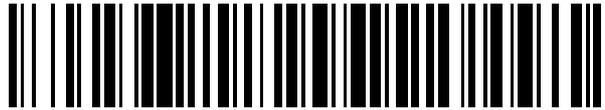


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 840**

51 Int. Cl.:

C07K 14/315 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2003 E 03733622 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 1507798**

54 Título: **Exportación y modificación de poli(péptidos) de tipo lantibiótico**

30 Prioridad:

24.05.2002 EP 02077060
07.02.2003 US 360101

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2014

73 Titular/es:

LANTHIOPEP B.V. (100.0%)
Postbus 719
9700 AS Groningen, NL

72 Inventor/es:

MOLL, GERT NIKOLAAS;
LEENHOUTS, CORNELIS JOHANNES;
KUIPERS, OSCAR PAUL y
DRIESSEN, ARNOLD JACOB MATHIEU

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 444 840 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

Exportación y modificación de poli(péptidos) de tipo lantibiótico

- 5 La invención se refiere al campo de los lantibióticos y al campo de las modificaciones post-traduccionales de (poli) péptidos.

10 Los lantibióticos forman un grupo de péptidos antibióticos únicos modificados post-traduccionalmente y sintetizados ribosomalmente producidos por, y que actúan principalmente sobre, bacterias Gram-positivas (para una revisión véase McAuliffe et al., FEMS Microbiol. Rev. 25: 285-308 (2001). Dado que, por definición, contienen puentes tioéter intramoleculares o anillos formados por los aminoácidos con grupos tioéter, lantionina (Lan) y 3-metil lantionina (MeLan) y dado que todos son *antibióticos* peptídicos con actividad bactericida de moderada a fuerte, estos toman su nombre de estas propiedades más llamativas.

15 Los anillos tioéter protegen a los péptidos contra la degradación proteolítica. Por ejemplo, el lantibiótico nisina permanece activo después de tratamiento con tripsina. Los anillos tioéter son esenciales para algunas actividades de los lantibióticos. Por ejemplo, la apertura del anillo A o C en la nisina suprime la capacidad de permeabilización de la membrana. El anillo A de la nisina es necesario con respecto a su capacidad para autoinducir su propia síntesis y con respecto a la capacidad de la nisina para bloquear la síntesis del peptidogluano interaccionando con el lípido II. Es esencial tener anillos tioéter y no puentes disulfuro dado que el reemplazo de anillos tioéter por puentes disulfuro conduce a la pérdida de actividad microbiana.

25 No deterioran el ambiente y no son tóxicos para los animales o el hombre y encuentran, o pueden encontrar, aplicaciones como bioconservantes en la preparación de alimentos y bebidas, pero también como agente bactericida en productos cosméticos, veterinarios y médicos. Dado que el creciente número de microorganismos patógenos resistentes a fármacos múltiples ha creado la amenaza de otra "era preantibiótica" para muchas enfermedades bacterianas, se espera que los lantibióticos también puedan servir como un nuevo compuesto principal para remediar este problema alarmante. Principalmente por estas razones, en la década anterior, los lantibióticos han experimentado un notable aumento en actividades de investigación aplicada y básica, lo que conduce a un aumento extraordinario en cuanto al conocimiento acerca de sus propiedades estructurales y funcionales, sus mecanismos de acción y de los genes y componentes proteicos implicados en su biosíntesis y secreción. Por ejemplo, los lantibióticos se han convertido actualmente en objeto de proyectos de "modificación por ingeniería genética de proteínas", con el objetivo de alterar, mediante mutagénesis dirigida a sitio, su actividad, estabilidad y espectro de células diana susceptibles. En la presente descripción se realiza un enfoque sobre los lantibióticos lineales (tipo A) ya que hasta el momento se dispone de muy poca información específica acerca de los lantibióticos circulares (tipo B).

40 Los lantibióticos subtilina y nisina pertenecen a, y son representativos de, antibióticos peptídicos o lantibióticos de tipo A. Contienen los aminoácidos poco frecuentes deshidroalanina (Dha), deshidrobutirina (Dhb), meso-lantionina y 3-metilantionina, y los puentes tioéter característicos. La nisina es el lantibiótico más destacado y se usa como un conservante alimenticio debido a su alta fuerza contra determinadas bacterias Gram-positivas. Las cepas de *Lactococcus lactis* que pertenecen al grupo serológico N producen nisina. Las fuertes actividades bactericidas de la nisina, y de muchos otros lantibióticos, se basan en su capacidad para permeabilizar la membrana citoplasmática de bacterias diana. La degradación del potencial de membrana comienza por la formación de poros a través de los cuales se liberan moléculas de bajo peso molecular. Además, la nisina inhibe la síntesis de la pared celular uniéndose al lípido II, un precursor de la síntesis del péptidogluano, modula la actividad de enzimas autolíticas e inhibe el desarrollo de esporas (véase también Breukink y de Kruijf, Biochem. Biophys. Acta 1462:223-234, 1999).

50 En muchos países la nisina se usa para impedir el desarrollo de clostridia en queso y en alimentos en conserva. La estructura peptídica de la nisina la describieron primera vez Gross y Morell (J. Am. Chem. Soc. 93:4634-4635, 1971), y su gen estructural se aisló en 1988 (Buchmann et al., J. Biol. Chem. 263:16260-16266, 1988). La nisina tiene dos variantes naturales, la nisina A y la nisina Z, que solo se diferencian en un resto de aminoácido en la posición 27 (la histidina en la nisina A se reemplaza por asparagina en la nisina Z).

55 La subtilina la produce *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Groos y Kiltz (Biochem. Biophys Res Commun 50: 559-565, 1973) desenmarañaron por primera vez su estructura y en 1988 se aisló su gen estructural (Banerjee & Hansen, J. Biol. Chem. 263:9508-9514, 1988). La subtilina comparte fuertes similitudes con la nisina con una idéntica organización de las estructuras en anillo de la lantionina (Fig. 1), y ambos lantibióticos poseen similares actividades antibióticas.

60 Debido a su fácil análisis genético *B. subtilis* se convierte en un organismo modelo muy adecuado para la identificación y caracterización de genes y proteínas implicados en la biosíntesis de lantibióticos. La ruta mediante la cual se produce la nisina es muy similar a la de la subtilina, y las proteínas implicadas comparten homologías significativas sobre las proteínas completas (para una revisión véase también De Vos et al., Mol. Microbiol. 17:427-437, 1995).

65

Otro antibiótico bien conocido y estudiado, producido por *Staphylococcus epidermis* 5, es Pep 5, que contiene tres estructuras en anillo (una MeLan y dos Lan), un resto oxobutirilo N-terminal, y dos restos Dhb (Kellner et al., Angew. Chemie Int. Ed. Engl. 28:616-619, 1989).

5 Los genes respectivos que actúan postraduccionalmente se han identificado adyacentes a genes estructurales, y juntos se organizan en estructuras de tipo operón (Fig. 2). Se piensa que estos genes son responsables de la modificación postraduccional, del transporte del prepéptido modificado, de la escisión proteolítica y de la inmunidad que impide efectos tóxicos sobre la bacteria productora. Además de esto, la biosíntesis de la subtilina y de la nisina está fuertemente regulada por un sistema regulador de dos componentes que consiste en una histidina quinasa y
10 una proteína reguladora de respuestas.

De acuerdo con un modelo presente (Fig. 3) se supone que una señal dependiente de la fase de crecimiento extracelular puede activar la histidina quinasa localizada en la membrana. La naturaleza de esta señal puede ser diferente para la biosíntesis de la subtilina y de la nisina. Mientras que en la biosíntesis de la nisina, la propia nisina
15 tiene una función inductora, en la biosíntesis de la subtilina se mostró que esta biosíntesis era dependiente de esporulación.

De acuerdo con el modelo, después de su auto-fosforilación, la histidina quinasa Spak y Nnisk transfiere el resto fosfato al regulador de respuestas que a su vez activa los genes necesarios para la biosíntesis de la subtilina y de la
20 nisina. Por lo tanto, el prepéptido se modifica en un complejo de modificación localizado en la membrana (lantionina sintetasa) que consiste en las proteínas SpaB/SpaC y NisB/NisC intracelulares, respectivamente. De acuerdo con el modelo, estas proteínas también están asociadas con el transportador SpaT y NisT, respectivamente.

Como en cualquier antibiótico, la molécula de presubtilina o prenisina consta de un segmento líder y un segmento
25 maduro, y se piensa que el segmento líder desempeña diversas funciones en la ruta biosintética. Se piensa que no es sólo una secuencia señal de translocación, sino que proporciona señales de reconocimiento para las enzimas de modificación y para suprimir la actividad antimicrobiana hasta que el péptido maduro se libere de la célula. Como también suponen Qiao y Saris, (Fems Microbiol. Let. 144:89-93 (1996), el prepéptido modificado es, en el caso de algunos antibióticos, escindido proteolíticamente después de su transporte a través de la membrana celular, pero en
30 el caso de otros antibióticos la escisión del líder a partir del péptido modificado se produce dentro de la célula antes de la secreción. En el caso de la nisina, la escisión la realiza NisP, mientras que en el caso de la subtilina no se ha encontrado ninguna proteasa específica dentro de la estructura de tipo operón. Sin embargo, *B. subtilis* es rica en proteasas extracelulares y posiblemente la subtilisina, que también reconoce la prolina en la posición-2, escindiría la presubtilina modificada.
35

Recientemente se han caracterizado los grupos génicos que flanquean los genes estructurales de diversos antibióticos lineales (tipo A), (para una revisión véase Siezen et al., Antonie van Leeuwenhoek 69:171-184,
40 1996). Los representantes mejor estudiados son los de la nisina (*nis*), subtilina (*spa*), epidermina (*epi*), Pep5 (*pep*), citolisina (*cyl*), lactocina S (*las*) y lacticina 481 (*lct*). La comparación de los grupos génicos de antibióticos demuestra que contienen genes conservados que probablemente codifican funciones similares.

Los grupos *nis*, *spa*, *epi* y *pep* contienen genes *lanB* y *lanC* que se supone que codifican dos tipos de enzimas que se han implicado en las reacciones de modificación características de todos los antibióticos, es decir, deshidratación
45 y formación de anillos tio-éter. Los grupos génicos *cyl*, *las* e *lct* no tienen homología con el gen *lanB*, pero contienen un gen *lanM* mucho más grande que es el homólogo del gen *lanC*. La mayoría de los grupos génicos de antibióticos contienen un gen *lanP* que codifica una serina proteasa que está supuestamente implicada en el procesamiento proteolítico de los preantibióticos. Todos los grupos contienen un gen *lanT* que codifica un transportador de tipo casete de unión a ATP (*ABC*, *ATP Binding Cassette*) que abarca la membrana plasmática de una célula y que probablemente está implicado en la exportación de (precursores de) los antibióticos de la célula. Los genes *lanE*,
50 *lanF* y *lanG* en los grupos *nis*, *spa* y *epi* codifican otro sistema de transporte que está posiblemente implicado en la auto-protección. En los grupos génicos de nisina y subtilina se han localizado dos genes en tándem, *lanR* y *lanK*, que codifican un sistema regulador de dos componentes.

Finalmente, se han encontrado genes no homólogos en algunos grupos génicos de antibióticos. Los genes
55 *nisL* y *spaI* codifican lipoproteínas que están implicadas en inmunidad, el gen *pepL* codifica una proteína de inmunidad localizada en la membrana y *epiD* codifica una enzima implicada en una modificación postraduccional encontrada solamente en el extremo C de epidermina. Diversos genes de función desconocida también se encuentran en el grupo génico *lan*. Comúnmente, un organismo hospedador o una célula hospedadora que lleva uno o más de dichos genes (en este caso, por ejemplo, *lanT*, *lanI*, *lanA*, *lanP*, *lanB* y *lanC*) en dicho grupo se identifican
60 con una anotación abreviada tal como *lanTIAPBC*. Los genes anteriormente identificados son claramente diferentes de los genes que codifican los aparatos de secreción de las lactocinas no antibióticas que están compuestas por dos proteínas de membrana LcnC y LcnD, como se describe, por ejemplo, en Franke et al., J. Biol. Chem. 274:8484-8490, (1999).

65 Se ha configurado una base de datos para todos los supuestos productos génicos de los grupos génicos de antibióticos de tipo A. La base de datos busca alineamientos de secuencias múltiples y predicción de estructuras

secundarias que se han usado para identificar elementos de secuencias conservados en los productos génicos LanB, LanC, LanE, LanF, LanG, LanK, LanP, LanM, LanR y LanT que pueden ser esenciales para la estructura y función (Siezen et al., citado anteriormente). Esta base de datos permite realizar una exploración rápida de secuencias recientemente determinadas en grupos génicos de lantibióticos.

5 Sin embargo, a pesar de todo el conocimiento reciente citado anteriormente, obtenido en el campo, han sido escasos, sino más bien infructuosos, los intentos para diseñar nuevos péptidos similares a lantibióticos que comprendan puentes tioéter sintetizados de origen no natural. En el documento US 5.861.275, se han producido quimeras de nisina-subtilina en la bacteria *Bacillus subtilis* Gram-positiva, que sin embargo, no comprenden puentes
10 tioéter distintos de los que se producen naturalmente en nisina o subtilina. En una solicitud diferente (US 2002/0019518) se usó *Bacillus subtilis* para producir un polipéptido quimérico que comprendía un péptido lantibiótico y un segmento líder de subtilina, un lanticuerpo, que permanecía asociado dentro de la pared celular.

15 Bierbaum et al. Appl. Env. Microbiol. 62:385-392, 1996, han modificado por ingeniería genética un nuevo puente tioéter en el lantibiótico Pep5 modificando la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus epidermis* 5 empobreciendo al organismo huésped del grupo génico *pepTIAPBC* y reemplazándolo con un grupo génico *peplAPBC*, en el que *pepA* se reemplazaba o no con genes estructurales mutados que codificaban un péptido Pep 5 en el que se sustituyeron los aminoácidos; se generaron genes que codificaban péptidos con sustituciones C27A (cisteína por alanina en la posición 27), C33A, A19C, Dhb16A, Dhb20A, K18Dha. Solamente la sustitución A19C dio como
20 resultado la nueva formación de un nuevo anillo tioéter. El clon correspondiente a la sustitución A19C produjo una cantidad bastante pequeña de un péptido que solo mostró poca actividad. Se pensó que una exposición prolongada del péptido a proteasa intracelular de la célula transformada productora fue la causa de este resultado decepcionante.

25 La sustitución K18Dha en Pep 5 dio como resultado un clon que produjo serina incompletamente deshidratada en la posición 18. Kuipers et al., (J. Biol. Chem. 267:24340-24346, 1992) modificaron por ingeniería genética un nuevo resto Dhb en nisina Z sustituyendo M17Q/G18T en dicho lantibiótico, pero también se obtuvo sólo deshidratación incompleta de la treonina resultante y ninguna formación de anillo adicional. La deshidratación incompleta se piensa generalmente que es un resultado de la especificidad del sustrato cuestionable de la enzima deshidratante LanB en
30 la célula transformada.

En resumidas cuentas, en gran medida aún no se ha conseguido ningún éxito proporcionando nuevos puentes tioéter para lantibióticos en organismos Gram-positivos, conduciendo sólo a la formación de puentes tioéter modificados genéticamente que se ha proporcionado para polipéptidos de descendientes no lantibióticos o por
35 organismos distintos de bacterias Gram-positivas.

Paul, Leena K et al (FEMS Microbiol. Lett 176 :45-50, 1999) estudiaron recientemente el péptido líder subtilina como una señal de translocación en la bacteria *E. coli* Gram-negativa, por defecto desprovista de un sistema transportador de lantibiótico específico, y proporcionaron una proteína de fusión que comprendía el péptido líder subtilina y parte
40 de la subtilina madura unida a la fosfatasa alcalina (AP, *Alkaline Phosphatase*) de *E. coli* para estudiar dicha translocación posible. Aunque la proteína de fusión se translocó al lado periplásmico de la membrana citoplasmática, permaneció asociada a la membrana. En un trabajo anterior, (Izaguirre & Hansen, Appl. Environ. Microbiol 63:3965-3971, 1997) se expresó la misma proteína de fusión en la bacteria *Bacillus subtilis* Gram-positiva, donde se escindió de dicha membrana después de la translocación satisfactoria, pero no hubo deshidratación de serinas o treoninas en
45 el polipéptido AP, y mucho menos se observó la formación de puentes tioéter. Novak J et al., ASM general meeting 96:217 (1999), proporcionaron recientemente una célula hospedadora de *E. coli* con una ORF (ORF1) que codificaba un transportador ABC de 341 aminoácidos, que se pensaba que estaba implicado en la translocación del lantibiótico mutacina II en *Streptococcus mutans*. Sin embargo, en *E. coli* no se produjo ningún producto génico intacto de dicha ORF1, mientras que se observó una proteína truncada de identidad o funcionalidad desconocida.

50 Con objeto de modificar genéticamente proteínas de lantibióticos (para una amplia revisión, véase Kuipers et al., Antonie van Leeuwenhoek 69:161-170, 1996) o con objeto de modificar genéticamente nuevos (poli)péptidos recién diseñados con modificaciones postraduccionales de tipo lantibiótico, por ejemplo para uso farmacéutico, recientemente se ha prestado mucha atención (véase, por ejemplo Entian & de Vos, Antoni van Leeuwenhoek
55 69:109-117, 1996; Siegers et al., J. Biol. Chem. 271:1294-12301, 1996; Kiesau et al., J. Bacter. 179:1475-1481, 1997) a entender la función del complejo LanB, LanC (o LanM) y LanT, las enzimas que se piensa que están implicadas (en ese orden) en la deshidratación, formación de anillos tioéter y transporte del lantibiótico fuera de la célula.

60 La presente invención muestra que el péptido no modificado, que se acopla a su péptido líder, puede transportarse fuera de la célula sin modificación anterior, y que cuando LanB y LanC (o LanM), actúan del todo, pueden actuar no dentro, sino también fuera de la célula (véase también Fig. 4).

65 Donde anteriormente se pensaba normalmente que LanB y LanC actuaban en concierto para modificar el péptido sólo antes de que se translocase, en el presente documento se proporciona adicionalmente que después del transporte, el péptido no modificado extracelularmente como tal puede experimentar su modificación postraduccional

específica conduciendo a la deshidratación y a la formación de puentes tioéter, llevando la función de la proteína transportadora a la fase central para modificar un (poli)péptido de tipo lantibiótico, siendo esto un requisito previo para presentar el péptido no modificado a la maquinaria de modificación.

5 Por tanto, la invención proporciona la comprensión de que la deshidratación de una serina o una treonina de un (poli)péptido y la posterior formación de puentes tioéter puede producirse satisfactoriamente cuando un pre(poli)péptido se ha transportado fuera de la célula hospedadora donde se ha producido por traducción, preferentemente por una proteína transportadora, tal como un transportador ABC, preferentemente correspondiendo, al menos funcionalmente, a un transportador comúnmente identificable como LanT. Después, la deshidratación (y
10 opcionalmente la formación de puentes tioéter) se cataliza solo enzimáticamente por una enzima o enzimas que corresponden al menos funcionalmente a LanB y/o LanC. Dicho transporte transporta el (poli)péptido a modificar través de la membrana de la célula hospedadora cuando, durante su funcionamiento, se coloca cerca de LanB localizado extracelularmente para la deshidratación.

15 La invención proporciona un método para producir, en una célula hospedadora, un polipéptido de origen bacteriano no Gram-positivo, que contiene un puente tioéter, comprendiendo dicho método:

a) seleccionar una célula hospedadora que tenga una molécula de ácido nucleico que comprenda:

- 20 - un primer fragmento de ácido nucleico que codifique un péptido líder;
- un segundo fragmento de ácido nucleico que codifique un polipéptido deseado que comprenda una secuencia seleccionada del grupo de secuencias que consiste en Ser-Xaa_n-Cys y Thr-Xaa_n-Cys, en la que Xaa es cualquier aminoácido y en la que n es 1-13, y donde el polipéptido es de origen bacteriano no Gram-positivo;
- en la que el primer y segundo fragmento de ácido nucleico estén dentro de la misma fase de lectura abierta que la molécula de ácido nucleico; y
25 - en la que el péptido líder sea funcionalmente equivalente a un péptido líder N-terminal encontrado en un prepéptido de un lantibiótico;

b) seleccionar la célula hospedadora para detectar la presencia de la proteína transportadora LanT o un equivalente funcional de la misma que tenga la actividad LanT;

30 c) traducir la molécula de ácido nucleico, produciendo de este modo el péptido líder y el polipéptido que comprende la secuencia seleccionada del grupo de secuencias que consisten en Ser-Xaa_n-Cys y Thr- Xaa_n-Cys, donde Xaa es cualquier aminoácido y donde n es 1-13; y

d) recoger el polipéptido que contiene el puente tioéter de un medio de la célula hospedadora.

35 En una realización adicional preferida, la invención proporciona un método de acuerdo con la invención que comprende adicionalmente recoger dicho (poli)péptido deseado después de detectar la presencia de dicho péptido líder en el medio de cultivo o sobrenadante de dicha célula (véase también Fig. 5). Para detectar dicha presencia, se prefiere que dicho medio solo contenga escasos nutrientes, es decir, un medio denominado mínimo. Además, se prefiere que dicha presencia se detecte recogiendo el sobrenadante aspirando y dispensando el sobrenadante dentro y fuera de una punta de pipeta (u otro dispositivo de recogida) que contenga un lecho microvolumétrico de medios de cromatografía por afinidad fijado en el extremo de la punta que está preferentemente sin volumen muerto. En el presente documento a este procedimiento se le denomina "ziptipping" (pipeteado con ziptip) y permite, tras elución posterior, la presentación relativamente pura del (poli)péptido deseado para análisis posterior.

45 Preferentemente usando la combinación de cultivo en medio mínimo y ziptipping el sobrenadante de este cultivo, pueden obtenerse muestras de suficiente pureza que son muy adecuadas para la detección o análisis por MALDI-TOFMS de alta resolución. Esto permite medir más significativamente el péptido líder y por tanto la predicción del contenido del (poli)péptido deseado. Por tanto, la detección de dicho péptido líder puede usarse para averiguar la exportación del (poli)péptido acoplado a este líder lantibiótico, especialmente en aquellos casos en las que la peptidasa líder actúa extracelularmente.

50 En una realización adicional preferida, la invención proporciona un método en el que la célula hospedadora productora del (poli)péptido deseado está esencialmente desprovista de actividad peptidasa líder (LanP), permitiendo por tanto la producción y el recogida extracelular - usando antibióticos anti-líder - del (poli)péptido deseado que está aún esencialmente acoplado a su péptido líder. Además, de esta manera, se reducen posibles efectos tóxicos intracelulares del (poli)péptido deseado provisto de puentes tioéter. Por supuesto también es suficiente diseñar un péptido líder que no pueda escindir la peptidasa líder de la célula hospedadora usada. En ambos casos, el (poli)péptido deseado puede obtenerse posteriormente libre del péptido líder, por ejemplo, por escisión proteolítica específica, usando LanP añadida, o mediante cualquier proteasa adecuada capaz de escindir el péptido líder del (poli)péptido deseado. Además, en el presente documento se ha previsto que en un (poli)péptido deseado, un serina o más serinas, que están localizadas en el extremo N de cisteínas se deshidraten y acoplen a más cisteínas localizadas en el extremo C. Como también se ilustra en el presente documento en la descripción detallada, una secuencia (poli)peptídica con una serina y una cisteína "S - C" contiene (preferentemente después de la formación de puentes tioéter) alaninas en dichas posiciones de la serina y cisteína: "A - A". Estas alaninas están acopladas por - además de la estructura peptídica - un puente tioéter.

Generalmente, en el presente documento se proporciona un método que permite un alto nivel de detección para medir niveles de (poli)péptidos (lantibióticos) directamente del sobrenadante de cultivo, considerando que la proporción deseada del péptido líder frente al (poli)péptido es esencialmente de 1:1. Dicha orientación permite métodos de cultivo eficaces para producir el polipéptido deseado y permite determinar momentos óptimos o apropiados a los que puede recogerse dicho cultivo.

En una realización preferida, la invención proporciona un método de acuerdo con la invención, y un (poli)péptido de acuerdo con la invención en el que dicho (poli)péptido deseado se selecciona en el grupo de hormonas peptídicas o fragmentos de estas hormonas o análogos de estas hormonas que se originan de hormonas hipofisarias y/o peptídicas con acciones similares, tales como, vasopresina, terlipresina, desmopresina, cispresina, oxitocina, hormona adrenocorticotrópica y hormona de crecimiento humano.

En otra forma realización preferida, la invención proporciona un método de acuerdo con la invención, y un (poli)péptido de acuerdo con la invención en el que dicho (poli)péptido deseado se selecciona del grupo de hormonas peptídicas o fragmentos de estas hormonas o análogos de estas hormonas que se originan de hormonas hipotalámicas y/o peptídicas con acciones similares tales como gonadoliberina II, hormona liberadora de hormona luteinizante, leuprolida y otros análogos sintéticos de LHRH tales como gonadorelina, goserelina, busarelina, leuprorelina, nafarelina, triptorelina y cetorelix, somatostatina, análogos de somatostatina, tales como octreótido, somatostatina, péptido inhibidor de corticotropina, factor liberador de corticotropina, urocortina, urotensina II y factor liberador de hormona de crecimiento.

En otra realización preferida, la invención proporciona un método de acuerdo con la invención, y un (poli)péptido de acuerdo con la invención en el que dicho (poli)péptido deseado se selecciona en el grupo de hormonas peptídicas o fragmentos de estas hormonas o análogos de estas hormonas que se originan de hormonas peptídicas adrenocorticales, méduloadrenales, renales y cardíacas y/o peptídicas con acciones similares tales como adrenomedulina, angiotensina I, factor natriurético auricular, bradiquinina, péptido natriurético cerebral, péptido natriurético de tipo C y péptido vasonatrina.

En otra realización preferida, la invención proporciona un método de acuerdo con la invención, y un (poli)péptido de acuerdo con la invención en el que dicho (poli)péptido deseado se selecciona del grupo de hormonas peptídicas o fragmentos de estas hormonas o análogos de estas hormonas que se originan de otros órganos endocrinos/exocrinos tales como el páncreas, hormona tiroidea y paratiroidea y/o peptídicas con acciones similares tales como calcitonina, osteocalcina, glucagón, insulina, factor de crecimiento I o II similar a insulina, parathormona y colecistoquinina.

En otra realización preferida, la invención proporciona un método de acuerdo con la invención, y un (poli)péptido de acuerdo con la invención en el que dicho (poli)péptido deseado se selecciona del grupo de hormonas peptídicas o fragmentos de estas hormonas o análogos (sintéticos) de estas hormonas con actividad (de tipo) antibiótica y/u hormonas peptídicas con acciones similares, tales como dermaseptina, defensina I, péptido similar a bombinina, histatina-5, indolicidina, magainina-1 y ceratotoxina A.

En otra realización preferida, la invención proporciona un método de acuerdo con la invención y un (poli)péptido de acuerdo con la invención en el que dicho (poli)péptido deseado se selecciona del grupo de péptidos o fragmentos biológicos activos de estos péptidos y/u hormonas o análogos de estos péptidos y/o péptidos con acciones similares tales como exendina-3, secretina, polipéptido pancreático humano, péptido YY, polipéptido inhibidor gástrico, gastrina I grande, pentagastrina, péptido liberador de gastrina, motilina, neuropéptido Y, galanina, alfa-neuroquinina, deltorfina, alfa-endorfina, beta-endorfina, leu-encefalina, met-encefalina, alatostatina I, anthopleurina-A, péptido antiinflamatorio 1, péptido inductor del sueño delta, alfa-dendrotoxina, eledoisina, equistatina, péptido cardioactivo pequeño A o B, cerebelina, caribdotoxina, conopresina G, conotoxina EI, corazonina, péptido encefalitogénico alérgico experimental, péptido complementario de la encefalomielite autoinmune experimental, ácido tocinoico/ácido presinoico, factor ácido de crecimiento de fibroblastos derivado de cerebro (1-11), factor ácido de crecimiento de fibroblastos derivado de cerebro (102-111), factor básico de crecimiento de fibroblastos derivado del cerebro (1-24), péptido inhibidor de unión a fibrinógeno, péptido inhibidor del factor de crecimiento de fibroblastos y factor alfa de crecimiento transformante.

En otra realización preferida, la invención proporciona un método de acuerdo con la invención, y un (poli)péptido de acuerdo con la invención en el que dicho (poli)péptido deseado se selecciona del grupo de péptidos o fragmentos biológicos activos de estos péptidos y/u hormonas o análogos de estos péptidos y/o péptidos con acciones similares tales como guanilina, helospectina I, fragmento antigénico de la superficie del virus de la hepatitis B, molécula de adhesión intercelular, taquipesina I, fragmento peptídico antigénico (gp120), fragmento I peptídico antigénico (gp 41) del VIH, péptido antigénico 5 del VIH, inhibidores de proteasa del VIH, IGF II 69-84, fragmento 8 de interleucina, fragmento 2 de interleucina (60-70), leucoquinina I, leucopiroquinina, mastoparén, hormona concentradora de melanina, melitina y péptidos relacionados con el oncogén ras.

Considerando que la formación de lantionina entre, por ejemplo, deshidrobutirina y cisteína es energéticamente posible a temperatura ambiente y que también puede producirse espontáneamente, el (poli)péptido transportado

puede formar puentes tioéter espontáneamente o cuando se coloca en proximidad funcional a LanC localizado extracelular para la formación de puentes tioéter inducida enzimáticamente. Como alternativa, dicho transportador transporta el polipéptido a modificar a través de la membrana de la célula huésped cuando se coloca en proximidad funcional a LanM localizado extracelular para la deshidratación de LanM y posterior formación de puentes tioéter.

