida  
  
 <400> 72  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15  
  
 Arg Xaa  
  
 30 <210> 73  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 35 <221> característica-misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-Acetil-ornitina  
  
 <220>  
 40 <221> característica-misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es terc-Glicina-amida  
  
 <400> 73  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15  
  
 Arg Xaa  
  
 45 <210> 74  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es Alfa-N-Acetil-orntina

5

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es beta-Alanina-amida

<400> 74  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

10

**Arg Xaa**  
 <210> 75  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

15

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-orntina

20

<220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es amida de ácido 1-aminociclohexilcarbónico

<400> 75  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

**Arg Xaa**

25

<210> 76  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

30

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Ciclohexil-alanina-amida

<400> 76  
 Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

**Arg Xaa**

35

<210> 77  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

40

<220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es D-Leucina-amida

<400> 77

Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

Arg Xaa

5 <210> 78  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (18)..(18)  
<223> Xaa es terc-Glicina-amida

10 <400> 78  
Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

Arg Xaa

15 <210> 79  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (18)..(18)  
<223> Xaa es beta-Alanina-amida

20 <400> 79  
Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

Arg Xaa

25 <210> 80  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> característica-misclánea  
<222> (18)..(18)  
<223> Xaa es amida de ácido 1-Amino-ciclohexilcarbónico

30 <400> 80  
Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

Arg Xaa

35 <210> 81  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> característica-misclánea  
<222> (18)..(18)  
<223> Xaa es Leucina-amida

40 <400> 81

Or n Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Or n Xaa

- <210> 82
- <211> 18
- <212> PRT
- 5 <213> artificial
- <220>
- <221> característica-miscelánea
- <222> (1)..(1)
- <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

- 10 <220>
- <221> característica-miscelánea
- <222> (18)..(18)
- <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 82

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

15 Or n Xaa

- <210> 83
- <211> 19
- <212> PRT
- <213> artificial
- 20 <220>
- <221> característica\_miscelánea
- <222> (1)..(1)
- <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina
- <220>

- 25 <221> característica\_miscelánea
- <222> (19)..(19)
- <223> Xaa es ácido 2,4-Diaminobutírico sustituido con alfa-N-Acetil-Orn-Asn-Asn-Arg-Pro-Val-Tyr-Ile-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Pro-His-Pro-A rg-Leu-

<400> 83

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

30 Arg Leu Xaa

- <210> 84
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> artificial
- 35 <220>
- <221> característica-miscelánea
- <222> (1)..(1)
- <223> Xaa es N-Formil-glicina

- 40 <220>
- <221> característica-miscelánea
- <222> (18)..(18)
- <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 84



Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

5 <210> 85  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es N-Guanido-glicina

10 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 85  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

15 Arg Xaa

<210> 86  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa es Valina-amide

<400> 86  
 Orn Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

25 Arg Pro Ile Arg Xaa  
 20

<210> 87  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> artificial

30 <220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-oritina

35 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa es Valina-amida

<400> 87  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Pro Ile Arg Xaa  
 20

40 <210> 88  
 <211> 18

<212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 5 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Guanido-ornitina

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 10 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 88  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

**Arg Xaa**

<210> 89  
 <211> 18  
 15 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-misclánea  
 20 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa es Citrulina

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-amida

25 <400> 89  
 Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Xaa Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

**Arg Xaa**

<210> 90  
 <211> 18  
 30 <212> PRT  
 <213> artificial

<400> 90  
 <220>  
 <221> característica-misclánea  
 35 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-amida

<400> 89  
 Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg 4Hyp Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

**Arg Xaa**

<210> 91  
 <211> 18  
 40 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (10)..(10)  
 45 <223> Xaa es Citrulina

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-amida

5 <400> 91  
 G y Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Xaa 4Hyp Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 92  
 <211> 17  
 <212> PRT

10 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Xaa es Isoleucina-amida

15 <400> 92  
 Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro Arg  
 1 5 10 15

Xaa

<210> 93  
 <211> 18  
 <212> PRT

20 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Prolina-amida

25 <400> 93  
 G y Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro Pro Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 94  
 <211> 19  
 <212> PRT

30 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Xaa es Isoleucina-amida

35 <400> 94  
 G y Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro Lys Pro  
 1 5 10 15

Arg Pro Xaa

<210> 95  
 <211> 18  
 <212> PRT

40 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_misclánea

<222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 95  
**G** y **A**sn **A**sn **L**ys **P**ro **V**al **T**yr **I**le **P**ro **G**n **P**ro **A**rg **P**ro **P**ro **H**i s **P**ro  
 1 5 10 15

**A**rg **X**aa

5 <210> 96  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 10 <221> característica\_misclánea  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Xaa es Valina-amida

<400> 96  
**G** y **A**sn **S**er **A**rg **P**ro **V**al **T**yr **I**le **P**ro **G**n **P**ro **A**rg **P**ro **P**ro **H**i s **P**ro  
 1 5 10 15

**A**rg **L**eu **X**aa

15 <210> 97  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 20 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 97  
**G** y **A**sn **S**er **L**ys **P**ro **V**al **T**yr **I**le **P**ro **A**rg **P**ro **A**rg **P**ro **P**ro **H**i s **P**ro  
 1 5 10 15

**A**rg **X**aa

25 <210> 98  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 30 <221> característica-misclánea  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa es beta-Homoarginina

<220>  
 35 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-amida

<400> 98  
**G** y **A**sn **A**sn **A**rg **P**ro **V**al **T**yr **I**le **P**ro **X**aa **P**ro **A**rg **P**ro **P**ro **H**i s **P**ro  
 1 5 10 15

**A**rg **X**aa

40 <210> 99  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa es beta-Homoarginina

5 <220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 99  
 G y Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Xaa Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

10 Arg Xaa

<210> 100  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

15 <220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 100  
 G y Asn Asn Lys Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

20 Arg Xaa

<210> 101  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

25 <220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 101  
 G y Asn Ser Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

30 Arg Xaa

<210> 102  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

35 <220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 102  
 Or n Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Or n 4Hyp Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

40 Arg Xaa

<210> 103  
 <211> 18  
 <212> PRT

<213> artificial

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

10 <400> 103  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Orn 4Hyp Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 104  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 15 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

20 <400> 104  
 Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Orn 4Hyp Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 105  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 25 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

30 <400> 105  
 Orn Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gn 4Hyp Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 106  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 35 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

40 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 106

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln 4Hyp Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

5 <210> 107  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Valina-amida

10 <400> 107  
 Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

15 <210> 108  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<400> 108  
 Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Val

20 <210> 109  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa es Prolina-amida

25 <400> 109  
 Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Pro Ile Pro Xaa  
 20

30 <210> 110  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa es Valina-amida

35 <400> 110  
 Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Pro Ile Arg Xaa  
 20

