

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 497 441**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 15/12</b>	(2006.01)	<b>C12N 15/11</b>	(2006.01)
<b>A01N 63/02</b>	(2006.01)		
<b>A01P 1/00</b>	(2006.01)		
<b>A61K 38/08</b>	(2006.01)		
<b>A61K 38/10</b>	(2006.01)		
<b>A61P 37/04</b>	(2006.01)		
<b>A61P 37/06</b>	(2006.01)		
<b>C07K 14/47</b>	(2006.01)		
<b>C07K 7/06</b>	(2006.01)		
<b>C07K 7/08</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2007 E 07800481 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2061886**

54 Título: **Péptidos inmunomoduladores catiónicos pequeños**

30 Prioridad:

**21.08.2006 US 839253 P**

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

**22.09.2014**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA  
(100.0%)  
No. 103-6190 Agronomy Road  
Vancouver, British Columbia V6T 1Z3, CA**

72 Inventor/es:

**HANCOCK, ROBERT E. W.;  
HILPERT, KAI;  
CHERKASOV, ARTEM y  
FJELL, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 497 441 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).

**Péptidos inmunomoduladores catiónicos pequeños****DESCRIPCIÓN**5 **CAMPO**

La presente invención se refiere generalmente a péptidos y más específicamente a péptidos de defensa del huésped inmunomoduladores.

10 **ANTECEDENTES**

El tratamiento de infecciones bacterianas con antibióticos es uno de los pilares de la medicina humana. Desafortunadamente, la eficacia de los antibióticos se ha limitado debido a un aumento en la resistencia bacteriana a los antibióticos a pesar de una disminución de los esfuerzos y el éxito en el descubrimiento de nuevas clases de antibióticos. Hoy en día, las enfermedades infecciosas son la segunda causa frecuente de muerte en el mundo y la causa principal de muertes prematuras y pérdida de productividad en el trabajo en países industrializados. Las infecciones bacterianas nosocomiales que son resistentes a terapia producen costes anuales superiores a los 2 billones de dólares y representan más de 80.000 muertes directas e indirectas en América del Norte solo, mientras que una complicación importante de enfermedades microbianas, concretamente septicemia, representa 700.000 casos y 140.000 muertes en América del Norte.

Una limitación importante en el desarrollo de antibióticos han sido las dificultades en encontrar nuevas estructuras con propiedades equivalentes a los antibióticos convencionales, concretamente baja toxicidad para el huésped y un amplio espectro de acción contra patógenos bacterianos. Las recientes y novedosas clases de antibióticos, que incluyen las oxazolidinonas (linezolid), las estreptograminas (Synercid) y los glicolípidos (daptomicina), son todos activos solo contra patógenos Gram-positivos. Los péptidos antimicrobianos catiónicos, encontrados en la mayoría de las especies de vida, representan una buena plantilla para una nueva generación de antimicrobianos. Destruyen tanto microorganismos Gram-negativos como Gram-positivos rápidamente y directamente, no seleccionan fácilmente mutantes, trabajan contra bacterias clínicamente resistentes comunes tales como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE), muestran un efecto sinérgico con antibióticos convencionales y pueden activar frecuentemente la inmunidad innata del huésped sin mostrar inmunogenicidad (Hancock REW. 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. Lancet Infectious Diseases 1, 156-164). Además, parece que contrarrestan algunos de los aspectos más perjudiciales de la inflamación (por ejemplo, septicemia, endotoxemia), que es extremadamente importante ya que la rápida destrucción de las bacterias y posterior liberación de componentes bacterianos tales como LPS o peptidoglicano puede inducir desregulación inmunitaria letal (reacción de Jarisch-Herxheimer) (Gough M, Hancock REW, Kelly NM. 1996. Anti-endotoxic potential of cationic peptide antimicrobials. Infect. Immun. 64, 4922-4927). Existe la necesidad en la materia de desarrollar nuevos tratamientos para infecciones que van a usarse como antibióticos de amplio espectro y/o como agentes que potencian selectivamente aspectos de inmunidad innata a la vez que suprimen la inflamación posiblemente perjudicial.

El sistema inmunitario innato es un sistema de defensa general altamente eficaz y evolucionado que implica una variedad de funciones efectoras que incluyen células fagocíticas, complemento y similares, pero generalmente no se comprende completamente. Los elementos de inmunidad innata están siempre presentes a bajos niveles y se activan muy rápidamente cuando se estimulan por patógenos, actuando para prevenir que estos patógenos causen enfermedad. En términos generales, muchas respuestas inmunitarias innatas conocidas son "desencadenadas" por la unión de moléculas de señalización microbiana, como lipopolisacárido (LPS), con receptores de reconocimiento de patrones tales como receptores similares a Toll (TLR) sobre la superficie de células huésped. Muchas de las funciones efectoras de la inmunidad innata se agrupan juntas en la respuesta inflamatoria. Sin embargo, una respuesta inflamatoria demasiado grave puede producir respuestas que son perjudiciales para el cuerpo y, en un caso extremo, puede producirse septicemia y posiblemente muerte; de hecho, la septicemia se produce en aproximadamente 780.000 pacientes en América del Norte anualmente con 140.000 muertes. Así, una intervención terapéutica para reforzar la inmunidad innata, que se basa en la estimulación de la señalización de TLR (por ejemplo, usando un agonista de TLR), tiene la posible desventaja de que podría estimular una respuesta inflamatoria posiblemente perjudicial y/o agravar la respuesta inflamatoria natural a infección. Existe otra necesidad en la materia de intervenciones terapéuticas para reforzar la inmunidad innata que son eficaces y tienen menos efectos secundarios no deseables o reacciones adversas. El documento WO-A-2006050611 desvela una clase novedosa de péptidos que tienen actividad antimicrobiana, mientras que el documento WO-A-03048383 desvela péptidos que potencian la inmunidad innata en un sujeto.