5 Con este conocimiento, la invención proporciona un método mediante el cual pueden beneficiarse varios campos. En resumen, la invención proporciona el uso de exportadores lantibióticos (LanT) para exportar péptidos o proteínas que opcionalmente pueden haberse transformado por la enzima (o enzimas) lantibiótica, en particular permitiendo la formación extracelular de lantioninas y otros anillos. Los aminoácidos pueden formar secuencias cortas (péptidos) y
10 secuencias largas (proteínas). Los péptidos y proteínas [en el presente documento denominados también (poli)péptidos] son clases importantes de biomoléculas, por ejemplo, tanto para la nutrición, como para el control de plagas y para luchar contra enfermedades. Su importancia se ilustra mediante la cantidad y serie de terapias basadas en los recientemente creados por las industrias bioquímicas y farmacéuticas. También hay una gran cantidad de productos farmacéuticos basados en proteínas y péptidos y también debe entenderse que el uso de
15 compuestos farmacéuticos terapéuticos no está limitado a seres humanos sino que también se amplía a animales, plantas u otros biosistemas. Sin embargo, la fabricación de muchos actuales y posibles compuestos farmacéuticos proteicos o péptidos tiene limitaciones: en particular muchos se preparan en células vivas (*in vivo*), pero estas células deben romperse o someterse a lisis (destruirse), y su contenido debe extraerse, separarse y purificarse, para proporcionar una cantidad determinada de péptido o de proteína. Este es un proceso complejo, y además la
20 cantidad de cualquier péptido o proteína deseado en cualquier célula en cualquier momento está limitada.

La presente invención evita este problema introduciendo en las células vivas un factor que permite a las células transportar continuamente proteínas o péptidos y exportarlos a través de la pared celular, de tal manera que el producto producido intercelularmente pueda recogerse extracelularmente y las células puedan seguir viviendo y
25 produciendo materiales. Es obvio que esto permite una producción a una velocidad más alta y sustancialmente más fácil de los productos deseados. Lo que ahora se sabe es que dicho transportador LanT o equivalente funcional del mismo actúa sobre el (poli)péptido no modificado al cual está aún unido el líder, un campo de este tipo se refiere a la expresión y producción de (poli)péptidos recombinantes de origen no bacteriano y se refiere a la expresión y/o producción de un (poli)péptido de origen eucariota (de origen vegetal, animal o fúngico) o también viral. Actualmente dichos péptidos se producen ampliamente por medios recombinantes para su uso en la producción de productos farmacéuticos, por ejemplo, como compuestos activos tales como una hormona (poli)peptídica, o una citocina, o un
30 fragmento de anticuerpo, o un agente biopesticida, o como un antígeno para una vacuna o composición inmunogénica. Sorprendentemente, ahora es posible el uso de un sistema transportador de tipo lantibiótico para exportar péptidos de origen eucariota o viral y no sólo de origen bacteriano (procariota). En una primera realización, la invención proporciona un método que permite la recogida extracelular de un (poli)péptido deseado - que puede estar fuera del campo de los lantibióticos bacterianos incluso ser de origen eucariota o viral - producido por una célula hospedadora recombinante, comprendiendo dicho método las etapas de: a) seleccionar una célula hospedadora recombinante que comprenda, o este dotada de, un primer ácido nucleico recombinante que tiene un primer fragmento de ácido nucleico que codifica un péptido líder y un segundo fragmento de ácido nucleico que
40 codifique dicho (poli)péptido deseado (en la Tabla 1 se proporcionan ejemplos útiles de los mismos), mediante el cual dicho primer y segundo fragmento se encuentran dentro de la misma fase de lectura abierta de dicho primer ácido nucleico y dicho péptido líder es al menos funcionalmente equivalente a un péptido líder N-terminal encontrado con el péptido de un lantibiótico (en la Tabla 2 se proporcionan ejemplos útiles de dicho péptido líder) y seleccionar dicha célula hospedadora con respecto a la presencia de una proteína transportadora de lantibiótico normalmente conocida como LanT (pudiendo ser dicha célula hospedadora un procariota Gram-positivo o Gram-negativo o un eucariota dotado con dicho transportador) y permitir la traducción de dicho primer ácido nucleico. Como se dice, se prefiere que dicha célula esté esencialmente desprovista de actividad peptidasa líder, o comprenda peptidasa líder que no pueda escindir el péptido líder específico usado. Dicha célula hospedadora se obtiene, por ejemplo, al menos
45 funcionalmente, deleccionando el gen *lan P*.

50 En una realización preferida, la invención proporciona un método que permite la recogida extracelular de un (poli)péptido deseado que no ha sufrido modificación postraduccional intracelular que comprende la deshidratación de una serina o una treonina y/o la formación de puentes tioéter. En la descripción detallada del presente documento, se demuestra, por ejemplo, cómo obtener extracelularmente el prepéptido de nisina (es decir, el líder de nisina y nisina no modificada). El prepéptido de nisina se obtuvo usando una célula hospedadora seleccionada con respecto a la presencia de dos plásmidos, uno que codifica el prepéptido de nisina y uno que codifica NisT, mediante la cual dicha célula hospedadora se caracterizó adicionalmente por al menos la ausencia funcional de al menos uno de los otros productos génicos derivados del grupo génico *Nis*, tales como NisB, NisC o NisP.

60 Por tanto la invención proporciona un (poli)péptido que puede recogerse después de que el (poli)péptido se haya transportado desde la célula hospedadora productora, obviando la necesidad de someter a lisis o alterar las células hospedadoras para proceder a la recogida. Sin embargo, si se desea hacer eso, el polipéptido deseado puede por supuesto recogerse del interior de la célula también. Los cultivos de células dotados con dicha proteína transportadora ahora pueden mantenerse vivos y en uso, por lo cual el (poli)péptido deseado puede recogerse, por
65 ejemplo, del sobrenadante de células hospedadoras centrifugadas. No es necesario que de por sí estas células hospedadoras sean de origen Gram-positivo, pudiendo ahora proporcionarse procariotas Gram-negativas o incluso

eucariotas con dicho transportador colocado adecuadamente que potencie enormemente la gama de sistemas de expresión que puede usarse para expresar y producir un (poli)péptido deseado.

Adicionalmente la invención proporciona un método que permite la modificación extracelular de un (poli)péptido deseado producido por una célula hospedadora recombinante, comprendiendo dicho método las etapas de: a) seleccionar una célula hospedadora recombinante que comprenda un primer ácido nucleico que comprenda un primer fragmento de ácido nucleico que codifique un péptido líder y un segundo fragmento de ácido nucleico que codifique dicho (poli)péptido deseado, mediante lo cual dicho primer y segundo fragmento están dentro de la misma fase de lectura abierta de dicho primer ácido nucleico y dicho péptido líder es al menos funcionalmente equivalente a un péptido líder N-terminal encontrado con el prepéptido de un antibiótico de tipo silvestre, y b) seleccionar dicha células hospedadora con respecto a la presencia de una proteína transportadora normalmente conocida como LanT o un equivalente funcional de la misma y c) seleccionar dicha célula hospedadora con respecto a la presencia de una proteína esencialmente extracelular (tal como LanB, LanC o LanM) capaz de proporcionar modificación postraduccional, y d) permitir la traducción de dicho primer ácido nucleico. En una realización preferida, la invención proporciona un método que permite la modificación extracelular de un (poli)péptido deseado que no ha sufrido modificación postraduccional intracelular que comprende la deshidratación de una serina o de una treonina y/o la formación de puentes tioéter. Se prefiere que dicha enzima esencialmente extracelular sea capaz de deshidratar una serina o una treonina, o sea capaz de proporcionar la formación de puentes tioéter. En el presente documento con la invención se proporciona un método para la modificación de (poli)péptidos no antibióticos de tipo antibiótico, sorprendentemente incluso cuando dicho (poli)péptido es de origen esencialmente eucariota o viral. Esto resulta ser muy útil para alterar diversas características de dichos productos, especialmente relacionadas, por ejemplo, con la estabilidad o perfiles farmacológicos de (poli)péptidos útiles, tales como los que pueden seleccionarse de la Tabla 1. Por supuesto es útil usar un péptido como el seleccionado de la Tabla 2 o equivalentes funcionales de los mismos.

Adicionalmente, la invención proporciona un método que permite la modificación extracelular de un (poli)péptido deseado producido por una célula hospedadora recombinante, en el que dicha modificación comprende la formación de puentes tioéter. Preferentemente, la localización de serinas, treoninas o cisteínas en el (poli)péptido deseado se selecciona de tal manera que la formación del anillo tioéter por el sistema enzimático seleccionado se realiza naturalmente. Por ejemplo, la deshidratación de serina y treonina seguido de la formación de anillos tioéter por acoplamiento a cisteína se realiza preferentemente de la siguiente manera. En el caso de enzimas antibióticas que pertenecen a los antibióticos denominados de tipo B, la formación de anillos se produce a partir de serinas/treoninas deshidratadas a más cisteínas localizadas en el extremo C o en el extremo N. En el caso de enzimas antibióticas que pertenecen a los antibióticos denominados de tipo A la formación de anillos solo se produce a partir de serinas/treoninas deshidratadas a más cisteínas localizadas en el extremo C terminal. La conversión por enzimas que pertenecen a antibióticos de tipo A se produce a tiempo de dirección N a C terminal de serinas/treoninas deshidratadas a la cisteína más cercana localizada en el extremo C. En el caso de enzimas pertenecientes a antibióticos de tipo A, las lantioninas se forman a una distancia preferencial de uno a cuatro aminoácidos a cisteínas disponibles. Se prefiere más que haya de 2 a 3 aminoácidos entre una serina/treonina deshidratada en un lado y una cisteína en el otro lado. La distancia óptima es de dos aminoácidos. A partir de la Tabla 1 pueden seleccionarse péptidos con las distancias preferidas anteriores para la formación óptima de puentes tioéter. A distancias entre cuatro y trece aminoácidos la formación de lantionina puede producirse pero resulta ser menos eficaz. A estas distancias también se produce la deshidratación de serinas y treoninas sin formación posterior de lantionina después de la ausencia de deshidratación de serina/treonina. Se prefiere tener regiones flanqueantes de serinas y treoninas que permitan la actividad de la enzima deshidratante. Para ayudar a conseguir esto, se prefiere que al menos los seis a ocho aminoácidos (tres a cuatro a cada lado) que rodean las serinas/treoninas deshidratadas sean principalmente hidrófobos. En cada una de estas posiciones en el 40-80 % de los casos el aminoácido es preferentemente hidrófobo, en el 20-40 % hidrófilo, de los cuales en el 5-15 % están cargados positivamente. Se prefiere que apenas se produzcan aminoácidos cargados negativamente. La composición de las regiones flanqueantes en el (poli)péptido deseado preferentemente difiere de la de la serina y treonina en los péptidos líder de tipo antibiótico. En los péptidos líder las serinas y treoninas se producen pero nunca están deshidratadas, mientras que no se producen cisteínas. Las seis a ocho posiciones más próximas a las serinas/treoninas líder contienen menos aminoácidos hidrófobos y tienen aminoácidos más negativamente cargados que en las posiciones alrededor del propéptido de serina/treonina; por posición en solo el 20-40 % de los casos, el aminoácido es hidrófobo y en aproximadamente el 20 % de los casos se prefiere un aminoácido cargado negativamente.

Con respecto al sitio de escisión peptidasa existen al menos dos tipos de péptidos líder a partir de los cuales puede obtenerse orientación para diseñar mejor péptidos o proteínas escindibles. Una clase necesita la serina proteasa de tipo subtilina LanP para la escisión, que se produce después de Pro-Gln, Pro-Arg, Ala-Asp, Ala-Glu. En el caso de nisina, parece ser necesario un resto cargado positivamente en la posición -1 y un resto hidrófobo en la posición -4 para la interacción con NisP. Esta serina proteasa de tipo subtilina LanP actúa en los prepéptidos de, por ejemplo, Pep5, Epilancina K7, Nisina A, Nisina-Z, Epidermina, Gallidermina.

En las otras clases los péptidos líder se escinden después de las secuencias Gly-Gly, Gly-Ala o Gly-Ser. Lo último se mantiene para muchos otros péptidos líder de bacteriocina no antibióticos. Las proteasas de tipo subtilina no son conocidas por escindir estas secuencias, por tanto un tipo diferente de proteasa escinde estos péptidos líder. Se ha demostrado que en algunas bacteriocinas, tanto antibióticos como no antibióticos, esta segunda proteasa es un

dominio del sistema de transporte LanT. Este tipo de peptidasa líder actúa, por ejemplo, en prepéptidos de Lacticina-481, Variacina, Mutacina-II, Estreptococina-A-FF22, Salivaricina-A y Sublancina.

5 Además existe un lantibiótico de dos componentes, Citolisina-LL / Citolisina LS, del cual se escinde cada componente dos veces, una vez por la peptidasa de "tipo doble de glicina" y después de esto por la peptidasa de tipo subtilisina.

10 La invención proporciona adicionalmente un método para la modificación de un polipéptido deseado de acuerdo con la invención en el que dicha célula hospedadora es una procariota Gram-negativa o una eucariota. Además, la invención proporciona un (poli)péptido modificado con un método de acuerdo con la invención.

15 La invención también proporciona una célula hospedadora, tal como un procariota Gram-negativo o un eucariota, proporcionada con un ácido nucleico recombinante que comprende un primer fragmento de ácido nucleico que codifica un péptido líder y un segundo fragmento de ácido nucleico que codifica un (poli)péptido deseado, mediante el cual dicho primer y segundo fragmento se encuentra dentro de la misma fase de lectura abierta de dicho primer ácido nucleico y dicho péptido líder es al menos funcionalmente equivalente a un péptido líder N-terminal encontrado con el prepéptido de un lantibiótico. En una realización preferida, se proporciona una célula hospedadora de acuerdo con la invención en la que dicho (poli)péptido deseado es de origen esencialmente eucariota o viral, por ejemplo seleccionado de la Tabla 1 y/o en el que dicho péptido líder se selecciona de la Tabla 2.

20 Adicionalmente, la invención proporciona una célula hospedadora de acuerdo con la invención, proporcionada, dicha célula hospedadora con, o seleccionada para, la presencia de al menos una proteína LanT o equivalente funcional de la misma en el que dicha célula hospedadora se caracteriza adicionalmente por al menos la ausencia funcional de al menos uno de los otros productos génicos derivados del grupo génico *Lan*, tal como LanB, LanC, (o una parte funcional de LanM) o LanP. En una realización preferida, dicha célula hospedadora comprende un procariota Gram-negativo o un eucariota.

30 Dicha célula hospedadora, como se proporciona en el presente documento, encuentra un uso específico en un método de producción de un (poli)péptido para la recogida o modificación, como se proporciona en el presente documento anteriormente. Para los fines de recogida se prefiere especialmente que LanT esté presente pero que LanB y/o Lan C (o LanM), aunque preferentemente ambos, estén ausentes, al menos funcionalmente ausentes ya que obstaculizan la unión con, o interfieren con, el polipéptido que va a recogerse. Para los fines de modificación, se prefiere especialmente que LanT y una proteína esencialmente extracelular que permita la modificación extracelular, tal como LanB, Lan C o LanM, o en lugar de LanB, un fragmento LanM (preferentemente N-terminal) tenga función LanB o en lugar de LanC, un fragmento LanM (preferentemente C-terminal) tenga una función LanC presente, mientras que un grupo del producto génico lantibiótico adicionalmente extendido o incluso completo no esté preferentemente al menos funcionalmente presente.

40 Otra realización de la invención es una célula hospedadora que se proporciona con genes que codifican LanB, o la parte N-terminal equivalente de LanB, con o sin un gen que codifique LanT, que puede exportar prepéptidos lantibióticos deshidratados, que tienen mutaciones de tal manera que los fragmentos que se proporcionan con la deshidroalanina y/o deshidrobutirina puedan liberarse química o proteolíticamente. Dichos fragmentos pueden inhibidor una enzima, especialmente una proteasa, tal como cisteína proteasa o aspartil proteasa.

45 Además, la invención proporciona un ácido nucleico recombinante que comprende un primer fragmento de ácido nucleico que codifica un péptido líder y un segundo fragmento de ácido nucleico que codifica un (poli)péptido deseado, mediante lo cual dicho primer y segundo fragmento se encuentran dentro de la misma fase de lectura abierta de dicho ácido nucleico y dicho péptido líder es al menos funcionalmente equivalente a un péptido líder N-terminal encontrado con el prepéptido de un lantibiótico, y en el que dicho (poli)péptido deseado es de origen esencialmente eucariota o viral. Además, la invención proporciona una sustancia proteínica que comprende un polipéptido codificado por un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Dicha sustancia proteínica puede recogerse, o modificarse de acuerdo con un procedimiento como se proporciona en el presente documento. En el presente documento también se proporciona el uso de una célula hospedadora o un ácido nucleico o sustancia proteica de acuerdo con la invención para la producción de un (poli)péptido deseado, y su uso en la producción de una composición farmacéutica. En particular, la invención proporciona un (poli)péptido de origen procariota Gram-negativo o eucariota (en la Tabla 1 pueden encontrarse ejemplos) en el que una serina o una treonina se ha deshidratado o que se ha proporcionado con un puente tioéter. La ventaja de dicho polipéptido, subyace, por ejemplo, en la creación de variantes de fármacos conocidos, basados en péptidos o en proteínas, en el que, por ejemplo, la dosis o frecuencia de administración puede reducirse, disminuyendo de esta manera el coste del tratamiento, el tiempo del tratamiento y la incomodidad para el paciente; la creación de variantes de nuevos fármacos basados en proteínas o en péptidos donde el fármaco puede no haber sido eficaz o haberse admitido para su uso en una forma no estabilizada y la creación de nuevas entidades de por sí terapéuticas.

65 La invención se explica adicionalmente en la descripción detallada.

Leyenda de las figuras

- Figura 1 estructura peptídica de nisina y subtilina madura
- 5 Figura 2 organización genómica de genes implicados en la biosíntesis de subtilina y nisina
- Figura 3 modelo para la biosíntesis de nisina en el que la modificación se produce intracelularmente
- Figura 4 modelo para la biosíntesis de nisina en el que la modificación se produce extracelularmente
- 10 El prepéptido nisina se exporta por NisT ("T"), se deshidrata por NisB (B) extracelular y se somete a cierre de anillo tioéter por NisC (C) extracelular.
- La peptidasa líder extracelular, NisP (P) se escinde del péptido líder. La nisina interacciona con una histidina quinasa NisK (K) unida a membrana que fosforila un regulador de respuesta NisR (R), que en su giro activa la transcripción de los genes *nis* (+, +). Las células productoras se protegen contra nisina mediante la acción concertada del lipopéptido NisI y el sistema transportador NisEFG.
- 15
- Figura 5
Detección del péptido líder lantibiótico directamente del medio de cultivo por MALDI-TOFMS. Usando la combinación de cultivo en medio mínimo y ziptipping el sobrenadante de este cultivo, se obtuvieron muestras de suficiente pureza para MALDI-TOFMS a alta resolución. Esto permitió medir más significativamente el péptido líder nisina. Según lo que se sabe, esto nunca se ha publicado. La detección del péptido líder lantibiótico puede usarse por tanto para averiguar la exploración del (poli)péptido acoplado a este líder lantibiótico, es decir, en aquellos casos en los que la peptidasa líder actúa extracelularmente. Generalmente este método permite un alto nivel de detección para medir (poli)péptidos (lantibióticos) directamente del sobrenadante de cultivo.
- 20
- Figura 6
Transporte de prepéptido nisina no modificado mediante el transportador de nisina NisT. (Ejemplo 1)
- 30
- Figura 7
Transporte mediante NisT de una variante de angiotensina 1-7 fusionada al extremo C del líder de nisina. (Ejemplo 2)
- Figura 8
Transporte mediante NisT de una variante de vasopresina fusionada con al extremo C del líder de nisina. (Ejemplo 3)
- 35
- Figura 9
Transporte y deshidratación por NisBT del prepéptido de nisina. (Ejemplo 4)
- 40
- Figura 10AB
Transporte, deshidratación y formación de anillo en el prepéptido de nisina por células de *Lactococcus lactis* que tienen el plásmido pNGnis-ABTC.
- 45
- Figura 10A: sin inducción, Figura 10B: con inducción (Ejemplo 6)
- Figura 11
Transporte mediante NisT del prepéptido de nisina no modificado, extendido en el extremo C con una variante de encefalina. (Ejemplo 13).
- 50
- Se diluyeron cultivos de una noche de la bacteria *Lactococcus lactis* NZ9700, productora de nisina, que crecía en caldo M17 complementado con glucosa al 0,5 % a 1/100. A una densidad óptica de 660 nm igual a 0,4, las células se centrifugaron y el medio se sustituyó por medio mínimo (Jensen y Hammer, 1993. Appl. Environ. Microbiol. 59: 4363-4366) que contenía 1/1000 de sobrenadante de *Lactococcus lactis* NZ9700 de una noche filtrado con poros de 0,4 mm. Después de incubación durante una noche el medio se sometió a ziptipping usando ziptips de C18 (Millipore). Como una matriz para el análisis MALDI-TOFMS se utilizó ácido ciano cinamínico.
- 55
- La figura muestra un pico a 2349,6 correspondiente al péptido líder nisina (valor teórico de 2351,2). Dos subpicos, de 2372,5 y de 2388, correspondientes a aductos de sodio y potasio respectivamente. Un pico de 2482,2 corresponde al péptido líder nisina con la primera metionina aún unida (el valor teórico es idéntico: 2482,2). A una mayor masa los picos 3352,5, 3372,6 y 3390,1 corresponden a nisina, a un aducto de sodio y a un aducto de potasio respectivamente.
- 60

Descripción detallada

- Las enzimas de lantibióticos son especiales. No hay fuerte homología, o ninguna en absoluto, con otras enzimas. Se muestran secuencias de ADN o de aminoácidos de muchas enzimas de lantibióticos, pero sus estructuras no se han determinado. Los genes implicados en la biosíntesis, procesamiento y exportación de lantibióticos están presentes en un grupo *lanA B C / M (D) P R K T F E G I*. No hay orden uniforme u orientación de los genes en los diferentes grupos lo que indica que los reordenamientos se han producido en la evolución. Las lantioninas son los restos más típicos formados postraduccionalmente en antibióticos. Se forman en dos etapas. En primer lugar las serinas y treoninas del propéptido se deshidratan dando lugar a deshidroalaninas y deshidrobutirinas respectivamente. Se ha propuesto que LanB desempeña una función en la deshidratación, dado que tiene una escasa homología con IlvA, una treonina deshidratasa de *E.coli*. Además, se ha observado que la sobreexpresión de NisB aumenta la aparición de la deshidratación de serina 33 en nisina A, del 10 % en la situación normal hasta el 50 % en el caso de NisB sobreexpresada. La proteína LanB consta de aproximadamente de 1000 restos. LanB son proteínas asociadas a membrana. Se piensa que LanC es responsable de la adición posterior de grupos SH cisteína a los deshidro aminoácidos, que da como resultado los anillos tioéter. En el caso de PepC, datos experimentales apoyan esta idea. Las proteínas LanC actualmente conocidas se componen de aproximadamente 400 restos. En los lantibióticos de tipo A la parte N-terminal de los restos de lantionina y metilantionina se forman por los restos de deshidroalanina o deshidrobutirina, mientras que la mitad C-terminal se forma por los restos de cisteína.
- Las deshidroalaninas y deshidrobutirinas son esenciales en diversos (poli)péptidos para la actividad del (poli)péptido específico. Los restos deshidro son, por ejemplo, esenciales para la inhibición mediada por nisina del crecimiento de esporas bacterianas (Liu y Hansen 1996. *Appl Environ. Microbiol.* 59: 648-651), para un antagonista del receptor de neuroquinina (Lombardi et al 1998. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 8: 1153-1156), para la fenilalanina amonio ligasa (Schuster y Rétey 1995 *PNAS* 92: 8433-8437) para un inhibidor de tripeptidilpeptidasa II (Tomkinson et al., 1994. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 314: 276-279), para un péptido inhibidor de proteasa del VIH-1 (Siddiqui et al. 2001. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics.* 38: 90-95), para la actividad de péptidos contra bacterias Gram-negativas (Ferrari et al 1996 2: 4- *Journal of Antibiotics*) y para la actividad de péptidos antifúngicos (Kulanthaivel et al WO 2000063240). Los (poli)péptidos que contienen restos deshidro pueden producirse por células que tienen LanT y LanB o LanT en la parte N-terminal de lanM que es equivalente a LanB. Las actividades anteriormente mencionadas pueden ser de importancia económica significativa. Por ejemplo la inhibición de la tripeptidil peptidasa II es de relevancia en la lucha contra la obesidad. Esto es obvio por el hecho de que la tripeptidil peptidasa II degrada el octapéptido colcistoquinina-8, un agente saciante endógeno.
- La formación de lantionina entre deshidrobutirina y cisteína es energéticamente posible a temperatura ambiente y puede también producirse espontáneamente.
- La maduración y secreción del lantibiótico se piensa que se produce en el complejo multimérico lantionina sintetasa asociado a membrana que consta de las proteínas LanB, LanC y las moléculas transportadoras ABC LanT. Al menos dos moléculas de LanC y dos moléculas de LanT forman parte del complejo de modificación y transporte. Algunos lantibióticos no tienen el gen *lanB*, pero tienen un gen *lanM* mucho más grande, cuyo producto tiene cierta homología en el extremo C con el producto génico *lanC*. Dado que ningún homólogo de *lanB* está presente en grupos productores de LanM la parte N-terminal de la proteína LanM podría realizar la reacción de deshidratación típicamente realizada por LanB. La síntesis química de los lantibióticos es posible pero es extremadamente costosa y requiere mucho tiempo. Muchos lantibióticos mutantes que contienen sustituciones de aminoácidos se han obtenido por modificación con ingeniería genética. Sin embargo, a pesar de muchos estudios, hasta ahora solo se ha obtenido en el lantibiótico Pep5 un anillo de lantionina en una nueva posición.
- Como se ha dicho, los sistemas exportadores de lantibióticos, LanT, (cuyas secuencias ya se conocen) se piensa en general que están dedicados al transporte del lantibiótico completamente modificado. De hecho se ha comunicado que las dos enzimas implicadas en la formación de lantionina en nisina (NisB y NisC) se localizan intracelularmente en un complejo asociado a membrana NisBCT (Siegers et al., 1996). Dicha localización intracelular sugiere que los prepéptidos están deshidratados por LanB después de lo cual, se forman los anillos por LanC seguido de la exportación por LanT. Además, si las enzimas formadoras de anillos tioéter, NisB (responsables de la deshidratación, que es la primera etapa en la formación de anillos) o NisC (responsable de la formación de anillos entre restos deshidro y cisteína) están inactivadas por delección en fase de 61 aa o por inserción plasmídica, respectivamente, ya no se exporta ningún péptido. Esto último sugiere que la ausencia de metil(lantioninas) impide la exportación.
- Sin embargo, sorprendentemente ahora se ha medido que el prepéptido, tal como el prepéptido nisina, puede transportarse a través del transportador de nisina. Este resultado se obtuvo usando una cepa con dos plásmidos, uno que codificaba el prepéptido nisina y uno que codificaba el transportador de nisina. No se observó producción de prepéptido en un experimento de control en el que se utilizó una cepa solo con el plásmido que codificaba el prepéptido. Algunos lantibióticos contienen serinas/treoninas deshidratadas que no participan en la formación de anillos tioéter. A partir de lo anterior, en combinación con la observación de que el péptido no modificado se exporta, puede formularse la teoría de que la translocación del prepéptido sin anillos tioéter también es posible pero con restos deshidro. Se sabe que la segunda etapa en la formación de anillos de lantionina es menos difícil de realizar

dado que también puede producirse espontáneamente a temperatura ambiente. Por lo tanto, después de la producción de prepéptidos con restos deshidro pueden formarse anillos de lantionina extracelularmente.

5 Para impedir incompatibilidades celulares con (poli)péptidos recién formados que contienen tioéter y/o restos deshidro, puede realizarse síntesis *in vitro* de (poli)péptidos con tioéter. Al revés, vesículas de membrana con LanB o LanBC o LanBT o LanBCT o LanMT, obtenidas por células sometidas a prensa francesa, pueden mezclarse con un extracto celular, obtenido sometiendo a ultrasonidos un sedimento celular y centrifugando, con ATP y un sistema generador de ATP, con inhibidores de proteasa y con una fusión (poli)péptido-líder con serinas/treoninas y cisteínas en posiciones adecuadas. En el caso de vesículas que contienen LanC o LanCT péptidos con restos deshidro 10 pueden cerrarse por LanC para formar enlaces tioéter estereoespecíficamente. Después de someter a agitación vorticial con un volumen de cloroformo y centrifugación el sobrenadante contiene el péptido de fusión con anillos tioéter y/o restos deshidro como se muestra por análisis Maldi TOF del sobrenadante sometido a ziptipping. La formación de anillos se deduce de la masa observada después de peroxidación dado que la peroxidación hace que se produzca a una adición de tres oxígenos a cisteínas libres, mientras que solo 1 o 2 átomos de oxígeno forman 15 puentes tioéter.