<210> 111

<211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5 <220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 111  
**G** y **A**sn **A**sn **A**rg **P**ro **V**al **T**yr **I**le **P**ro **G**n **P**ro **A**rg **P**ro **P**ro **H**is **P**ro  
 1 5 10 15

**P**ro **X**aa

10 <210> 112  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

15 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 112  
**O**rn **A**sn **A**sn **A**rg **P**ro **V**al **T**yr **I**le **P**ro **O**rn **P**ro **A**rg **P**ro **P**ro **H**is **P**ro  
 1 5 10 15

**P**ro **X**aa

20 <210> 113  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

25 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

30 <220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 113  
**X**aa **A**sn **A**sn **A**rg **P**ro **V**al **T**yr **I**le **P**ro **O**rn **P**ro **A**rg **P**ro **P**ro **H**is **P**ro  
 1 5 10 15

**P**ro **X**aa

35 <210> 114  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

40 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Tirosina-amida

<400> 114  
**G** y **A**sn **A**sn **A**rg **P**ro **V**al **T**yr **I**le **P**ro **G**n **P**ro **A**rg **P**ro **P**ro **H**is **P**ro  
 1 5 10 15

**A**rg **X**aa



<210> 115  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 5 <220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Xaa es Arginina-amida  
  
 <400> 115  
 G l y A s n A s n A r g P r o V a l T y r I l e P r o G l n P r o A r g P r o P r o H i s P r o  
 1 5 10 15  
 10 Xaa  
 <210> 116  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 15 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina  
 20 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-metiléster  
 <400> 116  
 Xaa A s n A s n A r g P r o V a l T y r I l e P r o G l n P r o A r g P r o P r o H i s P r o  
 1 5 10 15  
 A r g Xaa  
 25 <210> 117  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 30 <220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina  
 35 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-metiléster  
 <400> 117  
 Xaa A s n A s n A r g P r o V a l T y r I l e P r o G l n P r o A r g P r o P r o H i s P r o  
 1 5 10 15  
 A r g Xaa  
 40 <210> 118  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 45 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Isoleucina-metiléster

5 <400> 118  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 119  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 10 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Xaa es ácido 2,4-Diaminobutírico sustituido con Orn-Asn-Asn-Arg-Pro-Val-Tyr-Ile-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Pro-  
 15 His-Pro-Arg-Leu-

<400> 119  
 Orn Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Leu Xaa

<210> 120  
 <211> 18  
 20 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 25 <223> Xaa es alfa-N-Guanido-ornitina

<220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

30 <400> 120  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gn Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 121  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 35 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Xaa es beta-Homoarginina

40 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 121

Orn Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Xaa Xaa

<210> 122  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Xaa es ácido 2,4-Diaminobutírico sustituido con

Gly-Asn-Asn-Arg-Pro-Val-Tyr-Ile-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Pro-His-Pro-Arg-Leu-

<400> 122

Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

10 Arg Leu Xaa

<210> 123  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> artificial

15

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es N-Guanido-glicina

20

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Xaa es ácido 2,4-Diaminobutírico sustituido con N-Guanido-Gly-Asn-Asn-Arg-Pro-Val-Tyr-Ile-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Pro-His-Pro-Arg-Leu

<400> 123

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

25 Arg Leu Xaa

<210> 124  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> artificial

30

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

35

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Xaa es ácido 2,4-Diaminobutírico sustituido con alfa-N-Acetil-Orn-Asn-Asn-Arg-Pro-Val-Tyr-Ile-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Pro-His-Pro-Arg-Leu-

<400> 124

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

40 Arg Leu Xaa

<210> 125  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Guanido-ornitina

10 <220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Xaa es ácido 2,4-Diaminobutírico sustituido con alfa-N-Guanido-Orn-Asn-Asn-Arg-Pro-Val-Tyr-Ile-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Pro-His- Pro-Arg-Leu-

<400> 125  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

15 Arg Leu Xaa

<210> 126  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <400> 126  
 Orn Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Pro Ile Arg Val  
 20

<210> 127  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> artificial

25 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

30 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Xaa es ácido 2,4-Diaminobutírico sustituido con alfa-N-Acetil-Orn-Asn-Asn-Arg-Pro-Val-Tyr-Ile-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Pro-His-Pro-Orn-Leu-

35 <400> 127  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Orn Leu Xaa

<210> 128  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> artificial

40 <220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Guanido-ornitina

45 <220>

<221> característica-miscelánea  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Xaa es ácido 2,4-Diaminobutírico sustituido con alfa-N-Guanido-Orn-Asn-Asn-Arg- Pro-Val-Tyr-Ile-Pro-Arg-  
 Pro-Arg-Pro-Pro-His-Pro-Orn-Leu-

5 <400> 128  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Orn Leu Xaa

<210> 129

<211> 19

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<221> característica\_miscelánea

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es N-Acetil-glicina

15 <220>

<221> característica-miscelánea

<222> (19)..(19)

<223> Xaa es ácido 2,4-Diaminobutírico sustituido con N-Acetil-Gly-Asn-Asn-Arg-Pro-Val-Tyr-Ile-Pro-Gln- Pro-Arg-  
 Pro-Pro-His-Pro-Arg-Leu-

20 <400> 129

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Leu Xaa

<210> 130

<211> 19

<212> PRT

25 <213> artificial

<220>

<221> característica\_miscelánea

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es N-Guanido-glicina

30 <220>

<221> característica-miscelánea

<222> (19)..(19)

<223> Xaa es ácido 2,4-Diaminobutírico sustituido con N-Guanido-Gly-Asn-Asn-Arg-Pro-Val-Tyr-Ile-Pro-Gln- Pro-  
 Arg-Pro-Pro-H s- Pro-Arg- Leu-

35 <400> 130

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Leu Xaa

<210> 131

<211> 18

<212> PRT

40 <213> artificial

<220>

<221> característica-miscelánea

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

45 <220>

<221> característica\_miscelánea

<222> (17)..(17)  
 <223> Xaa es Homoarginina

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 5 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 131  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Xaa Xaa

10 <210> 132  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-misclánea  
 15 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es N-Acetil-glicina

<220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (17)..(17)  
 20 <223> Xaa es Homoarginina

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

25 <400> 132  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Xaa Xaa

30 <210> 133  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es N-Guanido-glicina

35 <220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Xaa es Homoarginina

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

40 <400> 133  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Xaa Xaa

45 <210> 134

- <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial
- 5 <220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Guanido-ornitina
- 10 <220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida
- <400> 134  
**Xaa** Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15
- Orn Xaa**
- 15 <210> 135  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial
- 20 <220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Polietilenglicol-ornitina
- 25 <220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida
- <400> 135  
**Xaa** Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15
- Arg Xaa**
- 30 <210> 136  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial
- 35 <220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida
- <400> 136  
**Gly** Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Ala Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15
- Ala Xaa**
- 40 <210> 137  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial
- 45 <220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Guanido-ornitina

<400> 137

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

Arg Leu

<210> 138

<211> 18

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<221> característica-miscelánea

<222> (17)..(17)

10 <223> Xaa es Citrulina

<220>

<221> característica\_miscelánea

<222> (18)..(18)

<223> Xaa es Leucina-amida

15 <400> 138

Orn Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

Xaa Xaa

<210> 139

<211> 18

20 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<221> característica-miscelánea

<222> (18)..(18)

<223> Xaa es Leucina-amida

25 <400> 139

Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

Ala Xaa

<210> 140

<211> 18

30 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<221> característica\_miscelánea

<222> (18)..(18)

<223> Xaa es Leucina-amida

35 <400> 140

Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Ala Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 141

<211> 18

40 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<221> característica\_miscelánea



<222> (18)..(18)

<223> Xaa es Glicina-amida

<400> 141

Leu Arg Pro His Pro Pro Arg Pro Gln Pro Ile Tyr Val Pro Arg Asn  
1 5 10 15

Asn Xaa

5 <210> 142

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <221> característica-miscelánea

<222> (15)..(15)

<223> Xaa es Leucina-amida

<400> 142

Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro Ala Xaa  
1 5 10 15

15 <210> 143

<211> 18

<212> PRT

<213> artificial

<220>

20 <221> característica\_miscelánea

<222> (18)..(18)

<223> Xaa es Leucina-amida

<400> 143

Gly Asn Asn Glu Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

Arg Xaa

25 <210> 144

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial

<400> 144

Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

30 Arg

<210> 145

<211> 18

<212> PRT

<213> artificial

35 <220>

<221> característica\_miscelánea

<222> (17)..(17)

<223> Xaa es Arginal

<220>

40 <221> característica\_miscelánea

<222> (18)..(18)

<223> Xaa es Leucina-amida

<400> 145

Or n Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

**Xaa Xaa**

<210> 146  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 5 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Guanido-ornitina

10 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Xaa es ácido alfa-Amino-beta-guanidinopropiónico

15 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 146

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

**Xaa Xaa**

20 <210> 147  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

25 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Guanido-ornitina

30 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-propil-éster

<400> 147

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

**Arg Xaa**

35 <210> 148  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

40 <220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es N-Acetil-glicina

45 <220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Xaa es Citrulina

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

5 <400> 148  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Xaa Xaa

<210> 149  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 10 <213> artificial

<220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es N-Guanido-glicina

15 <220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Xaa es Citrulina

20 <220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 149  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Xaa Xaa

25 <210> 150  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

30 <220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

35 <220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Xaa es Citrulina

40 <220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 150  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Xaa Xaa

45 <210> 151  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Guanido-ornitina

5

<220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Xaa es Citrulina

10

<220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 151  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Xaa Xaa

15

<210> 152  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20

<220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

25

<220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Xaa es D-Arginina

30

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 152  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Xaa Xaa

35

<210> 153  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

40

<220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Xaa es Metil-arginina

45

<220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 153

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

**Xaa Xaa**

<210> 154  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 5 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-Ornitina

10 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Xaa es Nitro-arginina

15 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 154

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

20 **Xaa Xaa**

<210> 155  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

25 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Guanido-Ornitina

30 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Xaa es Homoarginina

35 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 155

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

**Xaa Xaa**

40 <210> 156  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

45 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Guanido-ornitina

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

5 <400> 156  
 Xaa Asn Asn Arg 4Hyp Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

**Arg Xaa**

<210> 157  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 10 <213> artificial

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Guanido-ornitina

15 <220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 157  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile 4Hyp Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

20 **Arg Xaa**

<210> 158  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

25 <220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Guanido-ornitina

30 <220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 158  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg 4Hyp Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

**Arg Xaa**

35 <210> 159  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> artificial

40 <220>  
 <221> característica-misclánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es N-Guanido-glicina

45 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Xaa es Leucina-amida

<400> 159

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 160

<211> 18

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<221> característica-miscelánea

<222> (1)..(1)

10 <223> Xaa es Dy 675-N-alfa-Ornitina

<220>

<221> característica-miscelánea

<222> (18)..(18)

<223> Xaa es Leucina-amida

15 <400> 160

Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Arg Pro Arg Pro Pro His Pro  
1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 161

<211> 19

<212> PRT

20 <213> Drosphilamelanogaster

<400> 161

Gly Lys Pro Arg Pro Tyr Ser Pro Arg Pro Thr Ser His Pro Arg Pro  
1 5 10 15

Ile Arg Val

<210> 162

<211> 16

25 <212> PRT

<213> Myrmeciagulosa

<400> 162

Gly Arg Pro Asn Pro Val Asn Asn Lys Pro Thr Pro Tyr Pro His Leu  
1 5 10 15

<210> 163

30 <211> 20

<212> PRT

<213> Pyrrhocorisapterus

<400> 163

Val Asp Lys Gly Ser Tyr Leu Pro Arg Pro Thr Pro Pro Arg Pro Ile  
1 5 10 15

Tyr Asn Arg Asn  
20

35 <210> 164

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial

<220>

40 <221> característica\_miscelánea

<222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

<400> 164  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg

5 <210> 165  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> a

10 <220>  
 <221> característica-miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es alfa-N-Acetil-ornitina