20 Para las actividades *in vitro* de LanB, LanC y lanM, en lugar de usar vesículas de membrana obtenidas mediante prensado con prensa francesa, también pueden reconstituirse enzimas de lantibióticos aisladas producidas por organismos bacterianos o eucariotas en vesículas de membrana o liposomas.

También puede usarse LanC (o LanM C-terminal) (que contiene vesículas o proteoliposomas) en ensayos *in vitro* para la generación de lantioninas estereoespecíficas en procedimientos químicos de formación de lantionina, que en ausencia de lanC producen diastereómeros (Galande y Spatola 2002. Letters in Peptide Science 8: 247-251).

25 El presente hallazgo proporciona la posibilidad de fabricar nuevos lantibióticos y por tanto estabilizar péptidos / proteínas mediante anillos tioéter, D-alaninas u otros restos formados por enzimas de lantibióticos. Antes de la formación de (metil)lantionina, típicamente la distancia de los restos deshidro a cisteínas es de 2-5 restos pero también son posibles distancias mucho más largas. Las (metil)lantioninas pueden formarse a partir de restos deshidro localizados más N-terminalmente o localizados más C-terminalmente. Además el sistema transportador de 30 lantibióticos puede usarse para la exportación de otras proteínas insertando la secuencia que codifica el péptido líder delante de la secuencia de ADN de proteína.

También pueden obtenerse (poli)péptidos cortos con restos deshidro y/o anillos tioéter incorporándoles una secuencia de ADN lantibiótico. Por ejemplo en un péptido eucariota específico de 10 aminoácidos un anillo tioéter 35 puede modificarse con ingeniería genética de la siguiente manera. Basándose en un lantibiótico de 20 aminoácidos con un anillo tioéter entre la posición 13 y 16 puede diseñarse una secuencia de ADN que codifique los 10 primeros aminoácidos del lantibiótico seguido de los 10 aminoácidos del péptido eucariota con una serina en la posición 13 y una cisteína en la posición 16. Introduciendo genéticamente un sitio de escisión (químico) el péptido híbrido resultante, exportado en el medio, puede escindirse y el péptido eucariota con anillo tioéter se libera.

40 Se ha descrito que un (poli)péptido puede agregarse genéticamente detrás de un lantibiótico y exportarse (Hansen, US2002019518: Construction of a strain of bacillus subtilis 168 that displays the sublancin lantibiotic on the surface of the cell). Sin embargo también es posible agregar (poli)péptidos genéticamente detrás de una secuencia de lantibiótico y tener el (poli)péptido de fusión resultante sin modificación exportada por LanT, o exportada por LanBT 45 solo con deshidratación de serinas y treoninas en el lantibiótico y en el (poli)péptido agregado sin la formación de anillo o exportado por LanBTC/LanMT con deshidratación y formación de anillo tanto en el lantibiótico como en el (poli)péptido agregado.

50 También es posible generar un (poli)péptido que contenga lantionina y/o restos deshidro omitiendo un fragmento C-terminal de una secuencia de lantibiótico y añadiendo un fragmento más largo a la secuencia de lantibiótico restante. Por ejemplo la secuencia del lantibiótico nisina de 34 aminoácidos puede reemplazarse por los 30 primeros aminoácidos N-terminales y extenderse en el extremo C en 6 aminoácidos: KYSGFC. Después de la deshidratación y formación de anillo tioéter por células con NisBTC, y tratamiento extracelular con tripsina, se produce una variante de encefalina lantionina. En este caso el resto Ser33 de nisina forma parte de la molécula de encefalina recién 55 formada después de la deshidratación y formación de lantionina. La tripsina libera la encefalina por escisión detrás del resto de lisina que reemplaza la histidina en nisina. Se conocen variantes de encefalina lantionina activas (Svenssen et al 2003. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 304: 827-832).

60 Ya se han previsto diversos usos. Por ejemplo, fármacos basados en péptidos/proteínas que se degradan rápidamente en el plasma sanguíneo pueden protegerse contra la proteólisis mediante anillos tioéter. Además, los nuevos lantibióticos pueden usarse como antibióticos especialmente contra bacterias Gram-positivas. Esto es útil dado que hay una creciente y propagada resistencia contra antibióticos clásicos. Además, los nuevos lantibióticos pueden usarse como aditivos (alimentarios) para impedir el crecimiento bacteriano y aumentar la vida útil de los productos (alimentarios). El dominio de la síntesis enzimática de anillos tioéter proporciona adicionalmente 65 la posibilidad de sintetizar una amplia diversidad de nuevos péptidos antimicrobianos, que ofrecen muchas posibilidades para evadir la resistencia. Los lantibióticos tienen diversas actividades antimicrobianas:

permeabilización de membranas, inhibición de síntesis de paredes celulares, modulación de actividades enzimáticas, inhibición del crecimiento de esporas. Los nuevos péptidos o proteínas de tipo lantibiótico son más estables (es decir, menos propensos a escisión proteolítica) y pueden tener actividad modulada o un espectro de actividad diferente. En el presente documento se proporciona una selección de dichos péptidos o proteínas en los ejemplos que continuación se ofrecen. Pueden modificarse genéticamente deshidropéptidos que pueden usarse para bloquear la actividad enzimática, especialmente actividad proteasa.

EJEMPLO 1

10 El transportador NisT puede transportar el prepéptido nisina no modificado

Este ejemplo implica una cepa de *Lactococcus lactis* que carece del grupo génico de nisina cromosómico completo, pero produce simultáneamente el prepéptido NisT codificado por plásmido y NisA. NisA no modificado puede encontrarse en el sobrenadante de cultivo, lo que demuestra que NisT es eficiente para el transporte de prepéptidos no modificados al exterior de la célula.

Materiales y métodos:

20 Usar para la expresión inducible de nisina de *nisT* en *Lactococcus lactis* un plásmido derivado de pNZ8048 (Kuipers et al. 1997. Tibtech. 15: 135-140). Amplificar el gen *nisT* usando los cebadores NisT.fw (5'-CGG TCT CCC ATG GAT GAA GTG AAA GAA TTC ACA TCA AAA C) y NisT.rev (5'-CGG TCT CTC TAG ATT ATT CAT CAT TAT CCT CAT ATT GCT CTG) con ADN cromosómico de NZ9700 (una cepa de *L. lactis* productora de nisina; Kuipers et al. 1997. Tibtech. 15: 135-140) como molde.

25 Usar como condiciones PCR: 5 min 94 °C, 30 veces [30 s 94 °C, 30 s 50 °C, 3 min 72 °C], 10 min 72 °C. Purificar el producto PCR con el kit de aislamiento PCR de Roche. Digerir el vector de expresión con *NcoI/XbaI* y el fragmento PCR con *Eco31I* (subrayado en los cebadores, los extremos adhesivos que esto genera se indican en cursiva y son compatibles con *NcoI* y *XbaI*) y ligar posteriormente los fragmentos usando T4 ligasa (Roche). Denominar al plásmido resultante *pNG-nisT*. Este plásmido contiene un gen de resistencia a cloranfenicol (Cm) como marcador de selección.

35 Usar para la producción inducible de nisina del prepéptido NisA en *L. lactis* una variante de pNZ8048 que contenga un marcador de selección de resistencia a eritromicina (Em) en lugar de un marcador Cm. Amplificar el gen *nisA* usando los cebadores NisA.fw (5'-CGG TCT CTC ATG AGT ACA AAA GAT TTT AAC TTG GAT TTG G) y NisA.rev (5'-TAT ATG GAT CCT TTG CTT ACG TGA ATA CTA CAA TGA CAA G) y ADN cromosómico de la cepa NZ9700 como molde en las mismas condiciones a las descritas anteriormente. Purificar el producto PCR con el kit de aislamiento PCR de Roche. Digerir el vector de expresión con *NcoI/BamHI* y el fragmento PCR con *Eco31I* y *BamHI* (subrayado en los cebadores, los extremos adhesivos que esto genera se indican en cursiva y son compatibles con *NcoI* y *BamHI*) y ligar posteriormente los fragmentos usando T4 ligasa (Roche). Denominar al plásmido resultante *pNG-nisA*.

45 Cultivar las cepas de *L. lactis* NZ9000 o PA1001 (un derivado de NZ9000 que carece de actividad AcmA para anular la lisis celular (Buist et al. 1995. J. Bacteriol. 177: 1554-1563) y que carece de HtrA para disminuir la actividad proteolítica extracelular (Poquet et al. 2000. Mol. Microbiol. 35: 1042-1051) con *pNG-nisT* (Cm) y *pNG-nisA* (Em) en medio basado en M17 (Terzaghi y Sandine. 1975. Appl. Microbiol. 29: 807-813) a una DO₆₀₀ de 0,4. Recoger las células por centrifugación y resuspender en el mismo volumen de Medio Mínimo (Jensen y Hammer, 1993. Appl. Environ. Microbiol. 59: 4363-4366) e inducir para la expresión del prepéptido NisT y NisA por adición de nisina como se ha descrito anteriormente (Kuipers et al. 1997. Tibtech. 15: 135-140). Después de inducción durante una noche y posterior centrifugación, pipetear los sobrenadantes de cultivo hacia arriba y abajo en ziptips C18 (Millipore): dos veces con 10 µl de acetonitrilo al 50%, seguido de dos veces con 10 µl de agua desmineralizada, seguido de ocho veces con 10 µl de sobrenadante, seguido de lavado 2 veces con 10 µl de agua desmineralizada, seguido de elución usando 2 veces 10 µl de acetonitrilo al 50 % que contiene TFA al 0,1 %. Secar al vacío el eluyente final y conservar a -20 °C hasta análisis por espectrometría de masas. Antes del análisis resuspender el material seco en 2,5 µl de acetonitrilo al 50 % que contiene TFA al 0,1 % y aplicar 1 µl a la diana. Después de secar, aplicar 1 µl de matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxycinnámico 10 mg/ml completamente disuelto (calentando suavemente y sometiendo a agitación vorticial) en acetonitrilo al 50 % que contiene TFA al 0,1 %) a la diana. Usar los siguientes ajustes laser (modo lineal) MALDI-TOFMS: energía ordinaria 100 %, fina 50 %, fuente 20 KV, extra 19800, fuerza 15000, supresión 500, tiempo de impulso 40, tensión de pulso 2200, velocidad de muestreo 500 MHz, sensibilidad 50 mV, disparos 15.

Resultados

Análisis de los sobrenadantes de cultivo de los siguientes cultivos inducidos y análisis por MALDI-TOFMS:

65 NZ9000 (o PA1001)

NZ9000[pNG-*nisA*] (o PA1001)[pNG-*nisA*]
 NZ9000[pNG-*nisA* + pNG-*nisT*] o (PA1001[pNG-*nisA* + pNG-*nisT*])

5 No se observan picos en las muestras derivadas de los cultivos A y B. La medición en la muestra C con dos picos principales: Figura 6. El primero próximo a o idéntico a 5832.8 Da correspondiente al prepéptido de nisina no modificado: (5831.8 más 1 protón). El segundo con aproximadamente una masa mayor de 130 Da que el primero, que correspondería al prepéptido de nisina con dos átomos de cinc (Bierbaum, G. 1999. Ed. J. W. Kelly. Amino acids, Peptides, Porphyrins, Alkaloids 4, 275-301. Elsevier. Comprehensive Natural Products Chemistry. Eds. D. Barton, K. Nakanishi & O. Meth-Cohn) o - más probablemente- al prepéptido de nisina con la metionina en posición 1
 10 aún presente. Este resultado es coherente con el prepéptido de nisina no modificado que transporta el transportador de nisina NisT. Este resultado demuestra inequívocamente que NisT es suficiente para el transporte del prepéptido de nisina y que la modificación previa al transporte no es necesaria.

15 EJEMPLO 2

Transporte mediante NisT de un péptido de fusión del líder de nisina y una variante de angiotensina

Este ejemplo describe el transporte fuera de *Lactococcus lactis* mediante el transportador de nisina NisT de una variante de angiotensina¹⁻⁷ que está precedida por el líder de nisina. Se muestra una vez más que el transportador de nisina no es específico para la nisina, pero que pueden transportarse muchos (poli)péptidos siempre que estén fusionados con el líder de nisina.

Materiales y métodos.

25 Como en el ejemplo 3, se obtiene la fusión genética precisa de un péptido eucariota, en este ejemplo angiotensina 1-7, delante del líder de nisina.

La obtención del gen de la variante de angiotensina 1-7 se realiza hibridando dos oligonucleótidos fosforilados: ang1: 5' ACGCAATCGT-TCTTATATTTGTCTTAAG 3' y ang2: 5' GATCCTTAAGGACAAATATAAGAACGATT 3'

30 El fragmento hibridado incluye un codón de terminación y tiene en su extremo 5' el saliente ACGC y en el extremo 3' un extremo adhesivo compatible con *Bam*HI. Ligar el fragmento génico hibridado en pLP1 digerido por *Eco*31I y *Bam*HI y denominar al plásmido resultante pLP1ang.

35 Inducir la cepa PA1001 portadora de pNGnisT (ejemplo 1) y pLP1ang para la expresión como se describe en el ejemplo 1. Realizar purificación del péptido segregado y realizar análisis por MALDI-TOFMS (modo lineal) esencialmente como se describe en el ejemplo 1.

Resultado

40 Figura 7: las muestras derivadas del sobrenadante sometido a ziptipping de PA1001 + pNGnisT + pLP1ang muestran un pico Maldi TOF correspondiente al líder de nisina fusionado a la variante de angiotensina 1-7. Este pico no aparece en muestras derivadas de células solo con pNGnisT o solo con pLPang1. Estos datos demuestran que NisT puede transportar el péptido de fusión angiotensina-líder fuera de la célula.

45 EJEMPLO 3

Transporte mediante NisT de un péptido de fusión del líder de nisina y una variante de vasopresina

50 Este ejemplo muestra la exportación fuera de *Lactococcus lactis* PA1001 mediante NisT de una fusión del líder de nisina ampliado en el extremo C con una variante de vasopresina. La vasopresina es una hormona antidiurética peptídica de 9 aminoácidos (aa). Tiene cisteínas en la posición 1 y 6: CYFQNCPRG que forman un enlace disulfuro interno. Este ejemplo implica una variante de vasopresina C1S. Este ejemplo implica fusión precisa de vasopresina modificada con serina (SerVaso) en el péptido líder NisA de nuevo por modificación genética.

Materiales y métodos

60 Para obtener una fusión exacta y en marco de SerVaso con el péptido líder NisA, convertir primero un vector de expresión pNZ8048 derivado del plásmido pNG-*nisI*-SC3, que contiene SC3 detrás del líder de nisina en un vector de secreción líder-péptido NisA general. Introducir sitios de restricción adecuados y eliminar las secuencias c-myc-SC3 por amplificación PCR de todo el plásmido usando los cebadores: pLP.1 (5'-CGG TCT CAG CGT GGT GAT GCA CCT GAA TC) y pLP.2 (5'-CCA CGCTGA GAC CGC AGC TGG GAT CCG GCT TGA AAC GTT CAA TTG AAA TGG). Cortar el producto PCR con *Eco*31I (secuencias subrayadas en los cebadores) dando como resultado extremos adhesivos (en cursiva en las secuencias de cebadores) que son compatibles para el autoligamiento del plásmido. Después del autoligamiento, el plásmido resultante, pLP1, puede usarse para la fusión precisa de péptidos y proteínas después de la secuencia de aa GASPR del péptido líder NisA usando el sitio de restricción *Eco*31I. Los

fragmentos de ADN a insertar en esta posición deben contener un extremo adhesivo 5'- ACGC para permitir el ligamiento. En el extremo 3' el fragmento de ADN debe contener un extremo adhesivo que sea compatible con *Bam*HI (el sitio introducido por el cebador pLP.2, se indica en negrita).

5 Obtener el gen *SerVaso* hibridando dos oligómeros: VP. 1: 5'-ACG CTC ATA TTT TCA AAA TTG TCC TCG TGG TTA AG y VP.2: 5'-GAT CCT TAA CCA CGA GGA CAA TTT TGA AAA TAT GA. El fragmento hibridado incluye un codón de terminación y tiene en su extremo 5' el saliente ACGC y en el extremo 3' un extremo adhesivo compatible con *Bam*HI. Ligar el fragmento génico *SerVaso* en pLP1 digerido con *Eco*311 y *Bam*HI y denominar al plásmido resultante pLP1vp.

10 Inducir la cepa PA1001 portadora de pNGnisT (ejemplo 1) y pLPvp para la expresión como se describe en el ejemplo 1. Realizar la purificación del péptido segregado y realizar análisis por MALDI-TOFMS (modo lineal) esencialmente como se describe en el ejemplo 1.

15 Resultado

Figura 8. Una masa MALDI-TOFMS coherente con la exportación del péptido de fusión del líder nisina ampliado en el extremo C por vasopresina C1S. Este resultado demuestra que un péptido eucariota puede fusionarse con un péptido líder de lantibiótico y, como tal, exportarse mediante un transportador de lantibiótico.

20 EJEMPLO 4

Exportación del prepéptido de nisina mediante el transportador de nisina NisT y modificación por la enzima deshidratante de nisina NisB sin formación enzimática posterior de puentes tioéter.

25 Materiales y métodos

30 Clonar *NisBT* como en el ejemplo 1 usando los cebadores *nisB fw*, (5'-CGG TCT CGC ATG ATA AAA AGT TCA TTT AAA GCT CAA CCG TTT TTA GTA AG) y *nisT rev* (5'-CGG TCT CTC TAG ATT ATT CAT CAT TAT CCT CAT ATT GCT CTG). Transformar NZ9000 + pNG-*nisBT* (Cm) con pNG-*nisA* (Em) (construido como en el ejemplo1). Cultivar en medio mínimo células NZ9000 + pNG-*nisBT* + pNG-*nisA* e inducir como en el ejemplo 1. Someter a ziptipping el sobrenadante y analizar por MALDI-TOFMS como en el ejemplo 1.

35 Resultados

Figura 9. Un pico MALDI-TOFMS de aproximadamente 5690 Da en la muestra derivada del sobrenadante de células NZ9000 + pNG-*nisBT* + pNG-*nisA*. Ausencia de este pico en muestras derivadas del sobrenadante de NZ9000 + pNG-*nisT* + pNG-*nisA* (ejemplo 1). Coherente con la deshidratación de la mayoría de las serinas (probablemente Ser33 permanece sin modificar como en la propia nisina) y todas las treoninas.

40 EJEMPLO 5

Exportación del prepéptido de nisina mediante el transportador de nisina NisT y modificación por la enzima deshidratante de nisina NisB sin formación enzimática posterior de puentes tioéter.

45 Materiales y métodos

50 Construir el plásmido pNG-*nisABT* similar a la organización de estos genes el productor de nisina de tipo silvestre NZ9700, que es con una repetición invertida entre los genes *nisA* y *nisBT*. En resumen: realizar PCR sobre ADN cromosómico con los cebadores *nisAfw*: 5' CGG TCT CTC ATG AGT ACA AAA GAT TTT AAC TTG GAT TTG G 3' y *nisTrev*: 5' CGG TCT CTC TAG ATT ATT CAT CAT TAT CCT CAT ATT GCT CTG 3'. Clonar el producto PCR en pGEM-T (ligamiento A-T). Digerir pGEM-T-*nisABT* con *Bsa*I. Ligar *nisABT* (*Bsa*I) con pNG8048E(*ncol*/XbaI). Transformar este plásmido en NZ9000, cultivar e inducir. En este caso, después de la inducción *nisBT* se transcribe solo en baja cantidad por lectura limitada. Someter el sobrenadante a ziptipping y MALDI-TOFMS como en el ejemplo 1.

55 Resultados

60 Un pico MALDI-TOFMS de aproximadamente 5690 coherente con la exportación del prepéptido de nisina y con la deshidratación de las serinas (la mayoría) y treoninas (todas) del propéptido.

EJEMPLO 6

65 Exportación del prepéptido de nisina mediante el transportador de nisina NisT y modificación por la enzima deshidratante nisina NisB seguido de la formación de puentes tioéter mediada por NisC, que implica un plásmido pNG-*nisABTC*.

Materiales y métodos

Construir el plásmido pNG-nisABTC similar a la organización de estos genes en el productor de nisina de tipo silvestre NZ9700, que es con una repetición invertida entre los genes *nisA* y *nisBTC*. Esta construcción puede realizarse de manera análoga a la construcción de pNGnisABT descrita en el ejemplo 5, usando - en lugar de nisT rev- nisC rev: 5' CGG TCT CTC TAG ATC ATT TCC TCT TCC CTC CTT TCA AAA AAT C 3'.

Como alternativa, y esta es la construcción del plásmido que contiene *nisABTC* con el que se obtuvieron los datos presentados, clonar los genes *nisABTC* sobre un plásmido de entrada. Restringir pNG8048E con HindIII. Retirar el fragmento que contiene Em-r aislando el fragmento vectorial (3 kb) del gel. Autoligar el fragmento vectorial y denominar al vector resultante pBMDLI. Realizar PCR con pBMDLI para perder el Cm-r e introducir un sitio PstI y un sitio XbaI. Aislar este fragmento este fragmento aislado fuera del gel y estringir con PstI y XbaI. Cortar pNG8048E también con PstI y XbaI para obtener el fragmento Em-r. Aislar este fragmento de 1 kb fuera del gel y ligar con el producto PCR anterior. Nombrar al nuevo plásmido pBMDL2. Restringir pBMDL2 con SmaI para linealizarlo y obtener extremos romos. Insertar un Casete de Conversión Vectorial de Entrada (RfA) (1,7 kb) por ligamiento en el extremo romo. Obtener así un vector denominado pBMDL3. Para preparar un vector que contenga los genes *nisABTC*, introducir sitios attB de entrada mediante PCR. El fragmento PCR de 6,4 kb se depuró sobre una columna del kit Zymoclean DNA Clean & Concentrator. Se realizó una reacción BP con este producto PCR y pDONR201 (Invitrogen) durante la incubación ON a 25 °C. Obtener el vector de entrada pBMDL4 en células DH5alfa de *E.coli* mediante transformación química. Realizar, con este vector de entrada pBMDL4 y el ya creado pBMDL3, una reacción LR. Obtener el vector pBMDL5 (con *nisABTC*) en EC1000 de *E.coli* (que contiene RepA en el cromosoma) mediante electroporación. Aislar pBMDL5 (que contiene *nisABTC*) y transformar en PA1001 (electroporación).

Cultivar NZ9000 + pBMDL5 (o pNGnisABTC) y comparar muestras inducidas y no inducidas. Analizar el sobrenadante como en el ejemplo 1. Después de esto, someter el sobrenadante tratado con tripsina a un ensayo de inhibición de crecimiento de *Lactococcus lactis* resistente a eritromicina, sensible a nisina. Además, ensayar la capacidad del sobrenadante sometido a tripsina para inducir al promotor de nisina con el ensayo Gus (Kuipers et al. 1995. J. Biol. Chem. 270: 27299-27304)

Resultados

En la muestra no inducida se observa un pico pequeño del prepéptido modificado (deshidratación y formación de lantionina) y un pico más grande del prepéptido no modificado (Figura 10A). En la muestra inducida se observa un pico grande del prepéptido modificado (deshidratación y formación de anillo de lantionina) y un pico pequeño que correspondería al prepéptido modificado con metionina 1 (Figura 10B). Las muestras sometidas a tripsina de ambos sobrenadantes, inducido y no inducido, fueron capaces de inducir al promotor de nisina, según medición realizada con el ensayo Gus. Los sobrenadantes sometidos a tripsina e inducidos tienen capacidad inhibitoria de crecimiento comparable a la del sobrenadante del productor de nisina de tipo silvestre NZ9700. Aparentemente el promotor de nisina es permeable. Este resultado en la muestra no inducida confirma de nuevo el resultado del ejemplo 1 de que el prepéptido no modificado puede exportarse.

Estos resultados de las muestras inducidas son coherentes con la exportación del prepéptido de nisina que ha sufrido todas las formaciones de puentes de lantionina. La tripsina se escinde del líder liberando nisina activa con actividad antimicrobiana y capacidad inductora. Por lo tanto NisBTC es suficiente para la formación de lantionina.

EJEMPLO 7

Síntesis mediada por EpilancinaBC por *Staphylococcus epidermis* (procariota, Gram-positivo) del líder de epilancina (tabla 2) acoplado a glucagón (tabla 1) con anillos tioéter.

La secuencia [C5, S24, C29] de glucagón es HSQGCFTSDYSKYLDSRRAQDFVSWLMNC (tabla 1). Esta secuencia permite que las enzimas epilancina K7 formen anillos tioéter entre S2-C5 y S24-C29.

Materiales y métodos

Clonar una construcción líder-epilancina K7 después de una fase de lectura abierta por glucagón mutante, seguido por epilancina BTC. Transformar el plásmido anterior a *Staphylococcus epidermis*. Inducir la transcripción. Continuar el cultivo celular durante una noche en medio mínimo, centrifugar, realizar ziptipping del sobrenadante y análisis MALDI-TOFMS (modo lineal).

Resultado

Como se indica en la Tabla 1, se observa un pico MALDI-TOFMS coherente con la producción de glucagón con serinas y treoninas deshidratadas y anillos tioéter. El análisis Maldi TOF de las muestras peroxidadas indica la formación de puentes tioéter, ya que pueden añadirse 3 oxigenos a las cisteínas mientras que a los puentes tioéter pueden añadirse uno o dos oxígenos.

EJEMPLO 8

Producción por *Streptococcus salivarius* (procariota Gram positivo) de taquilepsina I [S3, S12] I (tabla 1) después de exportación mediante SalT.

5

Materiales y métodos

Clonar una construcción líder-salivaricina (tabla 2) después de una fase de lectura abierta por taquilepsina mutante (tabla 1). Clonar la *salivaricina T* en un segundo plásmido con un marcador antibiótico diferente. Transformar ambos plásmidos a una cepa de *Streptococcus salivarius* desprovista de genes de salivaricina. Inducir la transcripción de ambos plásmidos, durante 2-4 horas de cultivo continuado. Añadir cada 30 min pmsf (inhibidor de proteasa) 0,2 mM. Realizar ziptipping como en el ejemplo 1y analizar por MALDI-TOFMS (modo lineal).

10

Resultado

15

Se observa un pico por espectrometría de masas correspondiente a la taquilepsina.

EJEMPLO 9

Producción por *Streptococcus salivarius* (procariota Gram positivo) de taquilepsina I [S3, S12] (tabla1) con serina-3 y serina-12 deshidratadas con salivaricinaB sin formación enzimática posterior de anillo tioéter.

20

La taquilepsina tiene la siguiente secuencia [S3,S12]: KWSFRVCYRGISYRRCR

25 Materiales y métodos

Clonar una construcción líder - salivaricina (tabla 2) después de una fase de lectura abierta por taquilepsina mutante (tabla 1). Clonar la *salivaricinBT* en un segundo plásmido con un marcador antibiótico diferente. Transformar este plásmido a una cepa de *Streptococcus salivarius* desprovista de genes de salivaricina. Inducir la transcripción de ambos plásmidos, durante 2-4 horas de cultivo continuado. Realizar ziptipping como en el ejemplo 1 y analizar por MALDI-TOFMS (modo lineal).

30

Resultado

35 Se observa un pico por espectroscopia de masas correspondiente a la taquilepsina con serinas deshidratadas.

EJEMPLO 10

Producción por *Streptococcus salivarius* (procariota Gram positivo) de taquilepsina I [S3, S12] I (tabla1) con S3 y S12 deshidratadas con salivaricinaB sin formación enzimática posterior de anillo tioéter.

40

La taquilepsina tiene la siguiente secuencia [S3, S12]: KWSFRVCYRGISYRRCR

45 Materiales y métodos

Clonar una construcción líder-salivaricina (tabla 2) después de una fase de lectura abierta por taquilepsina mutante (tabla 1) y después de esto la *salivaricinBT*. Transformar este plásmido a una cepa de *Streptococcus salivarius* desprovista de genes de salivaricina. Inducir la transcripción, durante 2-4 horas de cultivo continuado. Realizar ziptipping como en el ejemplo 1 y analizar por MALDI- TOFMS (modo lineal).

50

Resultado

Se observa un pico por espectroscopia de masas correspondiente a la taquilepsina con serinas deshidratadas.

55 EJEMPLO 11

Producción por *Lactococcus lactis* (procariota Gram-positivo) mediante lacticinaT de vasonatrina (tabla 1) sin modificaciones.

60

La lacticina 481-T tiene actividad peptidasa líder y por lo tanto en este ejemplo particular en el sobrenadante del cultivo celular se encontró vasonaprina sin líder. La vasonaprina está, entre otras, implicada en la vasorelajación. Su secuencia es GLSKGCFGLKLDRI GMSMSGLGCNSFRY.

65 Materiales y métodos

Clonar una construcción lacticina 481-líder (tabla 2) después de una fase de lectura abierta por vasonatrina (tabla 1).

Clonar la *lacticina 481-T* en un segundo plásmido con un marcador antibiótico diferente. Transformar ambos plásmidos a una cepa de *L. lactis* desprovista de genes de *lacticina 481*. Inducir la transcripción de ambos plásmidos cultivando durante una noche en medio mínimo. Realizar ziptipping como en el ejemplo 1 y analizar por MALDI-TOFMS (modo lineal).

5 Resultado

Se observa un pico por espectrometría de masas correspondiente a la vasonatrina.

10 EJEMPLO 12

Producción por *Lactococcus lactis* (procariota Gram-positivo) mediante *lacticinaT* de vasonatrina (tabla 1), con anillos tioéter mediados con *lacticina M*.