<400> 165  
 Xaa Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

15 <210> 166  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> a

<400> 166  
 Ala Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

20 Arg Ile

<210> 167  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> a

25 <400> 167  
 Gly Ala Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Ile



## REIVINDICACIONES

1. Un péptido con al menos 16 residuos y la fórmula general



en donde

- 5  $X_1$  es un residuo cargado positivamente;
- $X_2$  es un residuo con una cadena lateral polar o un radical que tiene una carga neta positiva o una cadena lateral cargada positivamente en condiciones fisiológicas;
- $X_3$  es un radical que tiene una carga neta positiva o una cadena lateral cargada positivamente en condiciones fisiológicas;
- 10  $X_4$  es un residuo neutro con una cadena lateral polar, preferiblemente no glutamina, o un radical que tiene una carga neta positiva o una cadena lateral cargada positivamente en condiciones fisiológicas;
- $X_5$  es prolina o un derivado de prolina;
- siendo  $\text{Sub}_1$  una modificación del grupo amino N-terminal, en el que la modificación es guanidación;
- siendo  $\text{Sub}_2$  el grupo carboxilo C-terminal libre del aminoácido C-terminal o una modificación del grupo carboxilo C-terminal.
- 15
2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende al menos un residuo adicional  $X_6$  y/o  $X_7$  en  $\text{Sub}_2$ , mientras que  $X_6$  se selecciona entre prolina o un derivado de prolina o un radical que tiene una carga neta positiva o una cadena lateral cargada positivamente en condiciones fisiológicas y  $X_7$  se selecciona entre de prolina o derivados prolina, un radical polar o un radical hidrófobo.
- 20
3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el residuo  $X_1$  se selecciona del grupo que consiste en arginina, lisina,  $\delta$ -hidroxilisina, homoarginina, D-arginina, metilarginina, alfa-N-metilarginina, nitroarginina, N(G)-nitroarginina, nitrosoarginina, N(G)-nitrosoarginina, arginal, ácido guanidinopropiónico, ácido 2,4-diaminobutírico,  $\beta$ -homoarginina,  $\epsilon$ -N-metil lisina, alo-hidroxilisina, ácido 2,3-diaminopropiónico, ácido 2,2'-diaminopimélico, ornitina, dimetilarginina simétrica, dimetilarginina asimétrica, ácido 2,6-diaminohexanoico, histidina, 1-metil-histidina, 3-metil-histidina, y 3-amino-tirosina.
- 25
4. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el residuo  $X_2$  se selecciona del grupo que consiste en asparragina, glutamina, serina, treonina, cis-4-hidroxirolina, trans-4-hidroxirolina, cis-3-hidroxirolina, trans-3-hidroxirolina, citrulina, N-metilserina, N-metilglicina, dihidroxifenilalanina, N-etilasparragina, N-etilglicina, homoserina, penicilamina, tetrahidropiraniilglicina, alo-treonina, 3,5-dinitrotirosina, arginina, lisina,  $\delta$ -hidroxilisina, homoarginina, ácido 2,4-diaminobutírico, homoarginina,  $\beta$ -homoarginina, D-arginina, metilarginina, alfa-N-metilarginina, nitroarginina, N(G)-nitroarginina, nitrosoarginina, N(G)-nitrosoarginina, arginal, ácido guanidinopropiónico,  $\epsilon$ -N-metil lisina, alo-hidroxilisina, ácido 2,3-diaminopropiónico, ácido 2,2'-diaminopimélico, ornitina, dimetilarginina simétrica, dimetilarginina asimétrica, ácido 2,6-diaminohexanoico, histidina, 1-metil-histidina, 3-metil-histidina, ácido p-aminobenzoico, y 3-aminotirosina.
- 30
5. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, mientras que el residuo  $X_3$  se selecciona del grupo que consiste en arginina, lisina,  $\delta$ -hidroxilisina, homoarginina, ácido 2,4-diaminobutírico,  $\beta$ -homoarginina,  $\epsilon$ -N-metil lisina, alo-hidroxilisina, ácido 2,3-diaminopropiónico, ácido 2,2'-diaminopimélico, ornitina, metilarginina, dimetilarginina simétrica, dimetilarginina asimétrica, nitroarginina, nitrosoarginina, arginal, ácido guanidinopropiónico, ácido 2,6-diaminohexanoico, histidina, 1-metil-histidina, 3-metil-histidina, y 3-amino-tirosina.
- 35
6. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el residuo  $X_4$  se selecciona del grupo que consiste en asparragina, N-metilserina, N-metilglicina, dihidroxifenilalanina, N-etilasparragina, N-etilglicina, homoserina, penicilamina, tetrahidropiraniilglicina, alo-treonina, 3,5-dinitrotirosina, y citrulina, así como arginina, lisina,  $\delta$ -hidroxilisina, homoarginina, ácido 2,4-diaminobutírico,  $\beta$ -homoarginina,  $\epsilon$ -N-metil lisina, alo-hidroxilisina, ácido 2,3-diaminopropiónico, ácido 2,2'-diaminopimélico, ornitina, metilarginina, dimetilarginina simétrica, dimetilarginina asimétrica, nitroarginina, nitrosoarginina, arginal, ácido guanidinopropiónico, ácido 2,6-diaminohexanoico, histidina, 1-metil-histidina, 3-metil-histidina, y 3-amino-tirosina.
- 40
- 45
7. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el residuo  $X_5$  es prolina o un derivado de prolina seleccionado del grupo que consiste de cis-4-hidroxirolina, trans-4-hidroxirolina, cis-3-hidroxirolina, trans-3-hidroxirolina,  $\beta$ -ciclohexilalanina, 3,4-cis-metanoprolina, 3,4-deshidroprolina, homoprolina y pseudoprolina.
- 50
8. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde el residuo  $X_6$  se selecciona del grupo que consiste en prolina, cis-4-hidroxirolina, trans-4-hidroxirolina, cis-3-hidroxirolina, trans-3-hidroxirolina,

- 5  $\beta$ -ciclohexilalanina, 3,4-cis-metanoprolina, 3,4-deshidroprolina, homoprolina, pseudoprolinas, arginina, preferiblemente D-arginina,  $\delta$ -hidroxilisina, homoarginina, ácido 2,4-diaminobutírico,  $\beta$ -homoarginina,  $\epsilon$ -N-metil lisina, alo-hidroxilisina, ácido 2,3-diaminopropiónico, ácido 2,2'-diaminopimélico, lisina, ornitina, metilarginina, dimetilarginina simétrica, dimetilarginina asimétrica, nitroarginina, nitrosoarginina, arginal, ácido guanidinopropiónico, ácido 2,6-diaminohexanoico, histidina, 1-metil-histidina, 3-metil-histidina, y 3-amino-tirosina.
- 10 9. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende al menos un residuo adicional  $X_6$  y/o  $X_7$  en  $Sub_2$ , mientras que  $X_6$  se selecciona entre prolina o un derivado de prolina o un radical que tiene una carga neta positiva o una cadena lateral cargada positivamente en condiciones fisiológicas y  $X_7$  se selecciona del grupo que consiste en prolina, cis-4-hidroxiprolina, trans-4-hidroxiprolina, cis-3-hidroxiprolina, trans-3-hidroxiprolina,  $\beta$ -ciclohexilalanina, 3,4-cis-metanoprolina, 3,4-deshidroprolina, homoprolina, pseudoprolinas, serina, treonina, citrulina, N-metilserina, N-metilglicina, dihidroxifenilalanina, N-etilasparragina, N-etilglicina, homoserina, penicilamina, tetrahidropiranioliglicina, alo-treonina, 3,5-dinitrotirosina,  $\delta$ -hidroxilisina, fenilalanina, leucina, isoleucina, valina, metionina, alanina, ácido 1-aminociclohexilcarbónico, N-metilleucina, N-metilisoleucina, terc-butilglicina,  $\beta$ -alanina, norleucina, norvalina, N-metilvalina, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido aminovalérico, ácido 2-aminopimélico, ácido pipercolónico, triptófano, yodo-tirosina, 3,5-diyodo-tirosina, 3,5-dibromotirosina,  $\beta$ -ciclohexilalanina, ácido p-aminobenzoico, ácido  $\epsilon$ -aminocaproico, 3,4-cis-metanoprolina, fenilglicina, 3,4-deshidroprolina, ácido 4-amino-5-ciclohexil-3-hidroxipentanoico, O-fosfotirosina, O-sulfotirosina, ácido aminoetilpirrolocarboxílico, ácido 4-aminopiperidino-4-carboxílico, ácido  $\alpha$ -aminoadípico, homoprolina, homofenilalanina, p-fluoro-fenilalanina, 3,4-diclorofenilalanina, p-bromo-fenilalanina, p-yodo-fenilalanina, p-nitro-fenilalanina, una secuencia peptídica corta, y un conector ramificado que contiene varias unidades peptídicas.
- 15 10. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de acuerdo con los SEQ ID NO: 88, 120, 125, 128, 134, 137, 146, 147, 151, 155, 156, 157, y 158.
- 20 11. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en donde al menos uno de los enlaces peptídicos de la cadena principal del péptido se sustituye por un enlace no escindible.
- 25 12. El péptido de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el enlace entre  $X_6$ - $X_7$  es un enlace no escindible.
13. El péptido de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde el enlace no escindible se selecciona del grupo que consiste en un enlace amida reducido, un enlace amida alquilado, y un enlace tioamida.
14. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que está fusionado a una proteína o acoplado a un polímero.
- 30 15. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde dicho péptido está unido a un portador.
16. Un multímero, en donde al menos dos péptidos se acoplan entre sí, mientras que al menos uno de los péptidos es un péptido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 15.
- 35 17. Una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los péptidos o un multímero de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 16.
18. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o un multímero de acuerdo con la reivindicación 16 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17, para su uso en el tratamiento de una infección microbiana, bacteriana o fúngica en un mamífero.
- 40 19. El uso de un péptido o un multímero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, como agente de limpieza, como agente de conservación o en un material de envasado.
20. El uso de un péptido o un multímero de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 16 en un método de escrutinio.
21. Un método para identificar un compuesto, que tiene un efecto antimicrobiano, bactericida o antifúngico, que comprende:
- 45 (i) realizar un análisis competitivo con:
- (a) un microorganismo susceptible a un péptido o multímero de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 16;
  - (b) un péptido o multímero de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 16; y
  - (c) al menos un compuesto que se va a someter a ensayo;
- mediante la exposición de (a) a (b) y (c); y
- 50 (ii) seleccionar un compuesto de ensayo que desplaza competitivamente la unión del péptido o multímero al

microorganismo.

- 5 22. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el microorganismo es una especie que pertenece a uno de los géneros seleccionados entre *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Erwinia amylovora*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Francisella tularensis*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas syringae*, *Rhizobium meliloti* y *Haemophilus influenzae*.

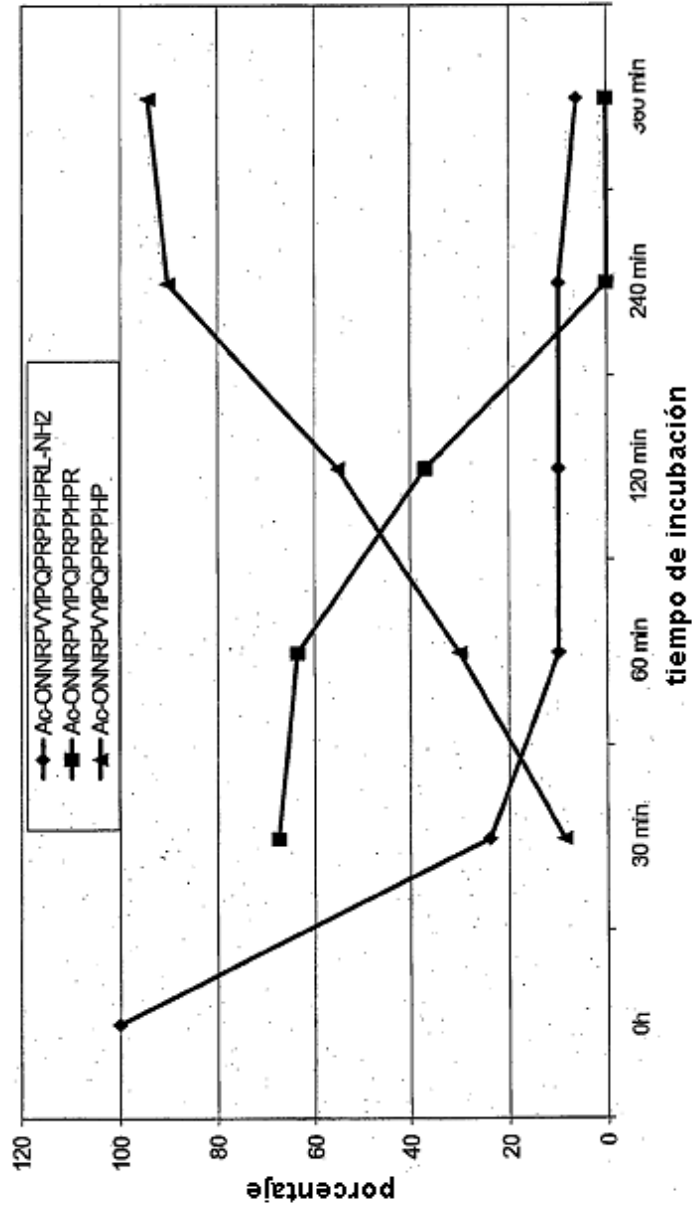


Fig. 1

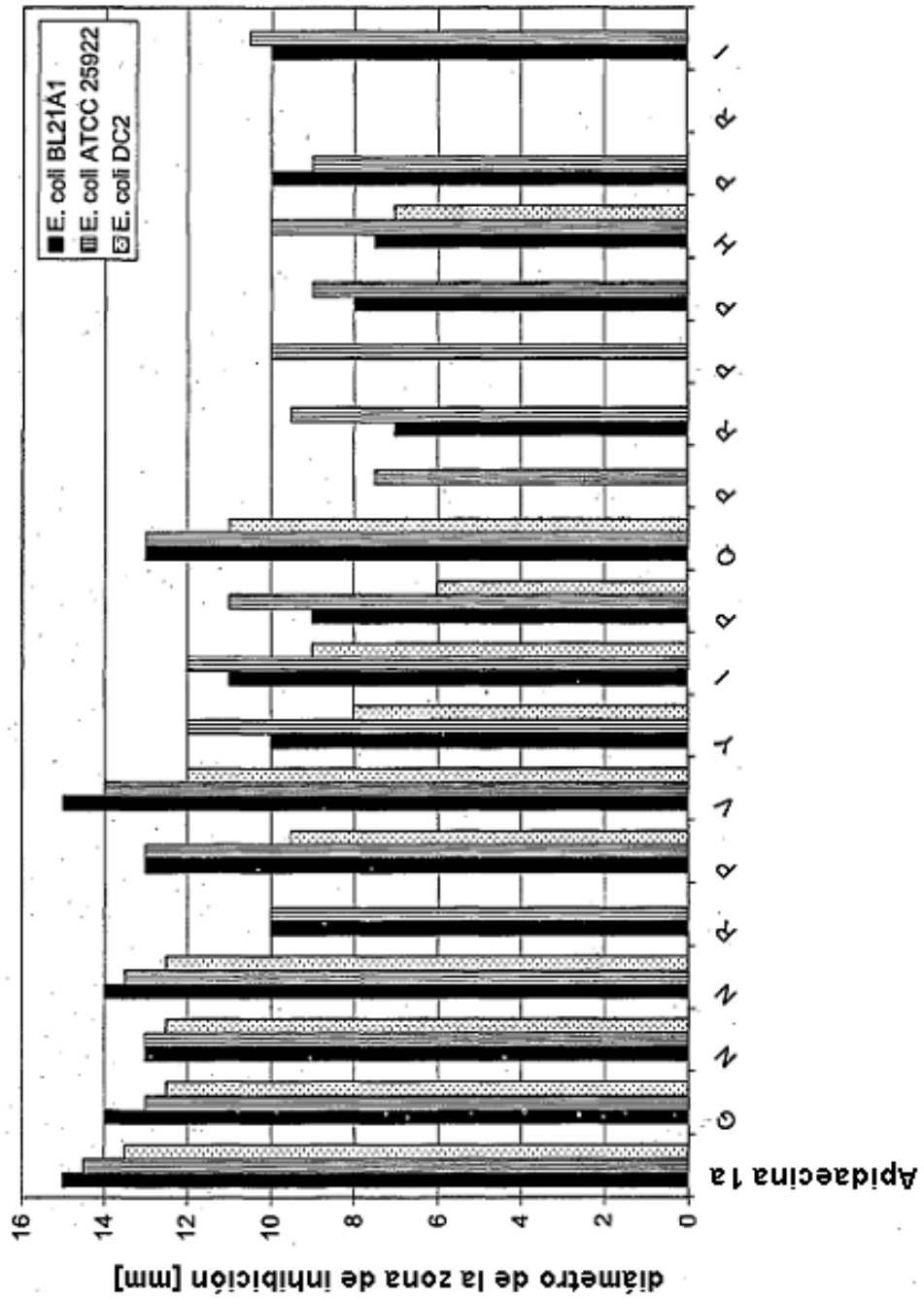


Fig. 2

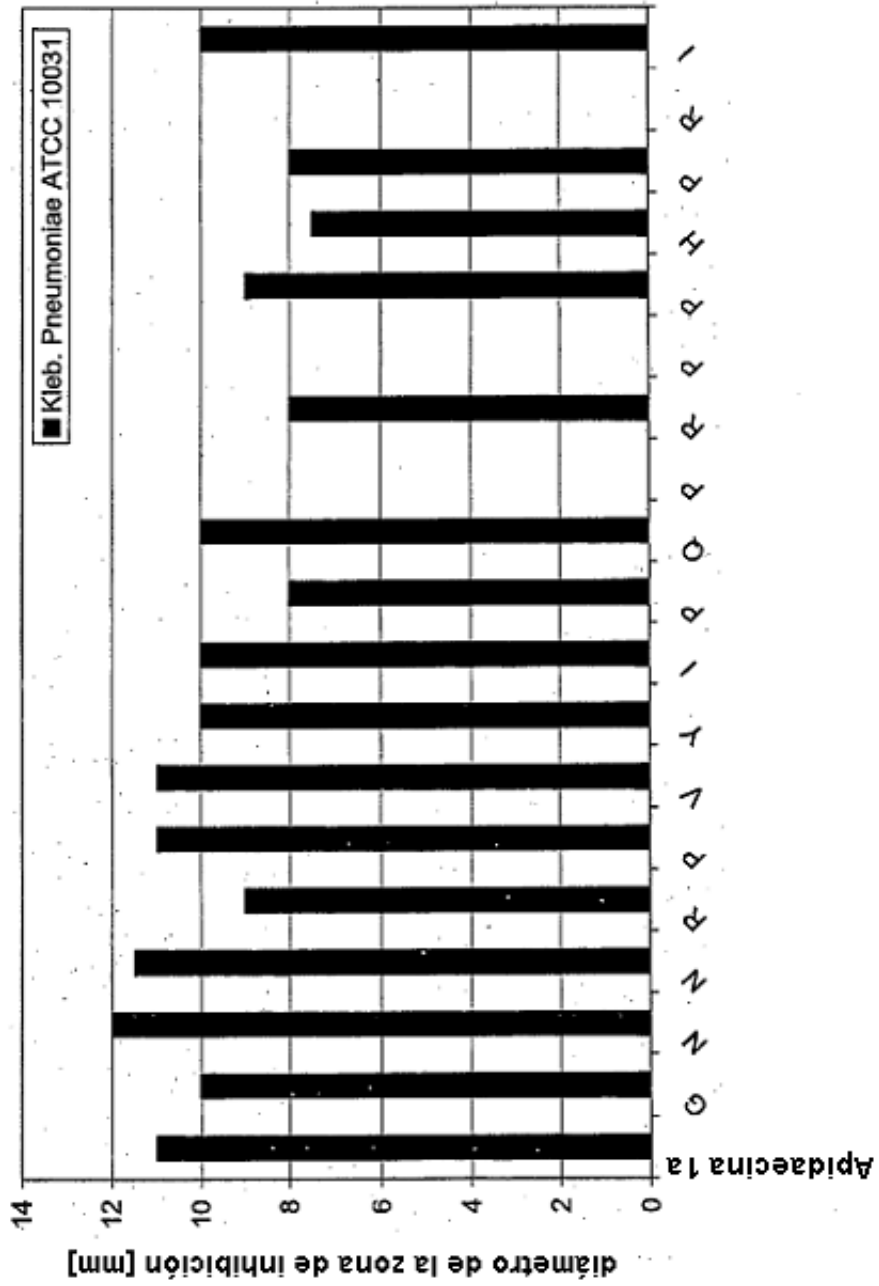


Fig. 3

Actividad Hemolítica 600 µg/ml péptido y TritonX al 0,1 %

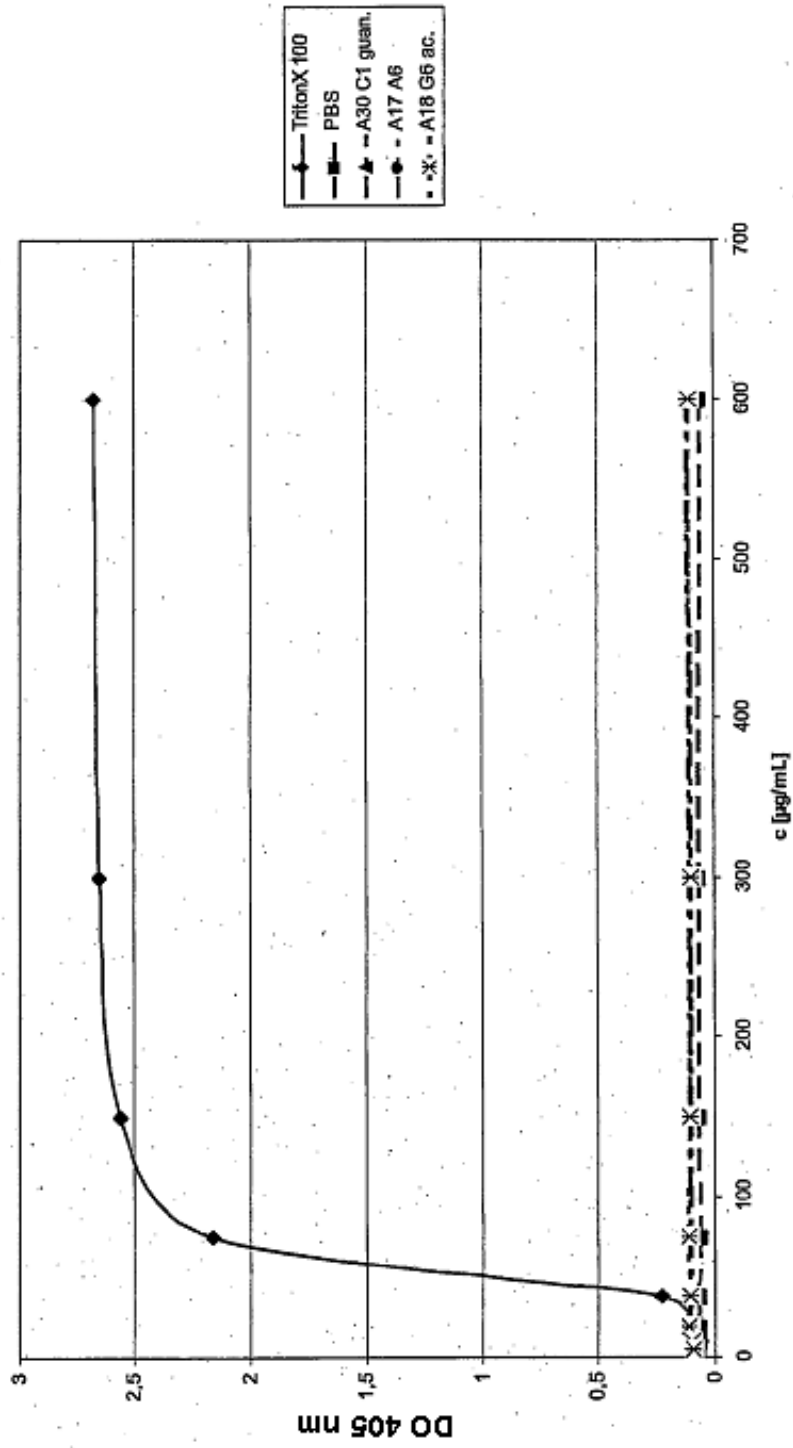