15 La vasonatrina está, entre otras, implicada en la vasorelajación. Tiene una secuencia de aminoácidos, que sin mutaciones, permite la formación de dos anillos de lantionina. Su secuencia es: GLSKGCFGLKLDRIKMSGLGCNSFRY.

Pueden formarse anillos de lantionina a partir de S3-C6 y a partir de S16-C22.

20 Materiales y métodos

Clonar una construcción de *lacticina 481-líder* (tabla 2) seguido de vasonatrina (tabla 1) y secuencias codificantes de *lacticinaM*. Transformar el plásmido a *Lactococcus lactis* PA1001. Inducir la transcripción del plásmido cultivando durante una noche en medio mínimo. Realizar ziptipping como en el ejemplo 1 y analizar por MALDI-TOFMS (modo reflectron). Analizar muestras peroxidadas (en el caso de un puente tioéter uno o dos oxígenos añadidos; en el caso de cisteínas tres oxígenos añadidos) y no peroxidadas.

30 Resultado

Se observan picos por espectrometría de masas coherentes con el líder de *lacticinaM* acoplado a vasonatrina con dos anillos tioéter y dos serinas deshidratadas más.

35 EJEMPLO 13

Transporte mediante NisT del prepéptido de nisina fusionado en el extremo C con una variante de encefalina.

Este ejemplo muestra que NisT puede exportar el prepéptido de nisina no modificado con una ampliación C-terminal. Otros autores han descrito que los lantibióticos maduros pueden exportarse mediante LanBTC / TM con una ampliación C-terminal, pero todavía no se sabe que el prepéptido no modificado con una ampliación C-terminal también puede exportarse solo mediante el transportador LanT. Este ejemplo implica una cepa *Lactococcus lactis* que carece del grupo génico de nisina cromosómico completo, pero produce simultáneamente NisT codificado por plásmido y una fusión del prepéptido NisA y una variante de encefalina, YTGFC (la encefalina genéticamente fusionada al extremo C del prepéptido de nisina). Puede encontrarse un prepéptido de fusión no modificado en el sobrenadante de cultivo, lo que demuestra que NisT es suficiente para el transporte del prepéptido con ampliación C-terminal al exterior de la célula.

Materiales y métodos.

50 *Lactococcus lactis*, PA1001 (véase ejemplo 1), se transformó con pNGnisT, que se construyó como se describe en el ejemplo 1. pNGnisA-enkT y pNGnisA-enkS se construyeron de la siguiente manera. pNGnisA se sometió a PCR con el par de cebadores 5'-GCACGTGTTGCTTTGATTGATAGC-3' y 5'-CTGGATCCCTTAACAAAAACCTGTGTATTTGCT- TACGTGAATACTAC-3' (sitio *Bam*H1 subrayado), que conduce a la fusión C-terminal de la variante de encefalina YTGFC con nisina A (enkT). El producto de la PCR se ligó y se transformó a *Lactococcus lactis* PA1001 + pNGnisT. La cepa resultante, PA1001 + pNGnisT + pNZenkT se cultivó en medio MG17 a una DO600 = 0,4, se sedimentó y resuspendió en medio mínimo complementado con sobrenadante filtrado 1/1000 de *Lactococcus lactis* NZ9700 productora de nisina de tipo silvestre. Después de una incubación durante una noche las células se sedimentaron y el sobrenadante se sometió a ziptipping y a análisis MALDI TOF.

60 Resultado:

Figura 11. Se observan picos casi a 6400,05 (prepéptido de nisina sin metionina 1 con ampliación C-terminal con YTGFC) por maldi TOF. Por tanto, el transportador de nisina puede exportar el prepéptido de nisina genéticamente fusionado con una variante de encefalina. Por lo tanto se puede llegar a la conclusión de que los transportadores de lantibióticos también pueden usarse para el transporte de prepéptidos de lantibióticos no modificados que están ampliados en el extremo C mediante un péptido fusionado.

Tabla 1, (poli)péptidos seleccionados

Tabla 1: (poli)péptidos cuyo ADN codificante está precedido por ADN codificante del líder de lantibiótico en una fase de lectura abierta.

5 Posibilidades mutacionales que permiten la formación postraduccional de un anillo (o más) tioéter, proporcionadas, por ejemplo, por la vasopresina se aplican también a otras secuencias, incluyendo aquellas que ya tienen un anillo, con otros (poli)péptidos en la Tabla 1, teniendo en cuenta la descripción de la formación de anillo tioéter mencionada en el texto.

10 Tabla 1: (poli)péptidos cuyo ADN codificante está precedido por ADN codificante del líder de lantibiótico en una fase de lectura abierta. Posibilidades mutacionales que permiten la formación postraduccional de un anillo (o más) tioéter, proporcionadas, por ejemplo, por la vasopresina se aplican también a otras secuencias, incluyendo aquellas que ya tienen un anillo, con otros (poli)péptidos en la Tabla 1, teniendo en cuenta la descripción de la formación de anillo tioéter mencionada en el texto.

Tabla 1A:

Vasopresina: Función: como una hormona antidiurética:

- (A1, S2, R8)-secuencia: ASFQNCPRG; anillo de lantionina S2-C6
- (A1, S2, C3, R8)-secuencia: ASCQNCPRG; anillo de lantionina S2-C3
- (A1, S2, C4, R8)-secuencia: ASFCNCPRG ; anillo de lantionina S2-C4
- (A1, S2, C5, R8)-secuencia: ASFQCCPRG (SEC ID N°:); anillo de lantionina S2-C5
- (A1, S2, A6, C7, R8)-secuencia: ASFQNACRG; anillo de lantionina S2-C7
- (A1, S2, A6, C8)-secuencia: ASFQNAPCG; anillo de lantionina S2-C8
- (A1, S2, A6, R8, C9)-secuencia: ASFQNAPRC; anillo de lantionina S2-C9
- (A1, S3, R8)-secuencia: AYSQNCPRG; anillo de lantionina S3-C6
- (A1, S3, C4, R8)-secuencia: AYSCNCPRG ; anillo de lantionina S3-C4
- (A1, S3, C5, R8)-secuencia: AYSQCCPRG; anillo de lantionina S3-C5
- (A1, S3, A6, C7, R8)-secuencia: AYSQNACRG; anillo de lantionina S3-C7
- (A1, S3, A6, C8)-secuencia: AYSQNAPCG; anillo de lantionina S3-C8
- (A1, S3, A6, R8, C9)-secuencia: AYSQNAPRC; anillo de lantionina S3-C9
- (A1, S4, R8)-secuencia: AYFSNCPRG ; anillo de lantionina S4-C6
- (A1, S4, C5, R8)-secuencia: AYFSCCPRG ; anillo de lantionina S4-C5
- (A1, S4, A6, C7, R8)-secuencia: AYFSNACRG ; anillo de lantionina S4-C7
- (A1, S4, A6, C8)-secuencia: AYFSNAPCG ; anillo de lantionina S4-C8
- (A1, S4, A6, R8, C9)-secuencia: AYFSNAPRC ; anillo de lantionina S4-C9
- (A1, S5, R8)-secuencia: AYFQSCPRG ; anillo de lantionina S5-C6
- (A1, S5, A6, C7, R8)-secuencia: AYFQSACRG ; anillo de lantionina S5-C7
- (A1, S5, A6, C8)-secuencia: AYFQSAPCG ; anillo de lantionina S5-C8
- (A1, S5, A6, R8, C9)-secuencia: AYFQSAPRC ; anillo de lantionina S5-C9
- (A1, S6, C7, R8)-secuencia: AYFQNSCRG ; anillo de lantionina S6-C7
- (A1, S6, C8)-secuencia: AYFQNAPCG ; anillo de lantionina S6-C8
- (A1, S6, R8, C9)-secuencia: AYFQNAPRC ; anillo de lantionina S6-C9
- (A1, S7, C8)-secuencia: AYFQNCSCG ; anillo de lantionina S7-C8
- (A1, S7, R8, C9)-secuencia: AYFQNCSRC ; anillo de lantionina S7-C9
- (A1, S7, C9)-secuencia: AYFQNCPSG ; anillo de lantionina S8-C9.

Terlipresina (hormona antidiurética):

- 20 S4-secuencia: GGGSYFQNCPKG
Lantionina postraduccional: S4-C9.

Cispresina (hormona antidiurética):

- 25 S4-secuencia: GGGSYFNCPKG
Anillo de lantionina postraduccional: S4-C8.

El péptido hipotensivo adrenomedulina, puede funcionar como una hormona en el control de la circulación

A13,S16-secuencia:
YRQSMNNFQGLRAFGSRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDN VAPRSKISPQGY
Lantionina postraduccion: S16-C21.

5 Allostatina I (inhibidor neuropeptídico de la síntesis de la hormona juvenil)

C6-secuencia: APSGACRLYGFL
Lantionina postraduccion: S3-C6.

10 Angiotensina I

S7, C10-secuencia: DRVYIHSFHC
Lantionina postraduccion S7-C10

15 Función: en respuesta a una presión reducida, la enzima renina escinde la angiotensina I, a partir de angiotensinógeno, después elimina un dipéptido para producir la angiotensina II fisiológicamente activa, la sustancia con actividad presora más fuerte conocida, que ayuda a regular el volumen y el equilibrio mineral de los fluidos corporales.

Antopleurina-A (neuropéptido)

20

A4-secuencia: GVSALCDSGDPSVRGNTLSGTLTLYPSGCPSGWHNCKAHGPTI G WCKKQ
Anillos de lantionina postraduccion: S3-C6, S27-C31, S33-C38, T44-C48.

Péptido 1 antiinflamatorio (antiinflamación)

25

S1, C6-secuencia: SQMKKCLDS
Lantionina postraduccion: S1-C6

Dermaseptina (péptido antimicrobiano)

30

C10-secuencia:
ALWKTMLKKCGTMALHAGKAALGAAADTISQGTQ
Lantionina postraduccion: T5-C10.

35 Péptido similar a bombinina (péptido antimicrobiano)

C8-secuencia: GIGASILCAGKSALKGLAKGLAEHFAN
Lantionina postraduccion: S5-C8.

40 Histatina-5 (péptido salival antimicrobiano)

S4, C7-secuencia: DSHSKRCHGYKRKFHDKHSHRGY
Lantionina postraduccion: S4-C7.

45 Indolicidina (péptido antimicrobiano)

S2, C5-secuencia: ISPWCWPWWPWR
Lantionina postraduccion: S2-C5.

50 Magainina-1 (péptido antimicrobiano)

C13-secuencia: GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS
Lantionina postraduccion: S8-C13.

55 Factor Natriurético Auricular (fuerte sustancia vasoactiva con una función clave en homeostasis cardiovascular y actividad estimuladora del GMPc).

Secuencia: SLRRSSCFGGRMDRIGAQSGLGCNSFRY
Lantioninas postraduccionales: S1-C7, S19-C23.

60

Bradiquinina (función importante en fisiología renal y conductual).

C9-secuencia: RPPGFSPFC
Lantionina postraduccion: S6-C9.

65

ES 2 444 840 T3

Péptido Natriurético Cerebral (actúa como una hormona cardiaca implicada en la natriuresis, diuresis, vasorelajación, inhibición de renina y secreción de aldosterona, mejora la función cardiaca)

5 S16,C19-secuencia: SPKMQGSGCFGRKMSRICSSSGLGCKVLRH
Lantionina postraduccional: S8-C10, S16-C19

Péptido Natriurético de tipo C (presenta actividad natriurética y vasodepresora)

10 Secuencia: DLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLK LDRIG SMSGLG
Anillo de lantionina postraduccional: S34-C37, S47-C53.

Péptido de vasonatrina (vasorelajación)

15 Secuencia: GLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGCNSFRY
Anillo de lantionina postraduccional: S3-C6, S17-C22.

Péptido inductor del sueño delta (inducción del sueño delta)

20 S2, C6-secuencia: WSGGNCSGE
Anillo de lantionina postraduccional: S2-C6.

Alfa-dendrotoxina

25 S11,S26-secuencia: PRRKLCILHRSPGRGYDKIPAFYNSKKKQCERFDWSGC GGNSNRFKTIEECRRTCIG
Lantionina postraduccional: S11-C15, S26-C31
Función: afecta a los canales de potasio.

Eleidoisina

30 C4-secuencia: PSKCAFIGLM
Anillo de lantionina postraduccional: S2-C4
Función: excitación neuronal, causante de respuestas conductuales, vasodilatadoras, secretagogas, causante de la contracción de músculos lisos.

35 Equistatina:

40 Secuencia: ECESGPCCRNCKFLKEGTICKRARGDDMDDYCNGKTCDCPRNPHK GPAT
Anillos de lantionina postraduccional: S4-C7, T18-C20, T36-C37
Función: inhibidor de agregación plaquetaria dependiente de fibrinógeno.

Alfa-endorfina

45 S2,C6-secuencia: YSGFMCSEKSQTPLVT
Anillo de lantionina postraduccional: S2-C6
Función: opioide.

beta-endorfina

50 S21,C26-secuencia: YGGFMTSEKSQTPLVTLFKNSILKNCYKKGE
Anillo de lantionina postraduccional: S21-C26
Función: opioide.

Defensina I

55 S2,S12-secuencia: ASYCRIPACIAGSRRYGTCTYQGRLWAFCC
Anillos de lantionina postraduccional: S2-C4, S13-C19
Función: péptido antimicrobiano

Secretina

60 S23,C26-secuencia: HSDGTFTSELSRLREFARLQRLSQGCV
Anillo de lantionina postraduccional: S23-C26
Función: regulación del pH en el estómago.

65 Urocortina

ES 2 444 840 T3

C19-secuencia: DNPSLSIDLTFHLLRLLCLARTQSQRERAEQNRIFDSV
Anillo de lantionina postraduccion: T16-C19
Función: estimula la secreción de ACTH.

5 Urotensina II

S5-secuencia: AGTASCFWKYCV
Anillo de lantionina postraduccion: T3-C6, S5-C11
Función: osmoregulación y factor de liberación de corticotropina.

10

Péptido A cardioactivo pequeño

S4,C7-secuencia: ARPSYLCFPRM
Anillo de lantionina postraduccion:
15 S4-C7 Función: inhibe la liberación de acetilcolina

Péptido B cardioactivo pequeño

20

S4,C7-secuencia: MNYSAFCRM
Lantionina postraduccion: S4-C7
Función: estimula la contracción en el intestino, aumenta la amplitud del latido cardíaco.

Ceratotoxina A

25

C9-secuencia: SIGSALKKCLPVAKKIGKIALPIAKAALP
Lantionina postraduccion: S4-C9
Función: antimicrobiana, péptido hemolítico con actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, estable a 100 grados centígrados.

30 Cerebelina

35

C7-secuencia: SGSAKVCFSAIRSTNH
Lantionina postraduccion: S3-C7
Función: neuromodulación, estimulación de liberación de norepinefrina, potencia indirectamente la secreción adrenocortical

Caribdotoxina

40

S33-secuencia: FTNVSCCTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKSRCYS
(metil)lantionina postraduccion: T3-C7, T8-C13, S15-C17, T23-C28, S33-C35
Función: inhibidor de canales de calcio y potasio activados por voltaje

Colecistoquinina

45

C8-secuencia: KAPSGRMCIVKNQQLDPSHRISDRYMGWMDF
Lantionina postraduccion: S4-C8
Función: contracción de la vesícula biliar y liberación de enzimas pancreáticas en el intestino.

Conopresina G

50

S1-secuencia: SFIRNCPKG
Lantionina postraduccion: S1-C6
Función: control conductual.

55 Alfa-conotoxina E1

60

S2,S5-secuencia: RSHCSYHPTCNMSNPQIC
Lantionina postraduccion: S2-C4, S5-C10, S13-C18
Función: bloqueante de receptores nicotínicos de acetilcolina.

Corazonina

65

C9-secuencia: TFQYSRGWCN
Lantionina postraduccion: S5-C9
Función: regulación del latido cardíaco.

Leu-encefalina

- 5 S2,C3-secuencia: YSCFL
Anillo de lantionina postraducciona: S2-C3
Función: opioide.

Met-encefalina

- 10 S2,C3-secuencia: YSCFM
Anillo de lantionina postraducciona: S2-C3
Función: opioide.

Oxitocina

- 15 (SI)-secuencia: SYIQNCPLG
Anillo de lantionina postraducciona S1-C6
Función: la oxitocina estimula la contracción uterina y la lactancia: aumenta la secreción de Na⁺; estimula la GTPasa miometrial y fosfolipasa C.

20 Exendina-3

- C35-secuencia: HSDGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGCPPPS
Anillo de lantionina postraducciona: S32-C35
Función: similar a la secretina.

25 Péptido encefalitogénico alérgico experimental

- C5-secuencia: FSWGCEGQR
Anillo de lantionina postraducciona: S2-C5
Función: estabilización de la membrana de mielina

Péptido complementario de la encefalomiélitis autoinmunitaria experimental

- 35 S4,C7-secuencia: VFISGPCRLLG
Anillo de lantionina postraducciona: S4-C7
Efecto: tiene una función en la encefalomiélitis autoinmunitaria.

Gonadoliberina II

- 40 (C9)-secuencia: QHWSHGWYCG
Anillo de lantionina postraducciona: S4-C9
Función: estimula la secreción de gonadotropinas; estimula la secreción de hormonas estimulantes de folículos y luteinizantes.

45 Ácido tocinoico / ácido presinoico

- (S1,I3)-secuencia: SYIQNC
Anillo de lantionina postraducciona S1-C6
Función: el ácido tocinoico es un inhibidor de oxitocina, que induce el comportamiento materno.

50 Leuprolida

- 55 Secuencias: XHWSYGCRPX
Anillo de tioéter postraducciona: S4-C7
XHWSYXCRX
Anillo de tioéter postraducciona: S4-C7
Función: agonista de LHRH.

60 Calcitonina

- 65 Número de acceso: P01258
(SI)-secuencia: SGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP
Anillo de tioéter postraducciona S1-C7
Función: incorporación de CaPi en huesos.

ACTH, hormona adrenocorticotrópica

(Q5,C6)-secuencia:
 SYSMQCFRWGKPVGKKRRPVKVYPNGAEDESAAEAFPLEF
 5 Anillo de lantionina postraducciona S1-C6

Secuencia del fragmento ACTH

10 SYSMECFRWG
 Anillo postraducciona: S2-C6
 Función: la ACTH estimula la síntesis y secreción de glucocorticoides por la corteza adrenal.

Fragmento del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B

15 C6-secuencia: MGTNLCVPNPLGFFPDHQLDP
 Modificación postraducciona: anillo de lantionina T3-C6
 Función: antígeno de superficie

Péptido inhibidor de conicotropina

20 S4,C8-secuencia: FRWSKPVCKKRRPVKVYPNGAEDSAEAFPLE
 Lantionina postraducciona: S4-C8
 Función: inhibición de ACTH.

25 Factor liberador de corticotropina

S30,C33-Sec: SEEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQAHCNRKLMEII
 Lantionina postraducciona: S30-C33
 Función: liberación de corticotropina.

30 Somatostatina

(S3)-secuencia: AGSKNFFWKTFTSC
 Anillo de lantionina postraducciona S3-C14
 35 Función: factor de inhibición de la liberación de somatotropina, factor de inhibición de la liberación de la hormona del crecimiento.

Polipéptido pancreático humano

40 (S18, C21)-secuencia: APLEPVYPGDNATPEQMSQYCADLRRUINMLTRPRY,
 Anillo de lantionina postraducciona S18-C21
 Función: agonista en receptores del neuropéptido Y4

Péptido YY

45 (S22,C25,T29,C32)-secuencia: YPIKPEAPGEDASPEELNRYRYASLRHYLNLVTRQRY
 Anillos de (metil)lantionina postraducciona S22-C25, T29-C32
 Función: hormona intestinal que inhibe la secreción pancreática estimulada tanto por secretina como por colecistoquinina.

50 Glucagón

(C5,S24,C29)-secuencia: HSQGCFTSDYSKYLDSRRAQDFVSWLMNC
 Anillos de lantionina postraducciona S1-C5, S24-C29
 55 Función: restablecimiento del nivel de glucosa en sangre cuando es demasiado bajo.

alfa-neuroquinina

(C9)-secuencia: HKTDSFVGCM
 Anillo de lantionina postraducciona S5-C9
 60 Función: antagonista de taquiquinina.

LHRH1, hormona liberadora de hormona luteinizante

65 Función: regula la secreción de gonadotropinas, hormona luteinizante y esteroides sexuales.
 (Q1, C7)-secuencia: QHWSYGCRPG

Anillo de lantionina postraduccion S4-C7

(S1, C4)-Secuencia:	SHWCYGLRPG	anillo postraduccion: S1-C4
(S1, A4, C5)-Secuencia:	SHWACGLRPG	anillo postraduccion: S1-C5
(S1, A4, C6)-Secuencia:	SHWAYCLRPG	anillo postraduccion: S1-C6
(Q1, S2, A4, C5)-Secuencia:	QSWACGLRPG	anillo postraduccion: S2-C5
(Q1, S2, A4, C6)-secuencia:	QSWAYCLRPG	anillo postraduccion: S2-C6
(Q1, S2, A4, C7)-secuencia:	QSWAYGCRPG	anillo postraduccion: S2-C7
(Q1, S3, A4, C6)-secuencia:	QHSAYCLRPG	anillo postraduccion: S3-C6
(Q1, S3, A4, C7)-secuencia:	QHSAYGCRPG	anillo postraduccion: S3-C7
(Q1, S3, A4, C8)-secuencia:	QHSAYGLCPG	anillo postraduccion: S3-C8
(Q1, C8)-secuencia:	QHWSYGLCPG	anillo postraduccion: S4-C8
(Q1, C9)-secuencia:	QHWSYGLRCG	anillo postraduccion: S4-C9
(Q1, A4, S5, C8)-secuencia:	QHWASGLCPG	anillo postraduccion: S5-C8
(Q1, A4, S5, C9)-secuencia:	QHWASGLRCG	anillo postraduccion: S5-C9
(Q1, A4, S5, C10)-secuencia:	QHWASGLRPC	anillo postraduccion: S5-C10
(Q1, A4, S6, C9)-secuencia:	QHWAYSLRCG	anillo postraduccion: S6-C9
(Q1, A4, S6, C10)-secuencia:	QHWAYSLRPC	anillo postraduccion: S6-C10
(Q1, A4, S7, C10)-secuencia:	QHWAYGSRPC	anillo postraduccion: S7-C10.

LHRH2, fragmento de la hormona liberadora de hormona luteinizante

5

Función: regula la secreción de gonadotropinas, hormona luteinizante y esteroides sexuales.

(Q1, C7)-secuencia: QHWSHGCPG

Anillo de lantionina postraduccion S4-C7

10

(S1, C4)-secuencia:	SHWCHGWYPG	anillo postraduccion: S1-C4
(S1, A4, C5)-secuencia:	SHWACGWYPG	anillo postraduccion: S1-C5
(S1, A4, C6)-secuencia:	SHWAHCWYPG	anillo postraduccion: S1-C6
(Q1, S2, A4, C5)-Secuencia:	QSWACGWYPG	anillo postraduccion: S2-C5
(Q1, S2, A4, C6)-secuencia:	QSWAHCWYPG	anillo postraduccion: S2-C6
(Q1, S2, A4, C7)-secuencia:	QSWAHGCYPG	anillo postraduccion: S2-C7
(Q1, S3, A4, C6)-secuencia:	QHSAHCWYPG	anillo postraduccion: S3-C6
(Q1, S3, A4, C7)-secuencia:	QHSAHGCYPG	anillo postraduccion: S3-C7
(Q1, S3, A4, C8)-secuencia:	QHSAHWCPG	anillo postraduccion: S3-C8
(Q1, C8)-secuencia:	QHWSHWGCPG	anillo postraduccion: S4-C8
(Q1, C9)-secuencia:	QHWSHWGYCG	anillo postraduccion: S4-C9
(Q1, A4, S5, C8)-secuencia:	QHWASGWCPG	anillo postraduccion: S5-C8
(Q1, A4, S5, C9)-secuencia:	QHWASGWYCG	anillo postraduccion: S5-C9
(Q1, A4, S5, C10)-secuencia:	QHWASGWYPC	anillo postraduccion: S5-C10
(Q1, A4, S6, C9)-secuencia:	QHWAHSWYCG	anillo postraduccion: S6-C9
(Q1, A4, S6, C10)-secuencia:	QHWAHSWYPC	anillo postraduccion: S6-C10
(Q1, A4, S7, C10)-secuencia:	QHWAHGSYPC	anillo postraduccion: S7-C10.

Factor ácido del crecimiento de fibroblastos derivado de cerebro (102-111)

15

(S103,C109)-secuencia: HSQKHWFCGL

Anillo de lantionina postraduccion S103-C109

Función: factor de crecimiento.

Factor básico del crecimiento de fibroblastos derivado de cerebro (1-24)

20

Secuencia: PALPEDGGSGAFPPCHFDPKRLY

Anillo de lantionina postraduccion S11-C17

Función: factor de crecimiento.

Insulina

Secuencias:

Cadena alfa: GIVEQCCASVCSLYQLENYCN (SEC ID N°:)

5 (S9-C14, T27-C30)-cadena beta: FVNQHLCGSHLVECLYLVCGERGFFYTPKC (SEC ID N°:)

Anillos de (metil)lantionina postraduccionales S9-C14, T27-C30

Enlaces disulfuro: alfa 6 - 11 alfa 7 - beta 7, alfa 20 - beta 19

Función: tratamiento de la diabetes.

10 Paratormona:

(S36-C39, T79-C82)-secuencia:

SVSEIELMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFVSLGCPLAPRDAG

SERPRKKEDNVLVESHEKSLGEADKADVNVLTACSE

15 (SEC ID N°:)

Anillos de (metil) lantionina postraduccionales S36-C39, T79-C82

Función: modulación del contenido de calcio en suero que afecta a la fisiología mineral y ósea.

Péptido inhibidor de unión a fibrinógeno

20

S6,C9-secuencia: HHLGGSKQCGDV

Lantionina postraduccionales: S6-C9.

Péptido inhibidor del factor de crecimiento de fibroblastos

25

S1,C3-secuencia: SPCGHYKG

Anillo de lantionina postraduccionales: S1-C3

Efecto: inhibición del factor de crecimiento de fibroblastos.

30 Galanina

C10-secuencia: GWTLNSAGYCLGPHAVGNHRFSKNGLTS

Anillo de lantionina postraduccionales: S6-C10

35 Función: contrae la musculatura lisa del tracto gastrointestinal y genitourinario, regula la liberación de la hormona del crecimiento, modula la liberación de insulina.

Polipéptido inhibidor gástrico

S28,C31-secuencia: YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLSQKCKKNDWKHNITQ

40 Función: fuerte estimulación de secreción de insulina y relativamente mal inhibidor de secreción de ácido gástrico.

Gastrina-I grande

45 S8,C11-secuencia: LGPQGPPSLVCDPSKKQGPWLEEEEEAYGWMDF

Anillo de lantionina postraduccionales: S8-C11

Función: estimula la secreción gástrica de HCl, la secreción de enzimas pancreáticas, la contracción del músculo liso y aumenta la circulación sanguínea y la secreción de agua en el estómago e intestino.

50 Pentagastrina

S1,C4-secuencia: SWMCF

Anillo de lantionina postraduccionales: S1-C4

55 Péptido liberador de gastrina

S9,C12-secuencia: VPLPAGGGSVLCKMYPRGNHWAVGHLM

Anillo de lantionina postraduccionales: S9-C12

Función: liberación de gastrina.

60

Factor alfa de crecimiento transformante

Secuencia: VVSHFNDPDSHTQFCFHGTCTRFLVQEDKPACVCHSGYVGAR CEHA DLLA

Anillo de (metil)lantionina postraduccionales: S3-C8, T21-C22, S37-C44

65 Función: TGF alfa es un polipéptido mitogénico que puede unirse al receptor de egf y actúa sinérgicamente con TGF beta para promover la proliferación celular independiente de anclaje en agar blando.

Hormona de crecimiento humano

- 5 C7-secuencia: FPTIPLCRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYS
Anillo de metilantionina postraduccion: T3-C7
Función: hormona del crecimiento, estimula, entre otras, la síntesis de proteínas y captación de aminoácidos.

Factor liberador de la hormona del crecimiento

- 10 C22-secuencia: YADAIFTNSYRKVLGQLSARKCLQDIMSRQQGESNQERGARAR L
Anillo de lantionina postraduccion: S18-C22
Función: liberación de la hormona del crecimiento.

Guanilina

- 15 Secuencia: PGTCEICAYAACTGC
Anillo de lantionina postraduccion: T3-C4, T13-C15
Función: activador de la guanilato ciclasa.

Helospectina I

- 20 S15,C18-secuencia: HSDATFTA EYSKLLSKLCLQKYLE SILGSSTSPRPPSS
Anillo de lantionina postraduccion: S15-C18

Fragmento del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B

- 25 C6-Secuencia: MGTNLCVPNPLGFFPDHQLDP
Anillo de metilantionina postraduccion: T3-C6
Función: exendina-1: similar a secretina.

30 Molécula de adhesión intercelular

- 35 Secuencia: NAQTSVSPSKVILPRGGSVLVTC
Anillo de lantionina postraduccion: S18-C23
Función: anti-hiv.

Taquiplesina I

- 40 (S3,S12)-secuencia: KWSFRVCYRGISYRRCR
Anillos de lantionina postraduccion S3-C7, S12-C16
Función inhibidor de la fusión de células Hiv, péptido antitumoral, péptido antimicrobiano.