Fig. 4

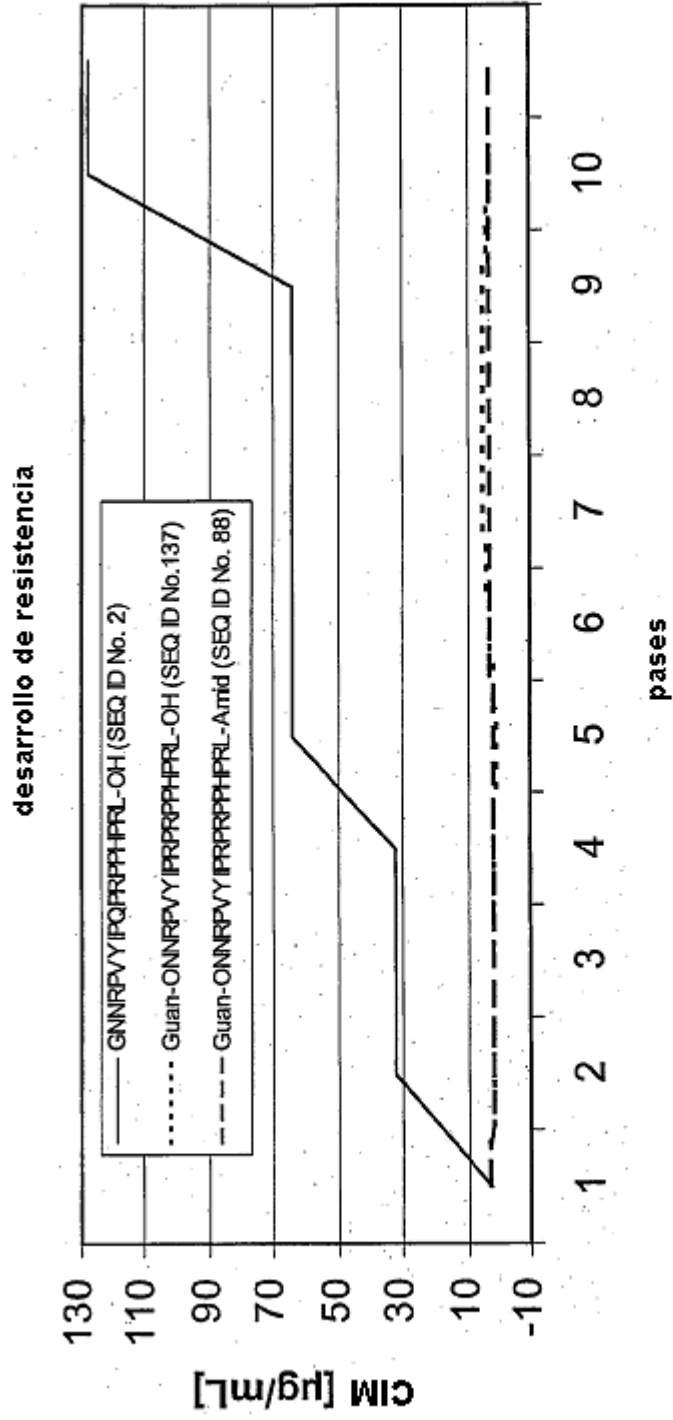


Fig. 5



Fig. 6A

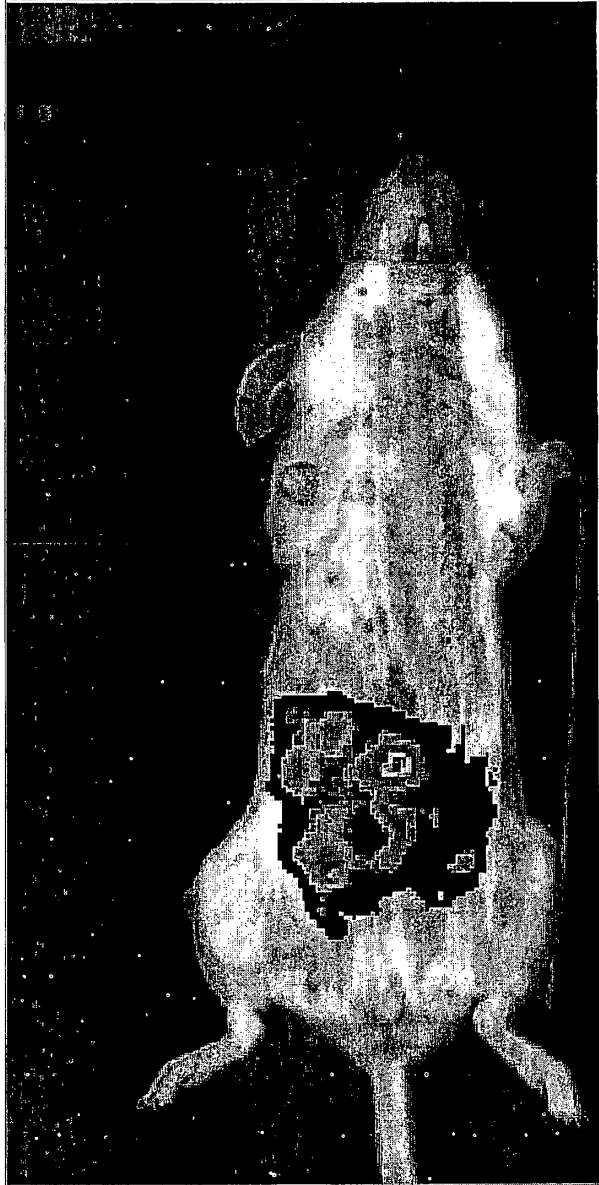
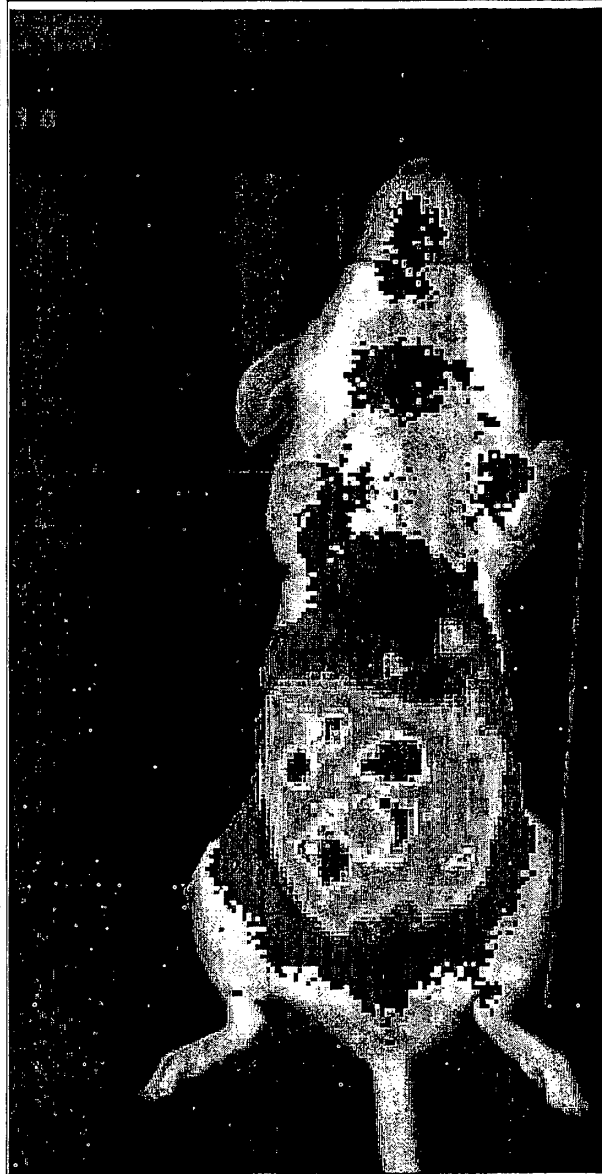


Fig. 6B



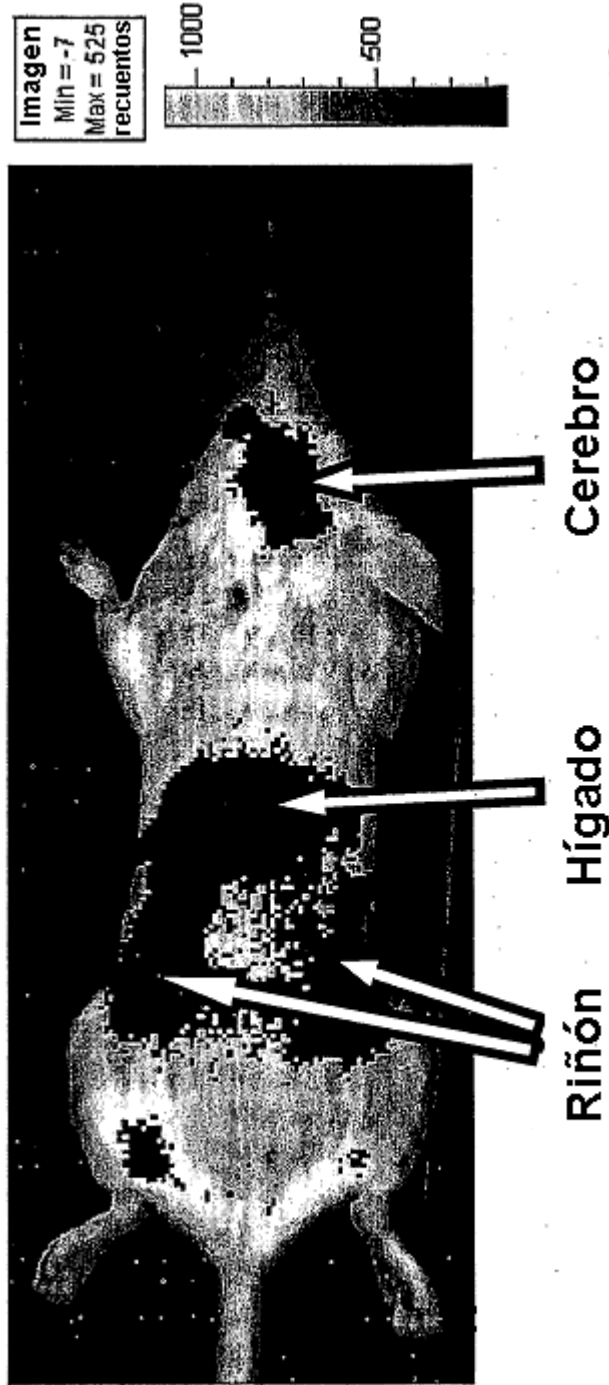


Fig. 6C