Fragmento peptídico antigénico del HIV (gp 120)

- 45 (S10,C14)-secuencia: CGKIEPLGVSPCKCKRRVQREKR
Anillo de lantionina postraduccion S10-C14.

Fragmento peptídico antigénico I de IHIV (gp 41)

- 50 (S2)-secuencia: GSSGKLICTTAVPWNAS
Lantionina postraduccion S2-C8.

Péptido antigénico 5 del HIV (gp41)

- 55 (S20)-secuencia: RVTAIEKYLQDQARLNSWGSFRQVCHTTVPWVNDS
Anillo de lantionina postraduccion S20-C26.

Inhibidores de proteasa del HIV

- 60 Secuencia: TVSFCF
Anillo de lantionina postraduccion T1-C5
Función: inhibidor de proteasa del HIV.

Análogo del factor de crecimiento I similar a insulina

- 65 S1,C4-secuencia: SYACPLKPAKSC

Anillos de lantionina postraduccionales: S1-C4, S11-C12.

IGF II 69-84:

- 5 (C7)-secuencia: DVSTPPCVLPDNFPRY (SEC ID N°:
Anillo de lantionina postraduccionales S3-C7.

Fragmento de interleucina 8:

- 10 (S6, C10)-secuencia: AVLPRSAKEC (SEC ID N°:
Anillo de lantionina postraduccionales S6-C10
Función: atracción de neutrófilos, basófilos y linfocitos T, pero no de monocitos. Está implicado en la activación de neutrófilos y se libera de diversos tipos de células en respuesta a inflamación.

- 15 Fragmento de interleucina-2 (60-70) (factor de crecimiento de linfocitos T)

Secuencia: LTFKFYMSKKC (SEC ID N°:
Anillo de lantionina postraduccionales S67-C70.

- 20 Leucoquinina I (péptido neuroactivo)

C8-secuencia: DPAFNSWC (SEC ID N°:
Anillo de lantionina postraduccionales: S6-C8.

- 25 Leucopiroquinina

C4-Secuencia: TSFCPRL (SEC ID N°:
Anillo de lantionina postraduccionales: T1-C4
Función: media la actividad contráctil muscular visceral

- 30 Mastoparín

S5,C8-secuencia: INLKSLACLAKKIL (SEC ID N°:
Anillo de lantionina postraduccionales: S5-C8
Función: toxina membrana activa del veneno de avispas.

- 35 Función: toxina membrana activa del veneno de avispas.

Hormona concentradora de melanina

- 40 S11-Secuencia: DFDMLRCMLGCVYRQWQV (SEC ID N°:
Anillo de lantionina postraduccionales: S11-C16
Función: posible neurotransmisor, implicado en la regulación del comportamiento dirigido

Melitina

- 45 C14-secuencia: GIGAVLKVLTGLPCLISWIKRKRQQ (SEC ID N°:
Anillo de lantionina postraduccionales: T10-C14
Función: péptido membrana activo del veneno de abeja.

Motilina

- 50 C9-secuencia: FVPIFTYGCLQRMQEKERNKGQ (SEC ID N°:
Anillo de lantionina postraduccionales: T6-C9
Función: regulación de motilidad gastrointestinal interdigestiva.

- 55 Neuropeptido Y

C26-secuencia: YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRCYINLITRNY (SEC ID N°:
Anillo de lantionina postraduccionales S22-C26
Función: control de alimentación y secreción de hormona liberadora de gonadotropina.

- 60 Osteocalcina

- 65 S4,C8-secuencia: YLYSWLGCPVPYDPDELADHIGFEAYRRFYGPV (SEC ID N°:
Anillo de lantionina postraduccionales: S4-C8
Función: constituye el 1-2 % de la proteína ósea total, se une fuertemente a apatito y calcio.

(N-acetil-)beta-endorfina 1-27

(C21)-secuencia: YGGFMTSEKSQTPLVTLFKNCIIKNAY (SEC ID N°:)

Metilantionina postraduccional T16-C21

5 Funciones: analgesia, cambios conductuales, liberación de hormona del crecimiento.

Péptido relacionado con el oncogén Ras

HU-ras^{ha}

10 (S2, C5)-secuencia: GSVGCGKS (SEC ID N°:)

Anillo de lantionina postraduccional S2-C5.

Péptido relacionado con el oncogén Ras

15 Hu-ras^{T24}

(S2, C5)-secuencia: GSVGCGKS (SEC ID N°:)

Anillo de lantionina postraduccional S2-C5.

Péptido relacionado con el oncogén Ras

20 Hu-(Hu-ras^{T24})-Lys

(S3, C6)-secuencia: YGSVGCGKSK (SEC ID N°:)

Anillo de lantionina postraduccional S3-C6.

25 Tabla 1B:

Albúmina

Número de acceso: P02768

30 Secuencia: DTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIA FSQYLQQCPF DEHVKLVNEL TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL
HTLFGDELCK VASLRETYGD MADCCEKQEP ERNECFLSHK DDSPDLPKPK PDPNTLCDEF KADEKKFWGK
YLYEARRHP YFYAPELLYY ANKYNGVFQE CCQAEDKGAC LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCASIQKFG ER-
ALKAWSVA RLSQKFKPAE FVEVTKLVTD LTKVHKECCH GDLLECADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE CCDK-
PLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCCK NYQEAKDAFL GSFLYEYSRR HPEYAVSVLL RLAK-
YEATL EECCAADDPH ACYSTVFDKL KHLVDEPQNL IKQNCQDFEK LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ
35 VSTPTLVEVS RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL NRLCVLHEKT PVSEKVTKCC TESLVNRRPC
FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP DTEKQIKKQT ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENFVAFVVK
CCAADDKEAC FAVEGPKLVV STQTALA

40 Enlaces disulfuro: 77-86; 99-115; 114-125; 148-193; 192-201; 224-270; 269-277; 289-303; 302-313; 340-385;
384-393; 416-462; 461-472; 485-501; 500-511; 538-583; 582-591 (los números corresponden a la proteína
precursora que contiene 24 aminoácidos más, en el extremo N)

Función: regulación de la presión osmótica coloidal del plasma sanguíneo, unión a moléculas de plasma
sanguíneo.

Alglucerasa

Número de acceso: P04062

45 Secuencia: A RPCIPKSFY SSVVCVCNAT YCDSFDPTF PALGTFSRYE STRSGRRMEL SMGPIQANHT GT-
GLLLTLQP EQKFQKVKGF GGAMTDAAAL NILALSPPAQ NLLLSYFSE EGIGYNIIRV PMASCDIFSIR TYTY-
ADTPDD FQLHNFSLPE EDTLKIPLI HRALQLAQRV VLLASPWTS PTWLKTNQAV NGKGLKGGP
GDIYHQT- WAR YFVKFLDAYA EHLQFVAVT AENEPSAGLL SGYPFQCLGF TPEHQDFIA RDLGPTLANS
THHNVRLLML DDQRLLLPHW AKVLTDPPEA AKYVHGIAPH WYLDLAPAK ATLGETHRLF PNTMLFASEA
50 CVGSKFWEQS VRLGSWDRGM QYSHSIITNL LYHVVGWTDW NLALNPEGGP NWVRNFVDSF IVDITKDTF
YKQPMFYHLG HF- SKFIPEGS QRVGLVASQK NDLDAVALMH PDGSAVVVVL NRSSKDVPLT IKDPAVGFL
TISPGYSIHT YLWHRQ

Función: glucosilceramidasa.

55 Alfa-galactosidasa

Número de acceso: P06280

60 Secuencia: LDNGLARTP TMGWLHWERF MCNLDQCQEEP DSCISEKLFM EMAELMVSEG WKDAGYEYLC IDD-
CWMAPQR DSEGRLQADP QRFPHGIRQL ANYVHSGKGLK LGIYADVGNK TCAGFPGSFG YYDIDAQTFA
DWGVDLLKFD GCYCDLENL ADGYKHMSLA LNRTGRSIVY SCEWPLYMWP FQKPNYTEIR QYCNHWRNFA
DIDDSWKSIIK SILDWTSFNQ ERIVDVAGPG GWNDPDMELVI GNFGLSWNQQ VTQMALWAIM AAPLFMSNDL
RHISPAKAL LQDKDVIIN QDPLGKQGYQ LRQGDNFVW ERPLSGLAWA VAMINRQEIG GPRSYTIAVA
SLG- KGVACNP ACFITQLLPV KRKLGFIYEWTSRLRSHINPT GTVLLQLENT MQMSLKDLL

Función: galactosidasa.

Alteplasa

65 Número de acceso: P00750

Secuencia: SYQVI CRDEKTQMIY QHQSWLRPV LRSNRVEYCW CNSGRAQCHS VPKSCSEPR CFNGGTC-

5 QQA LYFSDFVCQC PEGFAGKCCE IDTRATCYED QGISYRGTWS TAESGAECTN WNSSALAQKP YSGRRP-
DAIR LGLGNHNYCR NPDRDSKPWC YVFKAGKYSS EFCSTPACSE GNSDCYFGNG SAYRGTHSLT ESGAS-
CLPWN SMILIGKYYT AQNPSAALG LGKHNCRNP DGDAPWCHV LKNRRLTWEY CDVPCSTCG LR-
QYSQPQFR IKGGLFADIA SHPWQAAIFA KHRRSPGERF LCGGILISSC WILSAAHCFQ ERFPFHHTV IL-
GRTYRVVP GEEEQKFEVE KYIVHKEFDD DTYDNDIALL QLKSDSSRCA QESSVVRTVC LPPADLQLPD WTE-
CELSGYG KHEALSPFYS ERLKEAHVRL YPSSRCTSQH LLNRTVTDNM LCAGDTRSGG PQANLHDACQ GDS-
GGPLVCL NDGRMTLVGI ISWGLGCGQK DVPGVYTKVT NYLDWIRDNM RP

10 Disulfuro: 41-71; 69-78; 86- 97; 91-108;110-119; 127-208; 148 -190;. 179-203; 215-296;236-278; 267-291; 299-
430; 342-358; 350-419; 444-519; 476-492;509-537 (contado con 35 aa adicionales en el extremo NI)
Función: escinde el plasminógeno para formar plasmina

15 Antitrombina III
Número de acceso: P01008
Secuencia: HGSPVDIC TAKPRDIPMN PMCIYRSPEK KATEDEGSEQ KIPEATNRRV WELSKANSRF
ATTFYQH- LAD SKNDNDNIFL SPLSISTWA MTKLGACNDT LQQLMEVFKF DTISEKTSQD IHFFFAKLNC
RLYRKANKSS KLVSANRLFG DKSLTFNETY QDISELVYGA KLQPLDFKEN AEQSRRAINK WWSNKTEGRI
TDVIPSEAIN ELTV- LVLVNT IYFKGLWWSK FSPENRTEL FYKADGESCS ASMMYQEGKF RYRVAEGTQ
20 VLELPGKGGD ITMV- LILPKP EKSLAKVEKE LTPEVLQEWL DELEEMMLVV HMPRFRIEDG FSLKEQLQDM
GLVDLFSPEK SKLPGI- VAEG RDDLYVSDAF HKAFLEVNEE GSEAAASTAV VIAGRSLNPN RVTFKANRPF
LVFIREVPLN TIIFMGRVAN PCVK

Disulfuro: 40-160;53-127; 279-462 (contado con 32 aa de secuencia señal)
Función: inhibición de la coagulación.

25 Aprotinina
Número de acceso: P00974
Secuencia: RPDFC LEPPYTGPCK ARIIRYFYNA KAGLCQTFVY GGCRAKRNNF KSAEDCMRTC GGA
Disulfuro: 40-90; 49-73; 65-86 (contando con 35 aa en el extremo N)
Función: Inhibe tripsina, kalikreína, quimotripsina y plasmina.

30 Asparaginasa
Número de acceso: P20933
Secuencia:
Cadena alfa: SPLPLV VNTWPFKNAT EAAWRALASG GSALDAVESG CAMCEREQCD GSVGFGGSPD ELGET-
TLDAM IMDGTTMDVG AVGDLRRIKN AIGVARKVLE HTHTLLVGE SATTFQAQSMG FINEDLSTSA SQALHSD-
WLA RNCQPNYWRN VIPDPSKYCG PYKPPGILKQ DIPIHKETED DRGHD

35 Cadena beta: TIGMV VIHKTGHIAA GTSTNGIKFK IHGRVGDSP I PGAGAYADDT AGAAAATGNG DILMRFLPSY
QAVEYMRRGE DPTIACQKVI SRIQKHPEF FGAVICANVT GSYGAACNKL STFTQFSFMV YNSEKNQPT
EKVDCI
Disulfuro: 64-69; 163-179; 286-306; 317-345 (contando con 23 aa extras en el extremo NI)
Función: escisión de glucoproteínas.

40 Becaplermina
Número de acceso: P01127
Secuencia: SLGSLTIAE PAMIAECKTR TEVFEISRRL IDRTNANFLV WPPCVEVQRC SGCCNRRNVQ CRP-
TQVQLRP VQVRKIEIVR KKPFIKATV TLEDHLACKC ETVAARPVT RSPGGSQEQR AKTPQTRVTI RTVRVR-
RPPK GKHRKFKHHT DKTALKETLG

45 Disulfuro: 97-141; 130-178; 134-180; 124-124 INTERCADENA; 133-133 INTERCADENA. (contando con 81 aa
en el extremo N)
Función: factor de crecimiento de plaquetas.

50 Proteína morfogénica ósea 7
Número de acceso: P34819
Secuencia: GKHNSAPMFM LDLYNAMAVE EGGGPAGQGF SYPYKAVFST QGPPLASLQD SHFLTADAMV MS-
FVNLVEHD KEFFHPRYHH REFREFDLSKI PEGEAVTAAE FRIYKDYIRE RFDNETFRIS VYQVLQEHLG RES-
DLFLLDS RTLWASEEGW LVFDITATSN HWVVNPRHNL GLQLCVETLD GQSINPK

55 Función: induce la formación ósea, implicada en la regulación de Ca
Catalasa
Número de acceso: P04040

60 Secuencia: ADSRDPASDQ MQHWKEQRAA QKADVLTGGA GNPVGDKLN VITVGPGRPLL VQDVVFTDEM AH-
FDRERIEPE RVVHAKGAGA FGYFEVTHDI TKYSKAKVFE HIGKKTPIAV RFSTVAGESG SADTVRDPRG FAVK-
FYTEDG NWDLVGNNTN IFFIRDPILF PSFIHSQKRN PQTHLKDPDM VVDFWLSRPE SLHQVSFLFS DRGIP-
DGHRH MNGYGSHTFK LVNANGEAVY CKFHKTQDQG IKNLSVEDAA RLSQEDPDYG IRDLFNAIAT
GKYPSTW- FYI QVMFTNQAET FPFNPFDLTK WPHKDYPLI PVGKLVNLRN PVNYFAEVEQ IAFDPSNMPP
GIEASPDKML QGRLFAYPDT HRHRLGPNYL HIPVNCYPYRA RVANYQRDGP MCMQDNQGGGA PNYYPNSFGA
PEQQPSALEH SIQYSGEVRR FNTANDDNVT QVRAFVYVNL NEEQRKRLCE NL4GHLKDAQ IFIQKAVKN
FTEVHPDYGS HIQALLDKYN AEKPKNAIHT FVQSGSHLAA REKANL

Función: protección contra H₂O₂.

65 Cecropina B
Número de acceso: P01508

Secuencia: KWKV FKKIEKMGRN IRNGIVKAGP AIAVLGEAKA LG

Función: Antibacteriana.

Celulasa

Número de acceso: P23548

5 Secuencia: MKKKGLKKT FVIASLVMGF TLYGYTPVSA DAASVKGYH TQGNKIVDES GKEAAFNGLN WF-
GLETPNYT LHGLWSRSM DMLDQVKKEG YNLIRLPYSN QLFDSRRPD SIDYHKNPDL VGLNPIQIMD KLIK-
AGQRG IQIILDRHRP GSGGQSELWY TSQYPESRWI SDWKMLADRY KNNPTVIGAD LHNEPHGQAS WGT-
GNASTDW RLAAQRAGNA ILSVNPWLI LVEGVDHNVQ GNNSQYWWGG NLTVANYPV VLDVPNRVVY
10 SPH- DYGPGVS SQPWFNDPAF PSNLPAIWDQ TWGYISKQNI APVLVGEFEGG RNVDLSCPEG KWQNALVHYI
GANNLYFTYW SLNPNSGDTG GLLDDWTTW NRPKQDMLGR IMKPVVVAQ QAEEAAE

Función: hidrólisis de celulosa.

Alfa coriagonadotropina

Número de acceso: P01215

15 Secuencia: APDVQD CPECTLQENP FFSQPGAPIL QCMGCCFSRA YPTPLRSKKT MLVQKNVTSE STCCVAK-
SYN RVTVMGGFKV ENHTACHCST CYYHKS

Función: un heterodímero de una cadena alfa común y una cadena beta única confiere especificidad biológica a la tiotropina, lutropina, folitropina y gonadotropina.

Beta coriagonadotropina

Número de acceso: P01233

20 Secuencia: SKEPLRPRCR PINATLAVEK EGCPVCITVN TTICAGYCPT MTRVLQGVLP ALPQVVCNYR DVRFE-
SIRLP GCPRGVNPVV SYAVALSCQC ALCRRSTDC GPKDHPLTC DDPFRQDSSS SKAPPPSLPS
PSRLPGPSDT PILPQ

Disulfuro: 29-77; 43-92; 46-130; 54-108; 58-110; 113-120

Función: estimula la producción de esteroides.

25 Quimopapaína

Número de acceso: P14080

30 Secuencia: PQSID WRAKGAVTPV KNQGACGSCW AFSTIATVEG INKIVTGNLL ELSEQELVDC
DKHSYGCKGG YQTT-SLQYVA NNGVHTSKVY PYQAKQYKCR ATDKPGPKVK ITGYKRVPSN CETSFLGALA
NQPLSVLVEA GGKPFQ-LYKS GVFDGPCGTK LDHAVTAVGY GTS DGKNYII IKNSWGPNWG EKGYMRLKRO
SGNSQGTGCV YKSSYP-FKG FA

Disulfuro: 156-197; 190-229; 287-338 (contando con 134 aa en el extremo N)

Función: tior proteasa.

Quimotripsina

Número de acceso: P54414

35 Secuencia: MTTSAARKGL RTRGSACPRRA TRSASSISSR AQVIVAGPIT DKLAQRTVAH LLALAEDSDE
PINMLISSPG GH-VESGDMIH DVIKFIPTV RTIGLAWVAS AGALIFVGAD KENRYCLPNT RFLIHQPSVG
IGGTSTDDMI QAEQVRLMRD RLNQIFAAT GQPVERIEKD TQRDFWLNTQ EALDYGLLGK VIRSVDELK

Función: serina proteasa.

Endotelina grande

40 Secuencia: CSCSSLMDKECVYFCHLDIIWVNTPEHVVPYGLGSPRS

Función: las endotelinas son péptidos vasoconstrictores derivados de endotelio.

Toxina de Clostridium botulinum de tipo A

Número de acceso: Q45894

45 Secuencia de cadena ligera A: PFVNKQFNK DPVNGVDIAY IKIPNAGQMQ PVKAFKIHNK IWVIPERDTF
TNPEEGDL- NP PPEAKQVPVS YYDSTYLSTD NEKDNYLKGV TKLFEIYST DLGRMLLSI VRGIPFWGGS
TIDTELKVID TNC- INVIQPD GSYRSEELNL VIIGPSADII QFECKSFGHD VLNLTRNGYG STQYIRFSPD
FTFGFEESLE VDTNPLL- GAG KFATDPAVTL AHELIHAEHR LYGIANPNR VFKVNTNAYY EMSGLEVSFE
ELRTFGGHDA KFIDSLQENE FRLYYYNFKF DVASTLNKAK SIIGTTASLQ YMKNVFKKEY LLEDSTSGKF
50 SVDKLFKFDK YKMLTEI YTE DN- FVNFFKVI NRKTYLNFDF AVFRINIVPD ENYTIKDFGN LKGANLSTNF
NGQNTIENSR NFTRLKNFTG LFEFYKLL- CV RGIIPFKTKS LDEGYNK

Secuencia de cadena pesada A: ALN DLCIKVNNWD LFFSPSEDNF TNDLDKVEEI TADTNIEAAE ENISLDLIQQ
YYLT- FDFDNE PENISLENLS SDIIGQLEPM PNIERFPNGK KYELDKYTMF HYLRAQEFEH GDSRIILTNS
AEEALLKPNV AYTFSSKYV KKINKAVEAF MFLNWAEELV YDFTDETNEV TTMDKIADIT IVPYIGPAL
NIGNMLSKGE FVEAI- IFTGV VAMLEFIPEY ALPVFGTFAI VSYANKVLT VQTINNALS K RNEKWDEVYK
55 YTVTWNLAKV NTQIDLIREK MKKALENQAE ATKAIINYQY NQYTEEEKNN INFNIDDLSS KLNESINSAM
ININKFLDQC SVSYLMNSMI PYAVKRLKDF DASVRDVLK YIYDNRGTLV LQVDRKDEV NNTLSADIPF
QLSKYVDNKK LLSTFTEYIK NIVNT- SILS VYKDDLLDL SRYGAKINIG DRVYYSIDK NQIKLINLES
STIEVILKNA IVYNSMYENF STSFWIKIPK YF- SKINLNNE YTIINCIENN SGWKVSLNYG EIIWTLQDNK
QNIQRVVFYK SQMVNISDYI NRWIVTITN NRLTKSKIYI NGRLIDQKPI SNLGNIHASN KIMFKLDGCR
60 DPRRYIMIKY FNLFDKELNE KEIKDLYDSQ SNSGILKDFW GNYLQYDKPY YMLNLFDPNK YVDVNNIGIR
GYMYLKGPRG SVVTTNIYLN STLYEGTKFI IKKYASGNE NIVRNDRVY INVVVKNKEY RLATNASQAG
VEKILSALEI PDVGNLSQVV VMKSKDDQGI RNKCKMNLQD NNG- NDIGFIG FHLYDNIAKL VASNWYNRQV
GKASRTFGCS WEFIPVDDGW GESSL

Disulfuro: 429-453 INTERCADENA (POR SIMIMLITUD); 1234-1279

65 Función: bloqueante de la liberación de neurotransmisores por hidrólisis de snap25.

Toxina de Clostridium botulinum de tipo B

Número de acceso: P10844

Secuencia: PVTINNFNYN DPIDNNNIIM MEPPFARGTG RYYKAFKID RIWIIPERYT FGYKPEDFNK
 SSGIFNRD- VC EYYDPDYLNT NDKKNIFLQT MIKLFNRIKS KPLGEKLEEM IINGIPYLGD RRVPLEEFNT
 NIASVTVNKL ISNP- GEVERK KGIFANLIIF GPGPVLNENE TEDIGIQNHF ASREGFGGIM QMKFCPEYVS
 5 VFNNVQENKG ASIF- NRRGYF SDPALILMHE LIHVLHGLYG IKVDDLPIVP NEKKFFMQST DAIQAEELYT
 FGGQDPSIIT PSTDKSIYDK VLQNFGRIVD RLNKVLVCIS DPNININIYK NKFKDKYKQV EDSEKYSID
 VESFDKLYKS LMFQFTETNI AENYKIK- TRA SYFSDSLPPV KIKNLLDNEI YTIEEGFNIS DKDMEKEYRG
 QNKAINQAY EESKEHLAV YKIQMCKSVK APGICIDVDN EDLFFIADKN SFSDDLKNE RIEYNTQSNY
 IENDFPINEL ILDTDLISKI ELPSENTESL TDFN- VDVPVY EKQPAIKKIF TDENTIFQYL YSQTFFPLDIR
 10 DISLTSSFDD ALLFSNKVYS FFSMDYIKTA NKVVEAGLFA GWVKQIVNDF VIEANKSNTM DKIADISLIV
 PYIGLALNVG NETAKGNFEN AFEIAGASIL LEFPELLIP VVGAFILLE- SY IDNKNKIKT IDNALTKRNE
 KWSDMYGLIV AQWLSTVNTQ FYTIKEGMYK ALNYQAQALE EIIKYRYNIY SEKEKSNIINI DFNDINSKLN
 EGINQAIDNI NNFINGCSVS YLMKKMIPLA VEKLLDFDNT LKKNLLNYID ENKLYLIG- SA EYEKSKVNYK
 LKTIMPFDLS IYTFNDILIE MFNKYNSEIL NNIILNLYK DNLLIDLSGY GAKVEYVDGV ELND- KNQFKL
 15 TSSANSKIRV TQNQNIIFNS VFLDFSVSWF IRIPKYKNDG IQNYIHNEYT IINCMKNNSG WKISIRGNRI
 IWTLIDINGK TKSVEFEYNI REDISEYINR WFFVTITNNL NNAKIYINGK LESNTDIKDI REVIANGEII
 FKLDGIDIRT QFIWMKYFSI FNTELSQSN EERYKIQSYS EYLKDFWGNP LMYNKEYYMF NAGNKNSYIK
 LKKDSPVGEI LTRSKYNQNS KYINYRDLIY GEKFIIRRS NSQSINDDIV RKEDIYLDY FNLNQEWRYV
 TYKYFKKEE KLFLA- PISDS DEFYNTIQIK EYDEQPTYSC QLLFKKDEES TDEIGLIGIH RFYESGIVFE
 20 EYKDYFCISK WYLKEVVRKP YNLKLGCNWQ FIPKDEGWTE

Disulfuro: 436-445 INTERCADENA (PROBABLE).

Función: endopeptidasa que escinde la sinaptobrevina-2 y por tanto bloquea la neurotransmisión.

Colágeno

Número de acceso: P30754

Secuencia: YRAGPRYIQA QVGPPIPRGP PGPPGSPGQQ GYQQLRGEPG DSGPMGPIGK RGPPGPAGIA
 GKS- GDDGRDG EPGPRGGIGP MGPRGAGGMP GMPGPXGHRG FRGLSGSXGE QGKSGNQGP
 GPGPAGPSG PIGPRGQTGE RGRDGKSLP GLRGVDGLAG PPGPPPIGS TGSPGFPGTP
 GSKGDRGQSG LXGAQQLQGP VGLSGQPVA GENGHPMPG MDGANGEPGA SGESGLPGPS
 GFPGPRGMPG TAGSPGQAGA XGDGGPT- GEQ GRPGAPGVXG SSGPPGDVGA PGHAGEAGKR
 30 GSPGSPGAG SPGPQDRGL PGSRGLPGMT GAS- GAMGIPG EKGPSGEPGA KGPTGDTGRQ
 GNQGTPIAG LPGNPGSDGR PGKDGRPGIR GKDGKQGEQG PQQPQGLAGL QGRAGPPGAR
 GEPGKNGAPG EPGAHEQGD AGKDGETGAA GPPGAAGPTG ARGPPG- PRGQ QGFQGLAGAQ
 GTPGEAGKTG ERGAVGATGP SGPAGPGER GAPGDRGNVG PRGMPPERGA TGPAGPTGSP
 GVAGAKQGG PPGPAGLVGL PGERGPKGVG GSXGSRGDIG PRGKAGERGK DGERGER- GEN
 35 GLPGPSGLAA SXGERGDMGS PGERGSPGA GERGAGSQG IQGQPPGD AGPAGTXGDI GF-
 PGERGTRG ATGKQARGP RGLAGKRLR GAGSRGETG AQGEIPLGS PGQPPLPGPS QKPGPSGAG
 TAGKQGVXGA RGSPGLVGKQ GDRGSDGEPG RDGTXGERGE DGPPGVSGPT GAPGQGERG MPGM-
 VGLRGE TGPMGGQGMX GDGGPPGSPG DRGERGNAGP QGPTGPSQA GAPGQEGAPG KDGLPGLAGR
 PGERGEPVA GRAGSGLAG LMGQRPLGA AGPPGDRGER GEPGQGVQ PVGAPGSQGP AGIMGMX-
 40 GEA GKGAXGDKG WTGLPGLQGL QGTPGHSGES GPPGAPGPRG ARGEAGGRGS QGPPGKDGQP GPS-
 GRVGPGRG PSGDDGRSGP PGPPGPPGPP GNSDYGA

Función: formación de fibrilla

Colagenasa

Número de acceso: P08897

Secuencia: IINGYEAYTG LFPYQAGLDI TLQDQRRWVC GGSLIDNKWI LTAACHVHDA VSVVVYLGSA
 VQYEGEAVVN SERIISHSMF NPDTYLNDVA LIKIPHVEYT DNIQPIRLPS GEELNNKFEN IWATVSGWQ
 SNT-
 DTVLQY TYNLVIDNDR CAQEYPPGII VESTICGDTG DGKSPCFGDS GGPFVLSKDN LLIGVVSFVS GAGCES-
 GKPV GFSRVTSYMD WIQNTGIIF

Disulfuro: 60-76; 181-196; 206-234

Función: Serina proteasa.

Corticotropina, ACTH

Número de acceso: P01189

Secuencia: WCLE SSQCQDLTTE SNLLECIRAC KPDLAETPM FPGNGDEQPL TENPRKYVMG
 HFRWDRFGRR NSSSSGSSGAGQKREDSAG EDCGPLPEGG PEPRSDGAKP GPREGKRSYS
 55 MEHFRWGKPV GKRRPVKVVY PNGAEDSAE AFPLEFKREL TGQRLREGDG PDGPADDGAG AQADLEHSL
 VAAEKKDEGP YRMEHFRWGS PPKDKRYGGF MTSEKSQTPL VTLFKNAIHK NAYKKGE

Disulfuro: 28-50 (contando con una señal de 26 aa)

Función: estimulación de melanocitos.

Domasa alfa

Número de acceso: P24855

LKIAAFNI QTFGETKMSN ATLVSYIVQI LSRDIALVQ EVRDSHLTAV GKLLDNLNQG APDTHYVVS EPLGRN-
 SYKE RYLFVYRPDQ VSAVDSYYD DGCEPCGNDT FNREPAIVRF FSRFTEVREF AIVPLHAAPG
 DAVAEIDALY DVYLDVQEKW GLEDVMLMGD FNAGCSYVRP SQWSSIRLWT SPTFQWLIPD SADTTATPTH
 CAYDRIVVAG MLLRGAVVPD SALPFNFQAA YGLSDQLAQA ISDHYPVEVM LK

Disulfuro: 123-126; 195-231 (contando con 21 aa extra en el extremo N)

Función: endonucleolítica, se une a G-actina.

Eptacog alfa (factor VII)

Número de acceso: P08709

Secuencia: NAFLEELRP GSLERECKEE QCSFEEAREI FKDAERTKLF WISYSDGDQC ASSPCQNGGS CK-DQLQSYIC FCLPAFEGRN CETHKDDQLI CVNENGGCEQ YCSDHTGTRK SCRCHEGYSL LADGVSCTPT
5 VEYPCGKIPI LEKRNASKPQ GRIVGGKVCP KGECPWQVLL LVNGAQLCGG TLINTIWWVS AAHCFDKIKN
WRN- LIAVLGE HDLSEHDGDE QSRRAQVII PSTYVPGTTN HDIALLRLHQ PVVLDHVVV LCLPERTFSE
RTLAFVRF- SL VSGWGQLLDR GATALELMVL NVPRLMTQDC LQQRKVGDS PNITEYMFC A GYSDGSKDSC
KGDSGG- PHAT HYRGTWYLTG IVSWGQGCAT VGHFGVYTRV SQYIEWLQKL MRSEPRPGVL LRAPFP

Disulfuro: 77-82; 110-121; 115-130; 132-141; 151-162; 158-172; 174-187; 195-322; 219-224; 238-254; 370-389;
10 400-428 (contando con 61 aa en el extremo N)

Función: coagulación.

Etanercept

Número de acceso: P20333

Secuencia: LPAQVAFT PYAPEPGSTC RLREYYDQTA QMCCSKCSPG QHAKVFCTKT SDTVCDSCED
15 STYTQL- WNWV PECLSCGSRG SSDQVETQAC TREQNRICTC RPGWYCALSK QEGCRLCAPL
RKCRPGFGVA RPTGET- SDVV CKPCAPGTFS NTTSSDICTR PHQICNVVAI PGNASRDAVC TSTSPTRMA
PGAVHLPQPV STR- SQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGSPSP AEGSTGDFAL PVGLIVGVTA LGLLIIGVVN
CVIMTQVKKK PLCLQREAKV PHLPADKARG TQGPEQQHLL ITAPSSSSSS LESSASALDR RAPTRNQPQA
20 PGVEASGAGE AR- ASTGSSDS SPGGHGTQVN VTCIVNVCS SDHSSQCSSQ ASSTMGDTDS
SPSEPKDEQ VPFSKEECAP RSQLETPETL LGSTEEKPLP LGVPDAGMKP S

Disulfuro: 40-53; 54-67; 57-75; 78-93; 96-110; 100-118; 120-126; 134-143; 137-161; 164 179 (contando con 22
aa extras en el extremo N)

Función: receptor del TNF-alfa.

Eritropoyetina

Número de acceso: P01588

Secuencia: APP RLICDSRVLE RYLLEAKEAE NITGCAEHC SLNENITVPD TKVNFYAWKR MEVGQQAQVEV
25 WQGLALLSEA VLRGQALLVN SSQPWEPLQL HVDKAVSGLR SLTLLRALG AQKEAISPPD AASAAPLRTI
TADT- FRKLFV VYSNFLRGKL KLYTGEACRT GDR

Disulfuro: 34-188; Disulfuro: 56-60 (contado con 27 aa en el extremo N)

Fragmento de eritropoyetina:

Secuencia:

YASHFGPLGWVCK

Anillo de lantionina postraduccion: S3-C12

Fragmento 2 de eritropoyetina:

Secuencia:

YASHFGPLTWVCK

Anillo de lantionina postraduccion: S3-C12

Función: eritropoyesis.

Exendina-4

Número de acceso: P26349

Secuencia: MPVESGL SSEDSASSES FASKIKRHGE GTFTSDLSKQ MEEEAVRLF I EWLKNGGPSS GAPPPSG
35 86 AMIDACIÓN (G-87 PROPORCIONA EL GRUPO AMIDA). (contando con 23 aa de señal en el extremo NI)

Función: similar a secretina

Factor VIII

Número de acceso: P00451

Secuencia: A TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL GELPVDARFP PRVPKSF PFN TSVVYKKT LF VEFTDHLFNI AK-
45 PRPPWMGL LGPTIQAEVY DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYW KASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
GSH- TYVWQVL KENGPMSDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE GSLAKEKTQT LHKFILLFAV
FDEG- KSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL

50 EGH- FLVRNH RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE EPQLRMKNNE
EAEDYD- DDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT WWHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY
LNNGPQRI- GR KYKKVRFMAY TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR YSSVFNMER DLASGLIGPL
LICYKESVDQ RGN-QIMSDKR NVILFSVFDE NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV
55 FDSLQLSVCL HEVAY- WYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEYEDTLTLF PFSGETVFMS MENPGLWILG
CHNSDFRNRG MTAL- LKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL SKNNAIEPRS FSQNSRHPST RQKQFNATTI
PENDIEKTD P WFAHRTMPK IQNVSSDLL MLLRQSPTPH GLSLSDLQEA KYETFSDPPS PQAIDNSNSL
SEMTHFRPQL HHSGDMVFTP ESGQLRLNE KLGTTAATEL KKLDFKVSST SNNLISTIPS DNLAAGTDNT
SSLGPPSMPV HYD- SQLD TTL FGKKSPLTE SGGPLSLSEE NNDSKLLESG LMNSQESSWG KNSVSTESGR

60 LFKGKRAHGP ALL- TKDNALF KVSISLLKTN KTSNNSATNR KTHIDGPSLL IENSPSWQN ILESDETFKK
VTPLIHDRML MDKNATAL- RL NHMSNKTSS KNMEMVQKK EGPIPPDAQN PDMSFFKMLF LPESARWIQR
THGKNSLNSG QGPSP- KQLVS LGPEKSV EQG NFLSEKNKVV VGKGEFTKDV GLKEMVFPSS RNLFLTNDN
LHENNTHNQE KKIQEE- IEKK ETLIQENVVL PQIHTVTGK NFMKNLFLS TRQNVEGSYD GAYAPVLQDF
RSLNDSTNR KKHAFHSKK GEEENLEGL NQTKQIVEKY ACTTRISPNT SQQNFRVTRS KRALQFRPL
65 LEETELEKRI IVDDTSTQWS KNM- KHLTPST LTQIDYNEKE KGAITQSPLS DCLTRSHSIP QANRSPLPIA
KVSSFPSIRP IYLTRVLFQD NSSHLPAASY RKKDSGVQES SHFLQGAKK NLSLAITLLE MTGDQREVGS

LGTSATNSVT YKKVENTVLP KPDLPKTSGK VELLPKVHIY QKDLFPTETS NGSPGHLDLV EGSLQGTGEG
 AIKWNEANRP GKVPFLRVAT ESSAKTPSKL LD- PLAWDNHY GTQIPKEEWK SQEKSPEKTA FKKKDTILSL
 NACESNHAIA AINEGQNKPE IEVTWAKQGR TERLC- SQNPP VLKRHQREIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE
 MKKEDFDIYD EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERL- WDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVQPK KVVVFQFTDG
 5 SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRN- QASR PYSFYSSLIS YEEDQRQGAE PRKNFVKPNE
 TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD CKAWAYFSDV DLEKD- VHSGL IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
 IFDETKSWYF TENMERNGRA PCNIQMEDPT FKENYRF- HAI NGYIMDTLPG LVMAQDQIR WYLLSMGSNE
 NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC
 QTPLGMASGH IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII HGIKTQGARQ
 10 KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD SS- GIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST
 LRMELMGCDL NSCSMPLGME SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSP- SKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
 VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL
 LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL Y

Disulfuro: 172-198; 547-573; 1851-1877; 2040-2188; 2193-2345 (contando con 19 aa extras en el extremo N)
 Función: coagulación.

Factor IX

Número de acceso: P00740 Secuencia:

Cadena ligera: NSG KLEEFVQGNL ERECMECKS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN
 PCLNGGSCDK DINSYECWCP FGFEGKNCEL DVTCNIKNGR CEQFCKNSAD NKVVCSTEG YRLAENQKSC
 20 EPAVPFPCGR VSVSQTSKLT R

Cadena pesada: AEAVFPDVD YVNSTEAETI LDNITQSTQS FNDFTRVVG EDAKPGQFPW QVVLNGKVDA
 FCGGSIVNEK WIVTAAHCVE TGVKITVAG EHNIEETEHT EQKRNIRII PHHNYNAAIN KYNHDIALLE
 LDEPLV- LNSY VTPICIADKE YTNIFLKFGS GYVSGWGRVF HKGRSALVLQ YLRVPLVDRA TCLRSTKFTI
 YNNMFCAGFH EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE GTSFLTGIIS WGEECAMKKGK YGIYTKVSRY VNWIKEKTKL T

Disulfuro: 64-69; 97-108; 102-117; 119-128; 134-145; 141-155; 157-170 (contado en el precursor)

Función: coagulación.

Factor X

Número de acceso: P00742

Secuencia:

Cadena ligera: ANSFLEEMKK GHLERECMEE TCSYEEAREV FEDSDKTNEF WNKYKGDGQC ETSPCQNQGG
 CK- DGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCs LDNGDCDQFC HEEQNSVVCs CARGYTLADN GKACIPTGPY
 30 PCG- KQTLER

Cadena pesada: R KRSVAQATSS SGEAPDSITW KPYDAADLDP TENPFDLLDF NQTQPERGDN NLTRIVGGQE
 CK- DGCEPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK
 HN- RFTKETYD FDI AVLRLKT PITFRMNVP ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRKML
 35 EVPY- VDRNSC KLSSFIITQ NMFCAGYDTK QEDACQGDG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG
 IYTKVTAFLK WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK

Disulfuro: 90-101; 95-110; 112-121; 129-140; 136-149; 151-164; 172-342; 241-246; 261 277; 390-404; 415-443 (contado con 40 aa de secuencia señal)

Función: coagulación, el factor Xa (parte de la cadena pesada del factor X) es una glucoproteína dependiente de vitamina K que convierte la protrombina en trombina en presencia de, entre otros, fosfolípido aniónico.

Factor XIII

Número de acceso: P00488

Secuencia: VN LQEFLNVTSTV HLFKERWDTN KVDHHTDKYE NNKLIVRRGQ SFYVQIDFSR PYDPRRDLFR VE-
 YVIGRYPQ ENKGTIYIPV IVSELQSGKW GAKIVMREDR SVRLSIQSSP KCIVGKFRMY VAVWTPYGVV
 45 RTSRN- PETDT YILFNPWCED DAVYLDNEKE REEYVLNDIG VIFYGEVNDI KTRSWSYGGQF EDGILDTCLY
 VMDRAQM- DLS GRGNPIKVS R VGSAMVNAKD DEGVLVGSWD NIYAYGVPPS AWTGSVDILL EYRSENPRV
 YGQCWVF- AGV FNTFLRCLGI PARIVTNYFS AHDNDANLQM DIFLEEDGNV NSKLTKDSVW NYHCWNEAWM
 50 TRP- DLPVGF GWAQVDSTPQ ENSDGMVRCG PASVQAIKHG HVCQFQDAPF VFAEVNSDLI YITAKKDGT
 VVEN- VDATHI GKLIVTKQIG GDGMMDITDT YKFQEQEEE RLALETALMY GAKKPLNTEG VMKSRNSVDM
 DFEVE- NAVLG KDFKLSITFR NNSHNRYTIT AYLSANITFY TGVPKAEFKK ETFDVTLEPL SFKKEAVLIQ
 AGEYMGQLE QASLHFFVTA RINETRDVLA KQKSTVLTIP EIIKVRGTQ VVGSMDMTVTV QFTNPLKETL
 55 RNVVVHLDGP GVTRP- MKKMF REIRPNSTVQ WEEVCRPWVS GHRKLIASMS SDSLRHVYGE LDVQIQRRPS
 M

Función: coagulación, estabiliza indirectamente cadenas de fibrina.

Fibronectina

Número de acceso: P02751

Secuencia: QAQQMVQPQ SPVAVSQSKP GCYDNGKHYQ INQQWERTYL GNALVCTCYG GSRGFNCESK PE-
 AEETCFDK YTGNTYRVGD TYERPKDSMI WDCTCIGAGR GRISCTIANR CHEGGQSYKI GDTWRRPHET
 60 GGYM- LECVCL GNGKGEWTCK PIAEKCFDHA AGTSYVVGET WEKPYQGWMM VDCTCLGEGS
 GRITCTSRNR CNDQDTRTSY RIGDTWSKGD NRGNLLQCIC TGNRGEWKC ERHTSVQTTs SGSGPFTDVR
 AAVYQPQPHP QPPPYGHCVT DSGVYSVGM QWLKTQGNKQ MLCTCLNGV SCQETAVTQT
 YGGNSNGEPC VLPFTYNGRT FYSCTEGRQ DGHLCWSTTS NYEQDQKYSF CTDHTVLVQT QGGNSGALC
 65 HFPFLYNNHN YTDCTSEGRR DNMKWCSTTQ NYDADQKFGF CPMAAHEEIC TTNEGVMYRI
 GDQWDKQHD M GHMMRCTCVG NRGGEWT- CIA YSQLRQDCIV DDITYNVNDT FHKRHEEGHM

LNCTCFGQGR GRWKCDPVDQ CQDSETGTFY QIGD- SWEKYV HGVRYQCYCY GRGIGEWHCQ
 PLQTYPSSSG PVEVFITETP SQPNSHPIQW NAPQPSHISK YILR- WRPKNS VGRWKEATIP GHLNSYTIKQ
 LKPGVVYEGQ LISIQQYGHQ EVTRFDFTTT STSTPVSNT VTGET- TPFSP LVATSESVTE ITASSFVSW
 VSASDTVSGF RVEYELSEEG DEPYLDLPS TATSVNIPDL LPGRKYIVNV YQISEDGEQS LILSTSQT
 5 PDAPPDPTVD QVDDTSIVVR WSRPQAPITG YRIVYSPSVE GSSTELNLP TANS- VTLSDL QPGVQYNITI
 YAVEENQUEST PVIQQUETT TPRS DTVSP RDLQFVEVD VKVTIMWTPP ESAVT- GYRVD VIPVNLPG
 GQRLPISRNT FAEVTGLSPG VTYFFKVFVAV SHGRESKPLT AQQTKLDAP TN- LQFVNETD STVLVRWTPP
 RAQITGYRLT VGLTRRGQPR QYNVGPSVSK YPLRNLQPAS EYTVSLVAIK GN- QESPKATG VFTTLQPGSS
 IPPYNTTEVTE TTIVITWTPA PRIGFKLGVR PSQGGEAPRE VTS DSGSIVV SGLT- PGVEYV YTIQVLRDGG
 10 ERDAPIVNVK VTPLSPPTNL HLEANPDTGV LTVSWERSTT PDITGYRITT TPTNGQQGNS LEEVVHADQS
 SCTFDNLSPG LEYVSVYTV KDDKESVPI S DTIIPAVPPP TDLRFTNIGP DTM- RVTWAPP PSIDLNTFLV
 RYSPVKNEED VAELSISPSD NAVVLNLLP GTEYVVS VSS VYEQHESTPL RGRQKT- GLDS PTGIDFSDIT
 ANSFTVHWIA PRATITGYRI RHHPEHFSGR PREDRVPHSR NSITLNLTP GTEYVVSIVA LNGREESPLL
 IGQLSTVSDV PRDLVVAAT PTSLLISWDA PAVTVRYRI TYGETGGNSP VQEFVPGSK STA- TISGLPK
 15 GVDYITVYA VTGRGDSPAS SKPISINYRT EIDKPSQMQV TDVQDNSISV KWLPS SSPVT GYRVT- TPKN
 GPGPTKTCTA GPDQTEMTIE GLQPTVEYV SVYAQNPSGE SQPLVQTAVT NIDRPKGLAF TDVDVDSIKI
 AWESPQQQVS RYRVTYSSPE DGIHELFPAP DGEEDTAE LQ GLRPGSEYTV SVVALHDDME SQPLIGTQST
 AI- PAPD LKF TQVTP TSLSA QWTPPNVQLT GYRVRVTPKE KTGMKEINL APDSSSVVVS GLMVATKYEV
 SVY- ALKDTLT SRPAQGVVTT LENVSPRRRA RVT DATETTI TISWRKTET ITGFQVDAVP
 20 ANGQTIQRTIKPDVRSY- TI TGLQPGTDYK ILYTLNDNA RSSPVVIDAS TAIDAPSNLR FLATTPNSLL
 VSWQPPRARI TGYIKEYEP GSP- PREVVR PRPGVTEATI TGLEPGTEYT IYVIALKNNQ KSEPLGRKK
 TDELPLVTL PHPNLHGPEI LDVP- STVQKT PFVTHPGYDT GNGIQLPGTS GQQPSVGGQM IFEHGFRT
 TPPTTATPIR HRPRPYPPNV GEEI- QIGHIP REDVDYHLYP HGPGLNPNAS TGQEALSQTT ISWAPFQDTS
 EYIISCHPVG TDEEPLQFRV PGTSTS- ATLT GLTRGATYNI IVEALKDQQR HKVREEVTV GNSVNEGLNQ
 25 PTDDSCFDPY TVSHYAVGDE WERMSES- GFK LLCQLGFGS GHFRCDSSRW CHDNGVNYKI
 GEKWDRQGEN QMMMSCTCLG NGKGEFKCDP HEATCY- DDGK TYHVGEQWQK EYLGAICSCT
 CFGGQRGWRC DNCRRPGGEP SPEGTTGQSY NQYSQRYHQR TNTNVNCP IE CFMPLDVQAD REDSRE
 Disulfuro: 52-78; 76-87; 97-125; 123-135; 141-169; 167-179; 186-215; 213-225; 231-260; 258-270; 308-335; 333-
 342; 360-386; 374-401; 420-446; 434-461; 470-498; 496-508; 518 545; 543-555; 561-589; 587-599; 2206-2235;
 30 2233-2245; 2251-2278; 2276-2288; 2295-2319; 2317-2333; 2367-2367; 2371-2371 INTERCADENA (CON 2367
 DE OTRA CADENA). (contado con 31 aa extras en el extremo N)
 Función: cicatrización de heridas, forma celular.
 Fibrinógeno
 Número de acceso: P02671
 35 Secuencia: GPRVV ERHQSACKDS DWPFCSD EDW NYKCPSGCRM KGLIDEVNQD FTNRINKLKN
 SLFEYQKNK DSHSLTTNIM EILRGDFSSA NNRDNTYNRV SEDLRSRIEV LKRKVIKQV HIQLLQKNVR
 AQLVDMKRLE VIDIKIRSC RGSCSRALAR EVDLKDYEDQ QKQLEQVIK DLLPSRDRQH LPLIKMKPVP
 DLVPGNFKQSQ LQKVPPEWKA LTDMPQMRME LERPGGNEIT RGGSTSYGTG SETESPRNPS SAGSWNSGSS
 GPGSTGNRNP GSSGTGGTAT WKP GSSGPGS TGSWNSGSSG TGSTGNQNP SPRPGSTGTW
 40 NPGSSERG-SA GHWTSESSVS GSTGQWHSES GSRFPDSPGS GNARPNPDW GTFEEVSGNV
 SPGTRREYHT EKLVT- SKGDK ELRTGKEKVTSGSTTTTTRS CSKTVTKTVI GPDGHKEVTK EVVTS EDGSD
 CPEAMD LGTL SGIGTLDG- FR HRHPDEAAFF DTASTGKTFP GFFSPMLGEF VSETESRGSE SGIFTNTKES
 SSHHPGIAEF PSRGKSSYS KQFTSSTSYN RGDSTFESKS YKMADEAGSE ADHEGTHSTK RGHAKSRPVR
 DCDDVLQTHP SGTQSGIFNI KLP GSSKIFS VYCDQETSLG GWLLIQRMD GSLNFNRTWQ DYKRGFGLN
 45 DEGEGEFWLG NDYLHLLTQR GSVL RVELED WAGNEAYA EY HFRVGSEAEG YALQVSSYEG TAGDALIEGS
 VEEGAEY TSH NNMQFSTFDR DADQWEENCA EVYGGGWYWN NCQAANLNGI YYPGGSYDPR
 NNSPYEIE NG VVWVSFRGAD YSLRAVRM KI RPLVTQ
 Disulfuro: 47-47 INTERCADENA (CON C-47'); 55-55 INTERCADENA (CON C-95 EN BETA); 64 -64
 INTERCADENA (CON C-49 EN GAMMA); 68-68 INTERCADENA (CON C-106 EN BETA); 180 -180
 50 INTERCADENA (CON C-165 EN GAMMA); 184-184 INTERCADENA (CON C-223 EN BETA); 461-491
 Función: información de fibrina, agregación plaquetaria.
 Filgrastim
 Número de acceso: P09919
 Secuencia: TPLGPASSLP QSFLKCLEQ VRKIQGDGAA LQEKL VSECA TYKLCHPEEL VLLGHSLGIP
 55 WAPLSS- CPSQ ALQLAGCLSQ LHSGLFLYQG LLQALEGISP ELGPTLDTLQ LDVADFATTI WQQMEELGMA
 PALQPTQ- GAM PAFASAFQRR AGGVLVASHL QSFLEVS YRV LRHLAQP
 Disulfuro: 69-75; 97-107 (contado con 30 aa en el extremo N)
 Función: estimulación de granulocitos.
 Alfa folitropina
 60 Número de acceso: P37036
 Secuencia: FPBGZFTMZG CPZCKLKZBK YFSKLGAPIY ZCMGCCFSRA YPTPARSKKT MLVPKNITSZ ATCC-
 VAKAFT KATVMGBARV ZNHTZCHCST CYYHKS
 Disulfuro: 11-35; 14-64; 32-86; 36-88; 63-91
 Función: estimulación de folículos.
 65 Beta folitropina
 Número de acceso: P01225

- Secuencia: S CELTNITIAI EKEECRCFIS INTTWCAGYC YTRDLVYKDP ARPQUIKTCT FKELVYETVR
VPGCAH-
HADS LYTYPVATQC HCGKCDSDST DCTVRGLGPS YCSFGEMKE
Disulfuro: 21-69; 35-84; 38-122; 46-100; 50-102; 105-112 (contado con 18 aa en el extremo N)
- 5 Función: estimulación de folículos.
Hormona liberadora de la hormona de crecimiento
Número de acceso: P48144
Secuencia: HADGLLDR ALRDILVQLS ARKYLHSLTA VRVGEEDDE EDSEPLS
Función: liberación de la hormona de crecimiento.
- 10 Polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria
Número de acceso: P48144
Secuencia: H SDGIFTDSYS RYRKQMAVKK YLAAVLGRRY RQRFRN (amidación del último resto)
Función: véase el nombre.
Hialuronidasa
- 15 Número de acceso: P38567
Secuencia: LNFRA PPVIPNVPFL WAWNAPSEFC LGKFDEPLDM SLFSFIGSPR INATGQGVTI FYVDRLGYYP
YIDSITGVTV NGGIPQKISL QDHLDKAKKD ITFYMPVDNL GMAVIDWEEW RPTWARNWKP KDVYKNRSIE
LVQQQNVQLS LTEATEKAKQ EFEKAGKDFL VETIKLGKLL RPNHLWGYL FPDCYNHMYK KPGYNGSCFN
VEIKRNDLDS WLWNESTALY PSYLNQQS PVAATLYVRN RVREAIRVSK IPDAKSPLPV FAYTRIVFTD QVLK-
20 FLSQDE LVYTFGETVALGASGIVIWG TSLMRSMSK CLLLDNYMETILNPYIINVT LAAKMCSQVL
CQEQQVCIRK NWNSSDYHLH NPDNFAIQLE KGGKFTVRGK PTLEDLEQFS EKFCYSCYST LSCKEKADVK
DTDAVDVCIADGV- CIDAFLK PPMETEEPQI FYNASPSTLS ATMFIVSILF LISSVASL
Función: glucosil hidrolasa.
Hirudina II
- 25 Número de acceso: P28504
Secuencia: ITYDCTESG QDLCLCEGSN VCGKGNKIL GSNGEENQCV TEGGTPKPQS HNDGDFEIP
EEYLQ Disulfuro: 6-14; 16-28; 22-39
Función: inhibidor de trombina.
Imiglucerasa
- 30 Número de acceso: P04062
Secuencia: A RPCIPKSGFY SSVVCVCNAT YCDSFDPPTF PALGTFSRYE STRSGRRMEL SMGPIQANHT GT-
GLLLTLQP EQKFQKVKGF GGAMTDAAL NILALSPPAQ NLLLSYFSE EGIGYNIIRV PMASCDIFSIR TYTY-
ADTPDD FQLHNFSLPE EDTLKIPLI HRALQLAQRV VLLASPWTS PTWLKTNQAV NGKGLSKGQP
GDIYHQT- WAR YFVKFLDAYAEHKLQFWAVT
35 AENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLGPSTLANSTHNVRLML DDQRLLPHW AKVVLTDPEA
AKYVHGIADV WYLDLFLAPAK ATLGETHRLF PNTMLFAEA CVGSKFWEQS VRLGSWDRGM QYSHSIITNL
LYHVVGWTDW NLALNPEGGP NWVRNFVDSV IVDITKDTF YKQPMFYHLG HF- SKFIPEGQ QRVGLVASQK
NDLDAVALMH PDGSAVVVVL NRSSKDVPLT IKDPAVGFLV TISPGYSIHT YLWHRQ
Función: Glucohidrolasa.
- 40 Interleuquina 2
Número de acceso: P01585
Secuencia: APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELK-
PLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT
Disulfuro: 78-125 (contado con 20 aa de señal en el extremo N)
- 45 Función: factor de crecimiento.
Interferón alfa-4
Número de acceso: P01562
Secuencia: CDLPETH SLDNRRTLML LAQMSRISPS SCLMDRHDFG FPQEEFDGNQ FQKAPAVISL
HELIQQIFNL FTTKDSAAW DEDLLDKFCT ELYQQLNDLE ACVMQEERVG ETPLMNADSI LAVKKYFRRI
50 TLYLTEKKYS PCAWEVRAE IMRSLSLSTN LQERLRRKE
Disulfuro: 24-122; 52-162 (contado con 23 aa en el extremo N)
Función: Antiviral, el interferón estimula la producción de dos enzimas, una proteína quinasa y una oligoadenilato
sintetasa.
Interferón-beta
- 55 Número de acceso: P01575
Secuencia: INYKQLQLQ ERTNIRKQCE LLEQLNGKIN LTYRADFKIP MEMTEKMQKS YTAFAIQEML QNVFLV-
FRNN FSSTGWNETH VVRLDELHQ QTVFLKTVLE EKQEERLTWE MSSTALHLKS YYWRVQRYLK LMKYN-
SYAWM VVRAEIFRNF LIIRLTRNF QN
Función: antiviral, antibacteriana y anticancerosa.
- 60 Factor intrínseco
Número de acceso: P27352
Secuencia: ST QTQSSCSVPS AQEPLVNGIQ VLMENSVTSS AYPNPSILIA MNLGAYNLK AQKLLTYQLM
SSDN- NDLTIG HLGLTIMALT SSCRDPGDKV SILQRQMNW APSSPNAEAS AFYGPSLAIL ALCQKNSEAT
LPIAVR- FAKT LLANSPPFNV DTGAMATLAL TCMYNKIPVG SEEGYRSLFG QVLKDIVEKI SMKIKDNGII
65 GDIYSTGLAM QALSVTPEPS KKEWNCKKTT DMILNEIKQG KFHNPMISIAQ ILPSLKGTKY LDVPQVTCSP
DHEVQPTLPS NPG- PGPTSAS NITVIYTINN QLRGVLELNF ETINVSVKSG SVLLVVLEEA QRKNPMFKFE

ES 2 444 840 T3

TTMTSWGLVV SSINNI- AENV NHKTYWQFLS GVTPLNEGVA DYIPFNHEHI TANFTQY

Disulfuro: 26-246; 103-288; 143-182 (contado con 18 aa extras en el extremo N)

Función: endocitosis de cobalamina

5 Invertasa

Número de acceso: Q60115

Secuencia: MFNFNASRWT RAQAMKVNKF DLTTSMPEIG TDFPINIRDDL WLWDTWPLRD INGNPVSFKG
WNV- IFSLVAD RNIPWNRHS HARIGYFYSK DGKSWVYGGH LLQESANTRT AEWSGGTIMA PGSRNQVETF
10 FT- STLFDKNG VREAVAAVTK GRIYADSEGV WFKGFDQSTD LFQADGLFYQ NYAENNLWNF RDPHVFINPE
DG- ETYALFEA NVATVRGEDD IGEDEIGPVP ANTVVPKDAN LCSASIGIAR CLSPDRTEWE LLPPLLTAFG
VNDQMERPHV IFQNGLYLF TISHDSTYAD GLTGSDGLYG FVSENGIFGP YEPLNGSGLV LGGPASQPT
AYAHYIMNNG LVESFINEII DPKSGKVIAG GSLAPTVRVE LQGHETFATE VFDYGYIPAS YAWPVWPPFD RRK

Función: sacarasa.

Lepirudina

15 Número de acceso: P01050

Secuencia: VVYTDCTESG QNLCLCEGSN VCGQGKNCIL GSDGEKNQCV TEGGTPKPQS HNDGDFEIP
EEYLQ

Disulfuros: 6-14; 16-28

Función: inhibidor de trombina.

20 Beta lutropina

Número de acceso: P01229

Secuencia: SREPLRPWCH PINAILAVEK EGCPVCITVN TTICAGYCPT MMRVLQAVLP PLPQVVCTYR DVRFE-
SIRLP GCPRGVDPVV SFPVALSCRC GPCRRSTSDC GGPKDHPLTC DHPQLSGLLF L

Disulfuro: 29-77; 43-92; 46-130; 54-108; 58-110; 113-120

25 Función: estimula la síntesis de esteroides.

Lisozima

Número de acceso: P21270

Secuencia: MDPRLREEVV RLIALTSDN GASLSKRLQS RVSALEKTSQ IHSdTILRIT QGLDDANKRI
30 IALEQSRD-DL VASVSDAQLA ISRLESSIGA LQTVVNLGDS SVTQLGARVG QLETGLADV RVDHNLVARV
DTAERNIGSL TTELSTLTLR VTSIQADFES RISTLERTAV TSAGAPLSIR NNRITMGLND GLTLSGNNLA
IRLPNGTGLN IQNG- GLQFRF NTDQFQIVNN NLTLKTTVFD SINSRIGATE QSYVASAVTP LRLNSSTKVL
DMLIDMSTLE INSSGQLTVR STSPNLRYPY ADVSGGIGMS PNYRFR

Función: hidrólisis de peptidoglucano.

Inhibidor de metaloproteinasas

35 Número de acceso: P16035

Secuencia: CSCS PVHPQQAFCN ADVVIRAKAV SEKEVDSGND IYGNPIKRIQ YEIKQIKMFK GPEKDIEFIY
TAPSSAVCGV SLDVGGKKEY LIAGKAEGDG KMHITLCDFI VPWDTLSTTQ KKSLNHRYQM GCECKITRCP MI-
PCYISSPD ECLWMDWVTE KNINGHQAKF FACIKRSDGS CAWYRGAAPP KQEFLLIEDP

Disulfuros: 27-98; 29-127; 39-152; 154-201; 159-164; 172-193 (contado con 26 aa en el extremo N)

40 Función: inactivación de proteasa.

Neurofisina

Número de acceso: P01185

Secuencia: AMSDLELRQ CLPCGPGGKG RCFGPSICCA DELGCFVGTA EALRCQEENY LPSPCQSGQK
45 ACGS-

GGRCAA FGVCCNDESC VTEPECREGF HRRA

Disulfuro: 41-85; 44-58; 52-75; 59-65; 92-104; 98-116; 105-110

Función: la neurofisina se une a la vasopresina.

Papaína

50 Número de acceso: P00784

Secuencia: VY MGLSFGDFSI VGYSQNDLTS TERLIQLFES WMLKHNKIYK NIDEKIYRFE IFKDNLKYID
ETNKKNNSYW LGLNVFADMS NDEFKEKYTG SIAGNYTTTE LSYEEVLNDG DVNIPEYVDW RQKGAVTPVK
NQGSCGSCWA FSAVVITIEGI IKIRTGNLNE YSEQELLDCD RRSYGCNGGY PWSALQLVAQ YGIHYRNTYP
YEGVQRYCRS REKGPYAAKT DGVRQVQPN EYALLYSIAN QPVSVVLEAA GKDFQLYRGG IFVGPCGNKV
55 DHAVAAVGYG PNYILIKNSW GTGWGENGYI RIKRGTGNSY GVCGLYTSSF YPVKN

Disulfuro: 155-196; 189-228; 286-333 (contado con 18 aa N-terminal)

Función: Proteinasa.

Pepsina

Número de acceso: P00790

Secuencia: VDEQPLEN YLDMEYFGTI GIGTPAQDFT VVFDTGSSNL WVPSVYCSSL ACTNHNRFNP
60 EDSSTYQSTS ETVSITYGTG SMTGILGYDT VQVGGISDTN QIFGLSETEP GSFLYYPFD GILGLAYPSI SSS-
GATPVFD NIWNQGLVSQ DLFSVYLSAD DQSGSVVIFG GIDSSYYTGS LNWWPVTVEG YWQITVDSIT
MNGEAI- ACAE GCQAIVDGT SLLTGPTSPI ANIQSDIGAS ENSDGMVVS CSAISSLPDI VFTINGVQYP
VPPSAYILQS EGSCISGFQG MNLPTESGEL WILGDVFIRQ YFTVFDRANN QVGLAPVA

65 Disulfuro: 107-112; 268-272; 311-344 (contado con 62 aa en el extremo N)

Función: Peptidasa.

Plasminógeno

Número de acceso: P00747

Secuencia: E PLDDYVNTQG ASLFSVTKKQ LGAGSIEECA AKCEEDEEFT CRAFQYHSKE QQCHEMAENR
 KSSI- IIRMRD VVLFKVKVYL SECKTGNGKN YRGTMSKTKN GITCQKWSST SPHRPRFSPA THPSEGLEEN
 5 YCRNP- DNDPQ GPWCYTTDPE KRYDYCDILE CEEECMHCSG ENYDGKISKT MSGLECAWD
 SQSPHAHGYI PSKF- PNKNLK KNYCRNPDRE LRPWCFTTDP NKRWELCDIP RCTTPPPSSG PTYQCLKGTG
 ENYRGNVAVT VSGHT- CQHWS AQTPTHNRT PENFPCKNLD ENYCRNPDGK RAPWCHTTNS
 QVRWEYCKIP SCDSSPVSTE QLAPTAPPEL TPVVQDCYHG DGQSYRGTS TTTTGKCKQS WSSMTPHRHQ
 10 KTPENYPNAG LTMNYCRNPD ADKGPWCFTT DPSVRWEYCN LKKCSGTEAS VVAPPPVLL PDVETPSEED
 CMFGNGKGYR GKRATTVTGT PCQDWAQEP HRHSIFTPET NPRAGLEKNY CRNPDGDVGG PWCYTTNPRK
 LYDYCDVPCQ AAPSFDCKGP QVEPKKCPGR VVGCVAVPH SWPWQVSLRT RFGMHFCGGT LISPEWVLT
 AHCLEKSPRP SSKYVILGAH QEVNLEPHVQ LIEVSRLFLE PTRKDIALK LSSPAVITDK VIPACLPSPN
 YVVARTECF ITWGGETQGT FGAGLLKEAQ PVVIENKVCN RYEFNLGRVQ STELCAGHLA GGTDCQGDG
 15 GGPLVCFEKG KYILQGVTSW GLGCARPNGK GVVYVRSRV TWIEGVMRNN

Disulfuro: 49-73; 53-61; 103-181; 124-164; 152-176; 185-262; 188-316; 206-245; 234-257; 275- 352; 296-335;
 324-347; 377-454; 398-437; 426-449; 481-560; 502-543; 531-555; 567-685; 577- 585; 607-623; 699-766; 729-
 745; 756-784

Función: proteasa.

Protamina

Número de acceso: P04554

Secuencia: MVRYRVRSL SERSHEVYRQQ LHGQEQGHG QEEQGLSPEH VEVYERTHGQ SHYRRRHCSR
 RRLHRIHRRQ HRSCRRRRKR SCRHRRRHRR GCRTRKRTCR RH

Función: sustitución de histona.

Protrombina

Número de acceso: P12259

Secuencia: AQ LRQFYVAAQG ISWSYRPEPT NSSLNLSVTS FKKIVYREYE PYFKKEKPKS TISGLLGPTL YAE-
 VGDIIKV HFKNKADKPL SIHPQGIKYS KLSEGASYLD HTFPAEKMD AVAPGREYTY EWSISEDSPG THDDPP-
 CLTH IYSHENLIE DFNSGLIGPL LICKKGTLE GGTQKTFDKQ IVLLFAVFDE SKSWSQSSSL MYTVNGYVNG
 5 TMPDITVCAH DHISWHLLGM SSGPELFSIH FNGQVLEQNH HKVSAITLVS ATSTTANMTV GPEGKWISS LTP-
 KHLQAGM QAYIDIKNCP KKTRNLKKIT REQRHMKRW EYFIAAEEVI WDYAPVIPAN MDKKYRSQHL DNFSN-
 QIGKH YKKVMYTQYE DESFTKHTVN PNMKEDGILG PIIRAQVRDT LKIVFKNMAS RPYSIYPHGV
 TFSPYEDEVN SSFTSGRNNT MIRAVQPGET YTYKWNILEF DEPTENDAQC LTRPYSDVD IMRDIASGLI
 GLLICKSRS LDR- RGIQRAA DIEQQAFAV FDENKSWYLE DNINKFCENP DEVKRDDPKF YESNINISTIN
 GYVPESITL GFCFD- DTVQW HFCSVGTQNE ILTIHFTGHS FIYGKRHEDT LTLFPMRGES VTVTMDNVGT
 10 WMLTSMNSSP RSKKLR- LKFR DVKICIPDDE DSYEIFEPPE STVMATRKMH DRLEPEDEES DADYDYQNR
 AAALGIRSF NS- SLNQEAAA FNLALALEN GTEFVSSNTD IIVGSNYSSP SNISKFTVNN LAEPQKAPSH
 QQATTAGSPL RHLIG- KNSVL NSSTAETHSSP YSEDPIEDPL QPDVTGIRLL SLGAGEFKSQ EHAHKHGPKV
 ERDQAAKHRF SWMKL- LAHKV GRHLSQDTGS PSGMRPWEDL PSQDTGSPSR MRPWKDPPSD
 LLLLKQSNSS KILVGRWHLA SEKG- SYEIIQ DTDEDTAVNN WLISPQNASR AWGESTPLAN KPGKQSGHPK
 15 FPRVRHKSQ VRQDGGKSR LKKSQF- LIKTR KKKKEKHTHH APLSPRTFHP LRSEAYNTFS ERRLKHSLVL
 HKSNETSLPT DLNQLTSPMD FGWIASLP- DH NQNSSNDTQ ASCPPGLYQT VPPEEHYQTF PIQDPDQMS
 TSDPSHRSS PELSEMLEYD RSHKSFPTDI SQMSPSEHE VVQTVISPD LQVTLSPELS QTNLSPDL
 TSLPELIQR NLSPALGQMP ISPDLSHTTL SP- DLSHTLLS LDLSQTNLSP ELSQTNLSPA LGQMPLSPDL
 SHHTLSLDFS QTNLSPELSH MTLSPELSQT NLSPALGQMP ISPDLSHTTL SLDFSQTNLS PELSQTNLSP
 20 ALGQMPLSPD PSHTTSLDL SQTNLSPELS QTNLSPDLSE MPLFADLSQI PLTPDLQMT LSPDLGETDL
 SPNFGQMSLS PDLQVTLSP DISDTLLPD LSQISPPDL DQI- FYPSESS QSLLLQEFNE SFPYDGLQ
 PSPSSPTLND TFLSKEFNPL VIVGLSKDGT DYIEIIPKEE VQSSD- DYAE IDYVPYDDPY KTDVRTNINS
 SRDPDNIAAW YLRSNNGNRR NYIAAEEIS WDYSEFVQRE TDIEDSDIP EDTTYKKVVF RKYLDSTFTK
 RDPRGEYEEH LGILGPIIRA EVDDVIQVRF KNLASRPYSL HAHGLSYEKS SEG- KTYEDDS PEWFKEDNAV
 25 QPNSSYTYVW HATERSGPES PGSACRAWAY YSAVNEPKDI HSGLIGPLLI CQKQIL- HKDS NMPVDMREFV
 LLFMTFDEKK SWYIEKKSRS SWRLTSSEM K SHEFHAING MIYSLPGLKM YEQEWVRLHL LNIGGSQDIH
 VVHFHGQTL ENGNKQHLG VWPLLPGSFK TLEMKASKPG WLLNTEVGE NQRAGMQTPF LIMDRDCRMP
 MGLSTGIISD SIKASEFLG YWEPRLARLN NGGSYNAWSV EKLAAEFASK PWIQVDMQKE VIITGIQTQ
 AKHYLKSCYT TEFYVAYSSN QINWQIFKGN STRNVMYFNG NSDASTIKEN QFDP- PIVARY IRISPTRAYN
 30 RPTLRLELQG CEVNGCSTPL GMENKIKEN QITASSFKS WWDYWEFPR ARLNAQ- GRVN
 AWQAKANNK QWLEIDLLKI KKITAITQG CKLSSEMYV KSYTIHYSEQ GVEWKPYRLK SSMVDKIFEG
 NTNTKGVHKN FFPPIISRF IRVIPKTWNQ SITLRLLELF CDY

Disulfuro: 167-193; 500-526; 1725-1751; 1907-2061; 2066-2221 (contado con 28 aa en el extremo N)

Función: coagulación.

Protirelina

Número de acceso: P20396

Secuencia: QPEAAQ QEAVTAAEHP GLDDFLRQVE RLLFLRENIQ RLQGDQGEHS ASQIFQSDWL SKRQHPG-
 KRE EEEEEGVEEE EEEEGGAVGP HKRQHPGRRE DEASWSVDVT QHKRQHPGRR SPWLAYAVPK RQHP-
 GRRLAD PKAQRSEEEE EEEEEEDL MPEKRQHPG RALGGPCGPQ GAYGQAGLLL GLLDDLRSQ
 5 GAEKRQHPG RRAAWVREPL EE

Función: liberación de tiotropina.

SC3

Número de acceso: P16933

Secuencia: GGHPGT TTPPVTTT VTTPPSTTTI AAGGTCTTGS LSCCNQVQSA SSSPVTALLG LLGIVLSDLN
VLVGISCS- PL TVIGVGGSGC SAQTVCCENT QFNGLINIGC TPINIL

5 Función: hidrofobina.

Sermorelina

Número de acceso: P01286

Secuencia: YADAIFTNS YRKVLGQLSA RKLQDIMSR QQGESNQERG ARARL

Función: liberación de la hormona de crecimiento.

10 Estreptodornasa

Número de acceso: P26295

IPPYHH NTVLAKTVSV NQTYGEYKDY YTVIGESNID QSAFPKIYKT TERVYKGGQT SEKRVTVSDV VYN-
PLDGYKR STGAYGVVK DMIDMSKGYR EKWETNPEPS GWFRFYNRAD NEEISEKEYD SRRTKSYKVT
NNVPVLTTL KGKYNHSHLF VASHLFADSL GKSIRKNAI TGTQMGNVGT RKGGMQYIEK KVLSHITKNP
15 DVY- VFYSAIP EYQGAELLAR SVLVSALSSD GVINETVRVF NTADGFNINY EKGGLLTESP VSEIDNIEDS
TTDEIENS- VD DSEEIVYNDT TTEEEEN

Función: DNAsa.

Estreptoquinasa

Número de acceso: P00779

20 Secuencia: IAGP EWLLDRPSVN NSQLVSVVAG TVEGTNQDIS LKFFEIDLTS RPAHGGKTEQ GLSPKSKPFA
TDSGAMSHKL EKADLLKAIQ EQLIANVHSN DDYFEVIDFA SDATITDRNG KVFADKDGGS VTLPTQPVQE
FLLSGHVVRV PYKEKPIQNG AKSVDVEYTV QFTPLNPDDD FRPGLKDTKL LKTLAIGDTI TSQELLAQAQ
SILNKNHPGY TIYERDSSIV THDNDIFRTI LPMDQEFTYR VKNREQAYRI NKKSGLNEEI NNTDLISEKY YV-
LKKGEKPY DPFDRSHLKL FTIKYVDVDT NELLKSEQLL TASERNLDFR DLYDPRDKAK LLYNNLDAFG IM-
25 DYTTLTGKV EDNHDDTNR I TVYMGKRPE GENASYHLAY DKDRYTEEER EVYSYLRYTG TPIPDNPND

Función: activación de plasminógeno.

Tiroglobulina

Número de acceso: P01266

30 Secuencia: N IFEYQVDAQP LRPELQRET AFLKQADYVP QCAEDGSFQT VQCQNDGRSC WCVGANGSEV
LG- SRQPGRPV ACLSFCQLQK QQILLSGYIN STDTSYLPQC QDSGDYAPVQ CDVQQVQCWC
VDAEGMEVYG TRQLGRPKRC PRSCEIRNR LLHGVGDKSP PQCSAEGEFM PVQCKFVNTT DMMIFDLVHS
YNRFPDAFVT FSSFQRRFPE VSGYCHCADS QGRELAETGL ELLLDEIYDT IFAGLDLPST FTETTLRYIL
QRRFLAVQSV IS- GRFRCPCK CEVERFTATS FGHPYVPSR RRGDYQAVQC QTEGPCWCVD
35 AQGKEMHGTR QQGEPSCAE GQSCASERQQ ALSRLYFGTS GYFSQHDLFS SPEKRWASPR VARFATSCPP
TIKELFVDSG LLRPMVEGQS QQFSVSENLL KEAIRAIFPS RGLARLALQF TTNPKRLQON LFGGKFLVNV
GQFNLSGALG TRGTNFSQF FQQLGLASFL NGGRQEDLAK PLSVGLDSNS STGTPEAAK DGTMNKPTVG
SFGFEINLQE NQNALKFLAS LLELPEFLF LQHAISVPED VARDLGDVME TVLSSQTCEQ TPERLFVPS
TTEGSYEDVQ CFSGECWCVN SWGKELPGSR VRGGQPRCPT DCEKQRARMQ SLMGSQPAGS
TLFVPACTSE GHFLPVQCFN SECYCVDAEG QAIPGTRSAI GKPKKCPTPC QLQSEQAFLR TVQALLSNSS
40 MLPTLSDTYI PQCSTDGQWR QVQCNGPPEQ VFELYQRWEA QNKGQDLTPA KLLVKIMSIR EAASGNFSLF
IQSLYEAGQQ DVFPVLSQYP SLQDVPLAAL EG- KRPQPREN ILLEPYLFWQ ILNGQLSQYP GYSDFSTPL
AHFDLRNCWC VDEAGQLEEG MRSEPSKLP CPG- SCIEAKL RVLQFIRETE EIVSANSR PFLGESFLVA
KGIRLRNEDL GLPPLFPRE AFAEQFLRGS DYAIR- LAAQS TLSFYQRRR SPDDSAGASA LLRSGPYMPQ
CDAFGSWEPV QCHAGTGHCW CVDEKGGFIP GSLTARSLQI PQCPPTCEKS RTSGLSSWK QARSQENPSP
45 KDLFVPACLE TGEYARLQAS GAGTWCVDPA SGEELRPGSS SSAQCPSLCN VLKSGVLSRR VSPGYVPACR
AEDGGFSPVQ CDQAQSGCWC VMDSGEEVPG TRVTGGQPAC ESPRCPLPFN ASEVGGTIL CETISGPTGS
AMQQCQLLQCR QGSWSVFPFG PLICSLESGR WESQLPQRA CQRPQLWQTI QTQGHFQLQL PPGKMCADY
AGLLQTFQVF ILDEL TARGF CQIQVKTFGT LVSIPVCNNS SVQVGLTRE RLGVNVTWKS RLEDIPVASL
PDLHDIERAL VGKDLLGRFT DLIQSGSFQL HLD- SKTFPAE TIRFLQGDHF GTSPTWFGC SEGFYQVLT
50 EASQDGLGCV KCPEGSYSQD EECIPCPVGF YQEAGSLAC VPCPVGRTTI SAGAFSQC THC VTDCQRNEAG
LQCDQNGQYR ASQKDRGSGK AFCVDGEGRR LPWWETEAPL EDSQCLMMQK FEKVPESKVI FDANAPVAVR
SKVPDSEFPV MQCLTDCTED EACSFFTSTV TE- PEISCFY AWTSDNVACM TSDQKRDALG NSKATSFGL
RCQVKVRSHG QDSPAVYLK GQGSTTLQK RFEP TGFQNM LSGLYNPIV SASGANLTA HLFCLLACDR
DLCCDGFVLT QVQGGAIICG LLSSPSVLLC NVK- DWMDPSE AWANATCPGV TYDQESHQVI LRLGDQEFIK
55 SLTPLEGTQD TFTNFQVYL WKDSDMGSRP ESM- GCRKDTV PRPASPTAEG LTELFPSPVD LNQVIVNGNQ
SLSSQKHWF KHLFSAQQAN LWCLSRCVQE HSFC- QLAIEIT ESASLYFTCT LYPEAQVCCD IMESNAQGC
LILPQMPKAL FRKKVILEDK VKNFYTRLPF QKLMGISIRN KVPMSSEKIS NGFFECERRC DADPACTGFG
FLNVSQKGG EVTCLTLNSL GIQMCSEENG GAWRILDCGS PDIEVHTYPF GWYQKPIAQN NAPSFCPLV
LPSLTEKVSL DSWQSLALSS VVVDPSIRHF DVAHVSTAAT SNF- SAVRDLC LSECSQHEAC LITTLQTQPG
60 AVRRCMFYADT QSCTHSLQGG NCRLLREEA THYRKP GIS LLS- YEASVPS VPISTHGRLL GRSQAIQVGT
SWKQVDQFLG VPYAAPPLAE RRFQAPEPLN WTGSWDASKP RAS- CWQPGTR TSTSPGVSED CLYLNVPFIQ
NVAPNASVLV FFHNTMDREE SEGWPAIDGS FLAAVGNLIV VTASIR- VGVF GFLSSGSGEV SGNWGLLDQV
AALTWQTHEI RGFSGDPRRV SLAADRGGAN VASIHLLTAR ATNSQL- FRRA VLMGGSALP AAVISHERAQ
QQAIALAKEV SCPMSSSQEV VSCLRQKPAD VLNDAQTKLL AVSGPFHY- WG PVIDGHFLRE PPARALKRSL
65 WVEVDLLIGS SQDDGLINRA KAVKQFEESR GRTSSKAFY QALQNSLGGE DSDARVEAAA TWYYSLEHST
DDYASFSRAL ENATRDYFII CPIIDMASAW AKRARGNVFM YHAPENYGHG SLELLADVQF ALGLPFYPAY

EQQFSLEEK LSLKIMQYFS HFIRSGPNY PYEFSRKVPT FATPWPDFVP RAG- GENYKEF SELLPNRQGL
 KKADCSFWSK YISSLKTSAD GAKGGQSAES EEEELTAGSG LREDLLSLQE PGSK- TYSK

Función: precursor de la hormona tiroidea.

Uroquinasa.

5 Número de acceso: P00749

Secuencia:

MRALLARLLLCVLVSDSKGSNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYF FT SNIHCNCPKFKGGQHCEIDKSKT-
 CYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLFWNS ATVLQQTTFTHAHRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCY-
 VQVGLKPLVQ ECMVHDCADGKKPSSPPEEFTLKFQCGQKTLRPRFKIIGGEFTTIENQPWFAAI

10 YRRHRGGSVTYVCGGSLISPCWVISAFTTHCFIDYPKKEDIYIVYLGRSRLNSN

TQGEMKFEVENLILHKDYSADTLAHHNDIALKIFTRSKEGRCAQPSRTIQTIC

LPSMYNDPQFGTSCEITGFGKENSTDYLYPEQLKMTVVKLIFTSHRECQQPHY YGSEVTTKMLCAADPQWKTD-
 SCQGDSSGPLVCSLQGRMTLTGIVSWGGRG FT CALKDKPGVYTRVSHFLPWIRSHTEENGLAL

Función: activación de plasminógeno.

15

Tabla 2, péptidos líder

Epicidina-280	MENKKDLFDLEIKKDNMENNNELEAQ
Pep-5	MKNNKNLFDLEIKKETSQNTDELEPQ
Epilancina-K7	MNNSLFDLNLNKGVETQKSDLSPQ
Nisina-A/Z	MSTKDFNLDLVSVSKKDSGASPR
Subtilina	MSKFDDFDLVVKVSKQDSKITPQ
Epidermina	
	MEAVKEKNLDFNLDVKVNAKESNDSGAEP
Galidermina	
	MEAVKEKNELFDLVDKVNKESNDSGAEP
Mutacina-1140/III	
	MSNTQLLEVLGTETFDVQEDLFAFD
	TTDTTIVASNDPDP TR
Lacticina-481	MKEQNSFNLLQEVTESELDLILGA
Variacina	MTNAFQALDEVTDALDAILGG
Mutacina-II	MNKLNSNAVSLNEVSDSELDLILGG
Estreptococina-A-FF22	MEKNNEVINSIQEVSLEELDQIIGA
Salivaricina-A	MNAMKNSKDILNNAIEEVSEKELMEVAGG
Sublancina	MEKLFKEVKLEELENQKGS
Lactocina-S	
	MKTEKKVLDELHSLHASAKMGARDVESSMNAD
Ruminococina A	MRNDVLTLTNPMEEKELEQILGG
Butlirivibriocina	OR79A MNKELNALNTPIDEKELEQILGG
Estreptococina	A-M49 MTKHEHIINSIQEVSLEELDQIIGA
Bacteriocina J46	MKEQNSFNLLQEVTESELDLILGA
Salivaricina A1	
	MKNSKDILTNAEEVSEKELMEVAGG
Estreptina	MNNTIKDFDLKTNKKTATPY
Plantaricina-W alfa	MKISKIEAQARKDFFKIDTNSNLLNVNGA
Lacticina-3147A1	
	MNKNEIETQPVTWLEEVSDQNFDEDVFGA
Estafilococina-C55 alfa	
	MKSSFLEKDIEEQVTWFEEVSEQEFDDDDIFGA
Plantaricina-W beta	
	MTKTSRRKNAIANYLEPVDEKSINESFGAGDPEAR
Lacticina-3147A2	
	MKEKNMKNNDTIELQLGKYLEDDMIELAEGDESHGG
Estafilococina-C55 beta	
	MKNELGKFLEENELELGKFSSEDMLEITDDEVYAA
Citolisina-LL	

ES 2 444 840 T3

MENLSVVPSFEELSVEEMEAIQSGSDVQAE
Citolisina-LS
MLNKENQENYYSNKLELVGPSFEE
LSLEEMEAIQSGSDV QAE
Cinnamicina
MTASILQQSVVDADFRAALLENPAAFGASAAALPTPVEAQD
QASLDFWTKD IAATEAFA
Mersacidina
MSQEAIIRSWKDPFSRENSTQNPAGNPFSELIKEAQMDKLVGAG
DNEAA

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir, en una célula hospedadora, un polipéptido que contiene un puente tioéter, cuyo origen no es una bacteria Gram-positiva, comprendiendo el procedimiento;
- 5 a) seleccionar una célula hospedadora que tenga una molécula de ácido nucleico que comprenda un primer y un segundo fragmento de ácido nucleico que estén en la misma fase de lectura abierta, en la que
- 10 - el primer fragmento de ácido nucleico codifica un péptido líder de lantibiótico que es funcionalmente equivalente a un péptido líder N-terminal encontrado en un prepéptido de un lantibiótico, y en el que este péptido líder actúa como una secuencia señal de translocación y una señal de reconocimiento, de tal manera que pueda producirse la formación de un puente tioéter;
- 15 - el segundo fragmento de ácido nucleico codifica un polipéptido deseado que comprende una secuencia a modificar en un puente tioéter, seleccionándose la secuencia del grupo de secuencias constituido por Ser-Xaa_n-Cys y Thr-Xaa_n-Cys, donde Xaa es un cualquier aminoácido y donde n es 1-13, y donde el polipéptido no tiene como origen una célula bacteriana Gram-positiva;
- b) seleccionar la célula hospedadora para detectar la presencia de la proteína transportadora LanT;
- 20 c) traducir la molécula de ácido nucleico, produciendo de este modo un péptido de fusión del péptido líder de lantibiótico y el polipéptido que comprende la secuencia seleccionada del grupo de secuencias constituido por Ser-Xaa_n-Cys y Thr-Xaa_n-Cys, donde Xaa es cualquier aminoácido y donde n es 1-13; y
- d) recoger el polipéptido que contiene el puente tioéter de un medio de la célula hospedadora.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que adicionalmente comprende recoger dicho polipéptido deseado después de detectar la presencia de dicho péptido líder en el medio de cultivo de dicha célula.
- 25 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 donde dicho polipéptido deseado es de origen esencialmente eucariota o viral.
- 30 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 donde dicho polipéptido se selecciona del grupo constituido por polipéptidos con SEC ID N°: 1 a 249 como se indica en la tabla 1A.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde dicho péptido líder se selecciona del grupo constituido por péptidos líder con SEC ID N°: 250 a 280 como se indica en la tabla 1B.
- 35 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde dicha célula hospedadora es una célula procariota Gram-negativa o eucariota.
7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde dicho (poli)péptido que no ha sufrido modificación postraducciona intracelular comprende la deshidratación de una serina o una treonina y/o formación de un puente tioéter.
- 40 8. Un método que permite la modificación de un polipéptido deseado producido por una célula hospedadora recombinante, comprendiendo dicho método las etapas a, b, c y d de la reivindicación 1 y comprendiendo adicionalmente seleccionar dicha célula hospedadora para detectar la presencia de una enzima capaz de proporcionar modificación postraducciona.
- 45 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 que permite la modificación extracelular de dicho (poli)péptido deseado comprendiendo adicionalmente dicho método seleccionar dicha célula hospedadora para detectar la presencia de una enzima esencialmente extracelular capaz de proporcionar modificación postraducciona.
- 50 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 o 9 donde dicha enzima es capaz de deshidratar una serina o una treonina.
- 55 11. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 o 9 donde dicha enzima es capaz de proporcionar la formación de un puente tioéter.
12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 donde dicho (poli)péptido deseado es de origen esencialmente eucariota o viral.
- 60 13. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 donde dicho polipéptido se selecciona del grupo constituido por polipéptidos con SEC ID N°: 1 a 249.
- 65 14. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 donde dicho péptido líder se selecciona del grupo constituido por péptidos líder con SEC ID N°: 250 a 280.

15. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14 donde dicha modificación comprende la deshidratación de una serina o una treonina y/o la formación de un puente tioéter.
- 5 16. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15 donde dicha célula hospedadora es una célula procariota Gram-negativa o una célula eucariota.
- 10 17. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 16 donde dicho polipéptido que no ha sufrido modificación postraducciona l intracelular comprende la deshidratación de una serina o una treonina y/o la formación de un puente tioéter.
- 10 18. Un método para la producción de un polipéptido de origen no lantibiótico que comprende deshidroalaninas y/o restos de ácido deshidrobutírico que comprende:
- 15 a) seleccionar una célula hospedadora que tenga una molécula de ácido nucleico que comprenda un primer y un segundo fragmento de ácido nucleico que estén en la misma fase de lectura abierta, donde
- 20 - el primer fragmento de ácido nucleico codifica un péptido líder de lantibiótico que es funcionalmente equivalente a un péptido líder N-terminal encontrado en un prepéptido de un lantibiótico y donde este péptido líder actúa como una secuencia señal de translocación y una señal de reconocimiento, de tal manera que pueda producirse la formación de un puente tioéter;
- 20 - el segundo fragmento de ácido nucleico codifica un polipéptido deseado que comprende una secuencia a modificar en un puente tioéter, seleccionándose la secuencia del grupo de secuencias que consiste en Ser-Xaa_n-Cys y Thr-Xaa_n-Cys, donde Xaa es cualquier aminoácido y donde n es 1-13; y donde el polipéptido no tiene como origen una célula bacteriana Gram-positiva;
- 25 - y una molécula de ácido nucleico que codifica LanB o la parte N-terminal de LanM y opcionalmente una molécula de ácido nucleico que codifica LanT;
- b) permitir la traducción de dichas moléculas de ácido nucleico; y
- 30 c) opcionalmente someter a lisis dichas células hospedadoras; y
- d) recoger dicho polipéptido deseado.
19. Una célula hospedadora que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un primer y un segundo fragmento de ácido nucleico que están en la misma fase de lectura abierta, donde
- 35 - el primer fragmento de ácido nucleico codifica un péptido líder de lantibiótico que es funcionalmente equivalente a un péptido líder N-terminal encontrado en un prepéptido de un lantibiótico y donde este péptido líder actúa como una secuencia señal de translocación y una señal de reconocimiento, de tal manera que puede producirse la formación de un puente tioéter;
- 40 - el segundo fragmento de ácido nucleico codifica un polipéptido deseado que comprende una secuencia a modificar en un puente tioéter, seleccionándose la secuencia del grupo de secuencias que consiste en Ser-Xaa_n-Cys y Thr-Xaa_n-Cys, donde Xaa es cualquier aminoácido donde n es 1-13; y donde el polipéptido no tiene como origen una célula bacteriana Gram-positiva;
20. Una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 19 donde dicho polipéptido deseado es de origen esencialmente eucariota o viral.
21. Una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 20 donde dicho (poli)péptido se selecciona del grupo que consiste en polipéptidos con SEC ID N°: 1 a 249.
- 50 22. Una célula hospedadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 donde dicho péptido líder se selecciona del grupo que consiste en péptidos líder con SEC ID N°: 250 a 280.
23. Una célula hospedadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, siendo dicha célula hospedadora una célula procariota Gram-negativa o una célula eucariota.
- 55 24. Una célula hospedadora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23 provista de una proteína LanT y no provista de una proteína LanB.
25. Una célula hospedadora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23 provista de una proteína LanT y no provista de una proteína LanC.
- 60 26. Una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 25 provista con una LanB.
27. Una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 23 provista con una proteína LanT, LanB, LanC y/o LanM.
- 65

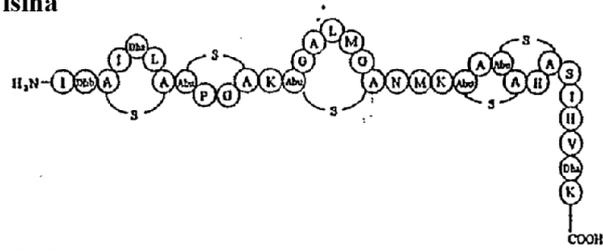
28. Una molécula de ácido nucleico que comprende un primer y un segundo fragmento de ácido nucleico que están en la misma fase de lectura abierta, donde

- 5 - el primer fragmento de ácido nucleico codifica un péptido líder de lantibiótico que es funcionalmente equivalente a un péptido líder N-terminal encontrado en un prepéptido de un lantibiótico y donde este péptido líder actúa como una secuencia señal de translocación y una señal de reconocimiento, de tal manera que puede producirse la formación de un puente tioéter;
- 10 - el segundo fragmento de ácido nucleico codifica un polipéptido deseado que comprende una secuencia a modificar en un puente tioéter, seleccionándose la secuencia del grupo de secuencias que consiste en Ser-Xaa_n-Cys y Thr-Xaa_n-Cys, donde Xaa es cualquier aminoácido y donde n es 1-13;
- en el que dicho polipéptido es de origen eucariota o viral.

15 29. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 28 donde dicho (poli)péptido se selecciona del grupo que consiste en polipéptidos con SEC ID N°: 1 a 249.

30. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 28 o 29, donde dicho péptido líder se selecciona del grupo que consiste en péptidos líder con SEC ID N°: 250 a 280.

Nisina



Subtilina

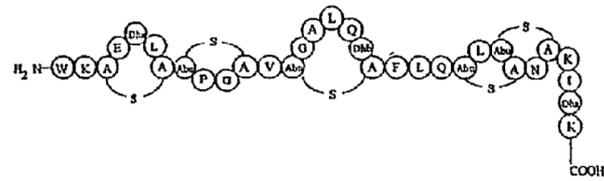


Figura 1

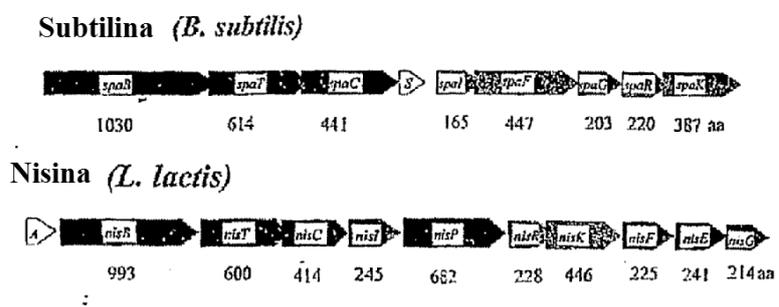


Figura 2

Biosíntesis de Nisina

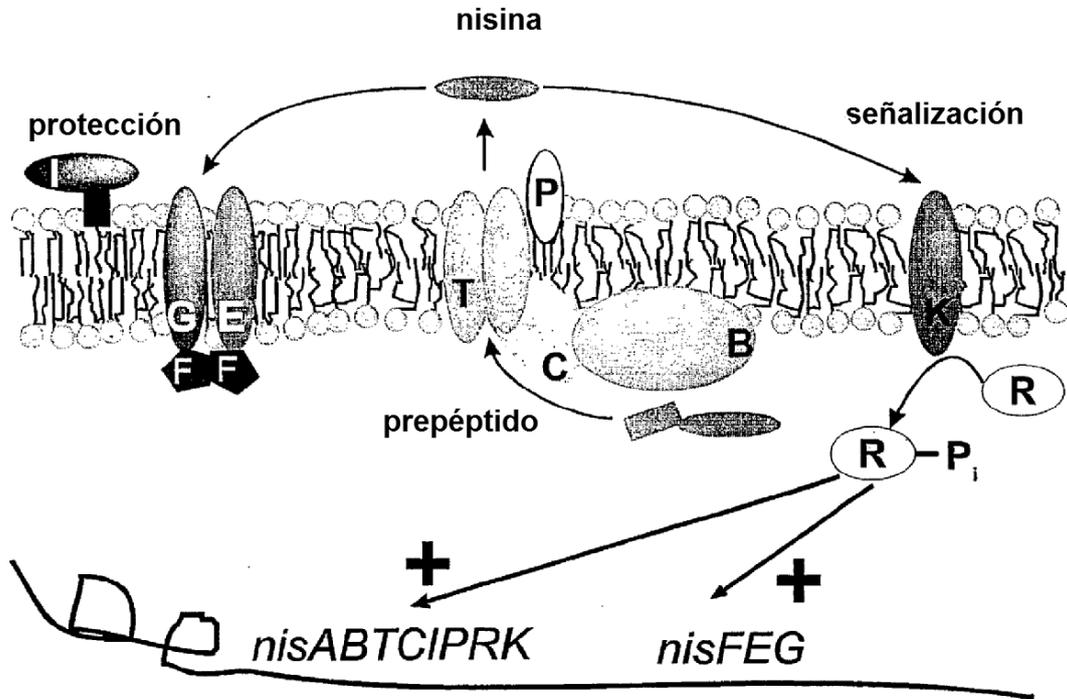


Figura 3

Biosíntesis de Nisina

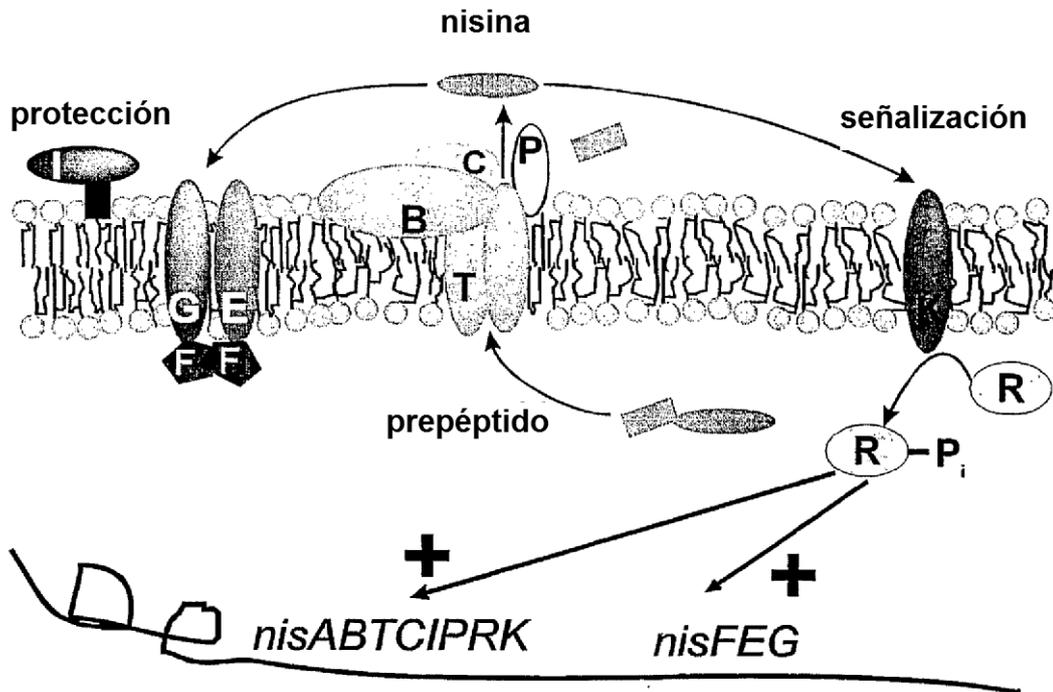


Figura 4.

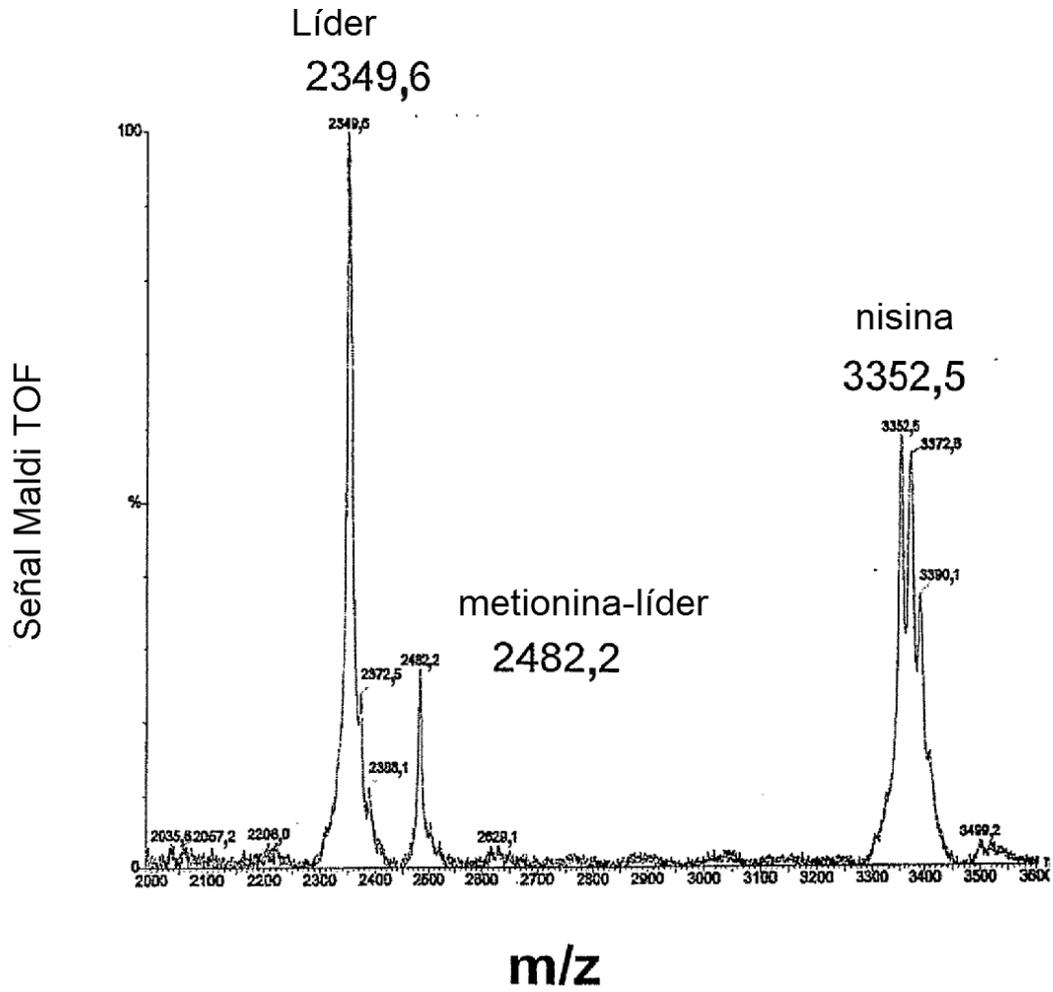


Figura 5.

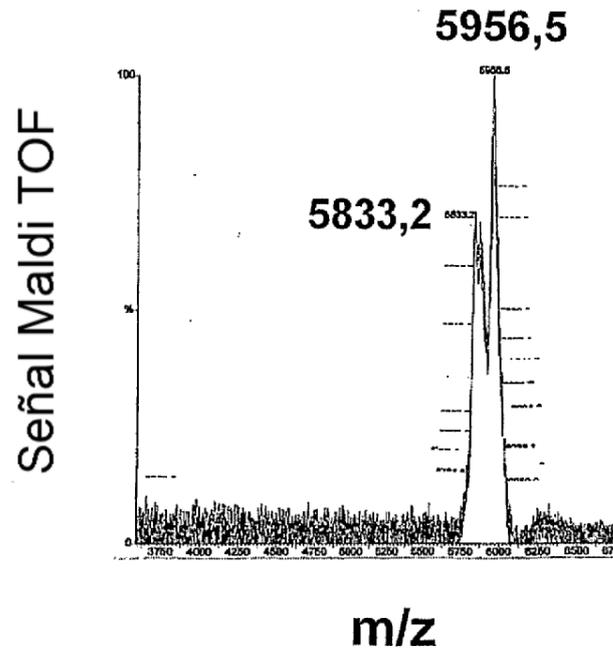


Figura 6

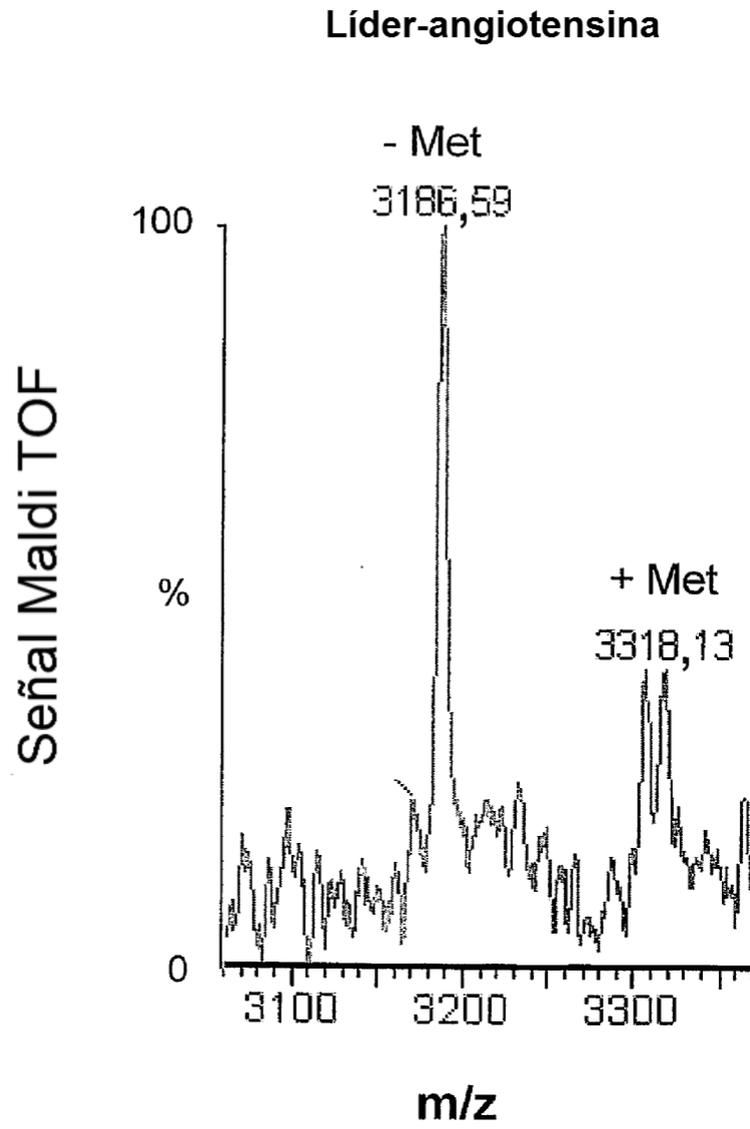


Figura 7

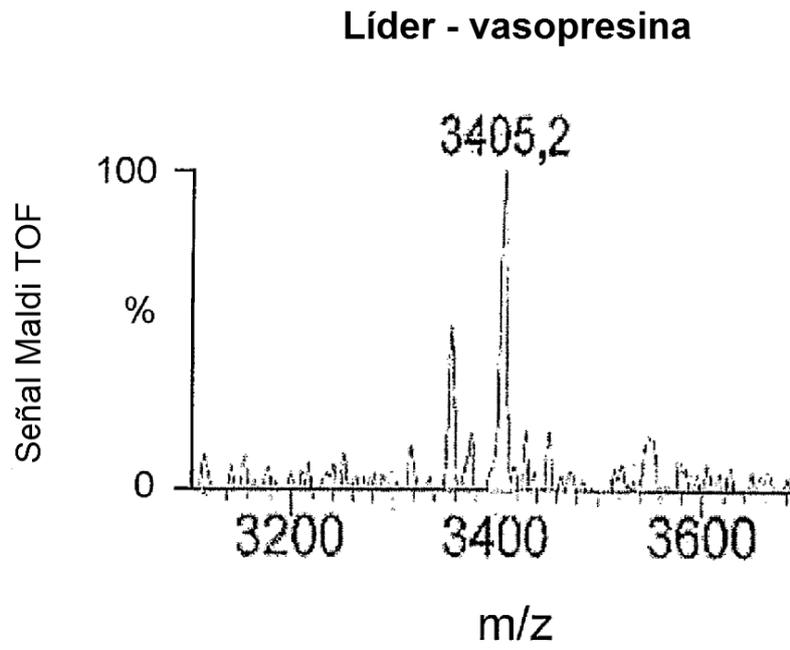


Figura 8

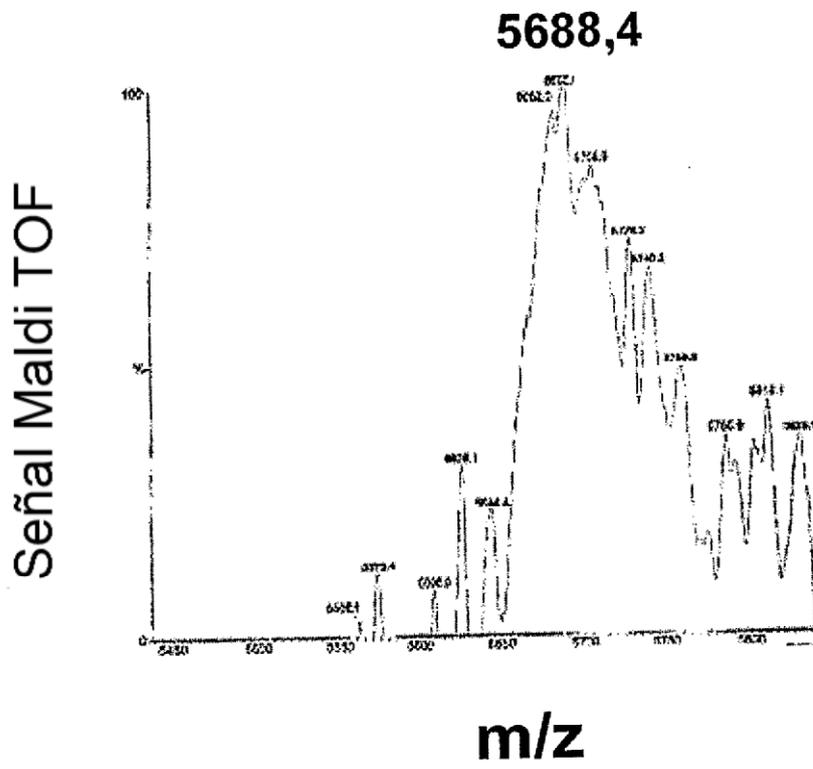
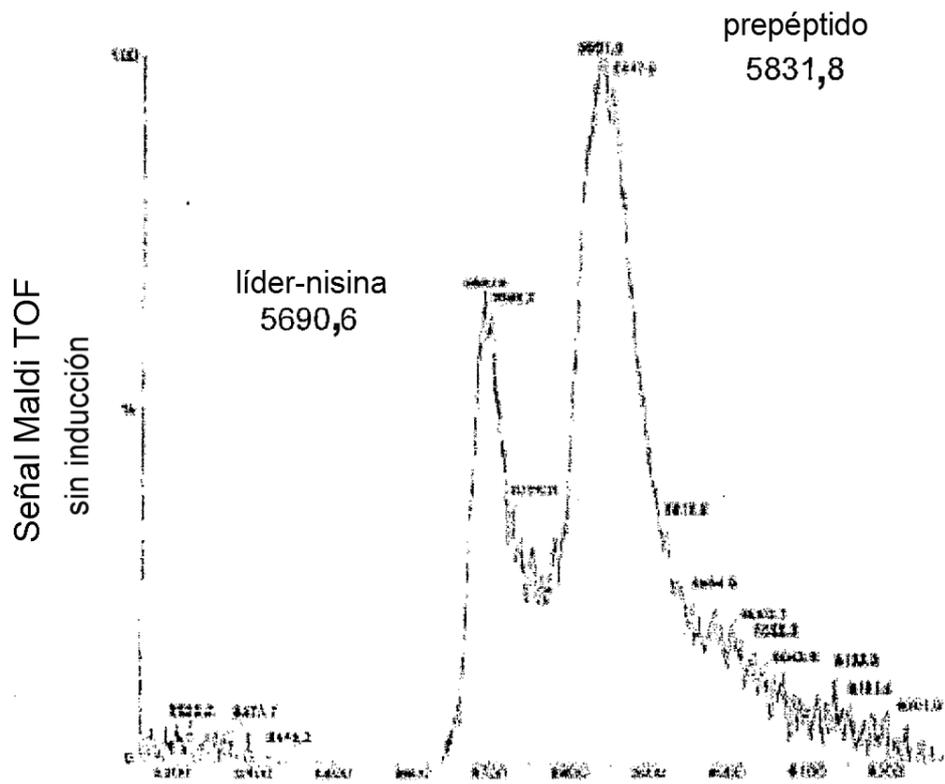
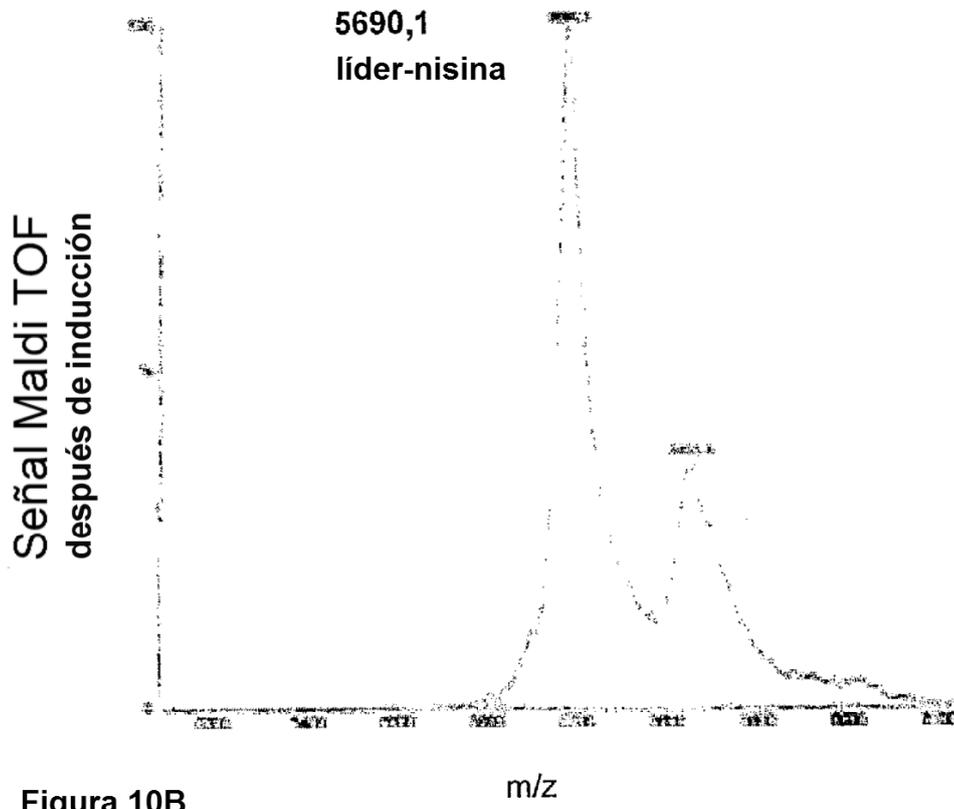


Figura 9





prepeptido de nisina - encefalina T

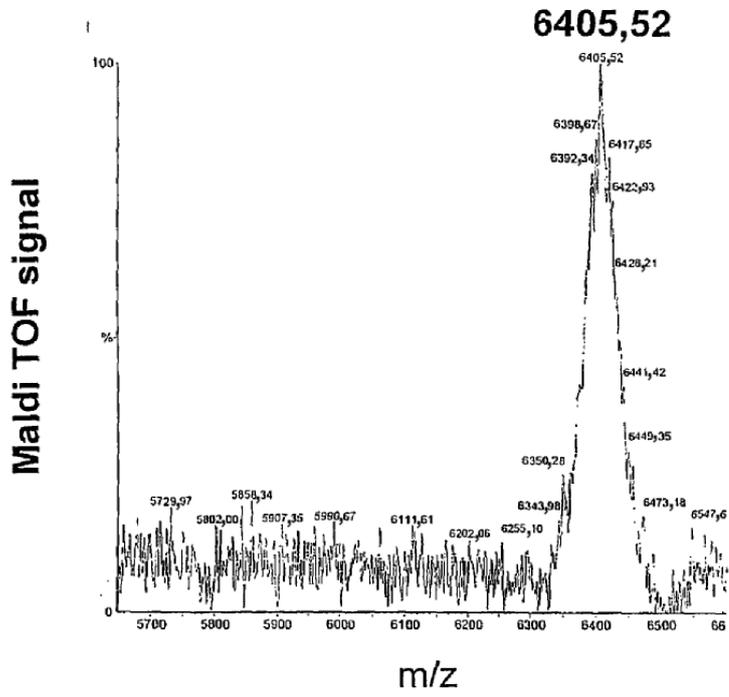


Figura 11