60 **RESUMEN**

La invención presenta polipéptidos inmunomoduladores que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 2, 1213, 1214, 1222, 1224, 1230, 1232, 1238 ó 12. La invención también presenta variantes de adición de estos polipéptidos, que pueden comprender hasta cincuenta aminoácidos adicionales sobre los extremos terminales amino o carboxi de estas SEC ID N°. Si están presentes aminoácidos adicionales en los extremos amino y carboxi, los

aminoácidos en el extremo amino pueden ser los mismos o diferentes de los aminoácidos en el extremo carboxi. También se proporcionan polinucleótidos que codifican los polipéptidos inventivos.

5 También se caracterizan según la presente divulgación procedimientos para potenciar la inmunidad innata. Los procedimientos generalmente comprenden poner en contacto una célula que expresa al menos un polipéptido implicado en la inmunidad innata con una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos un polipéptido según la invención.

10 Poner en contacto la célula con la composición modula, por ejemplo, inhibe o potencia, la expresión del al menos un polipéptido que participa en la inmunidad innata. El polipéptido que participa en la inmunidad innata puede ser una quimiocina o citocina. El polipéptido que participa en la inmunidad innata puede codificarse por el gen MCP-1, MCP-3, IL-8 o Gro- $\alpha$ .

15 La divulgación también presenta procedimientos de supresión de una respuesta pro-inflamatoria. Los procedimientos generalmente comprenden poner en contacto una célula que expresa al menos una citocina pro-inflamatoria, mediador o proteína en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio con una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos un polipéptido según la invención. El poner en contacto la célula con la composición inhibe la expresión de la al menos una citocina pro-inflamatoria, mediador o proteína. En algunos aspectos, la composición inhibe la respuesta inflamatoria o séptica. En algunos aspectos, la composición inhibe la expresión de un gen pro-inflamatorio o molécula en la célula. En aspectos altamente preferidos, la composición inhibe la expresión de TNF- $\alpha$  en la célula. Los procedimientos son aplicables a suprimir la respuesta pro-inflamatoria inducida por cualquier estímulo. En aspectos preferidos, los procedimientos se utilizan para suprimir la respuesta inflamatoria inducida por un microbio o un ligando microbiano que actúa sobre un receptor similar a Toll. Por ejemplo, el ligando microbiano puede ser una endotoxina o lipopolisacárido bacteriano.

25

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**Figura 1.** Flujo de trabajo general del modelado de QSAR de péptidos antimicrobianos.

30 **Figura 2.** Análisis de la sustitución completa del péptido VRLRIRVAVIRA. **A.** Actividad. Las dos primeras columnas dan la posición (indicada como el número de fila) y la secuencia del código de una letra del péptido original indolicidina. La segunda y tercera filas dan respectivamente el número de columna y los aminoácidos sustituidos en cada posición de aminoácido. Así, por ejemplo, el péptido en la esquina izquierda superior (columna 1, fila 1) es ARLRIRVAVIRA (HH253) y en la esquina derecha inferior (columna 10, fila 12) VRLRIRVAVIRY (HH468). Los resultados presentados dentro de cada recuadro representan el valor de CE<sub>50</sub> relativo, es decir, la concentración que produce una disminución del 50 % en la luminiscencia con respecto al péptido parental que aparece una vez en cada fila (por ejemplo, fila 1 columna 17, fila 2 columna 14, etc.), como se ha determinado por tratamiento de la cepa indicadora de lux H1001 con péptido durante cuatro horas. Los resultados están codificados en colores como negro = actividad superior a la del péptido parental indolicidina; gris oscuro con caligrafía en blanco = actividad modestamente más fuerte que la del péptido parental; gris claro con caligrafía en negro = actividad similar a la del péptido parental; blanco = muy poca actividad. I\* representa sin actividad, la CE<sub>50</sub> no pudo determinarse ya que la curva no mostró base. **B.** Un índice para la Figura 2A que muestra los números de identificación de secuencias de cada péptido de sustitución.

45 **Figura 3.** Análisis de la sustitución completa del péptido de defensa del huésped bovino indolicidina. **A.** Actividad. Las dos primeras columnas dan la posición (indicada como el número de fila) y la secuencia de código de una letra del péptido original indolicidina. La segunda y tercera filas dan respectivamente el número de columna y los aminoácidos sustituidos en cada posición de aminoácido. Así, por ejemplo, el péptido en la esquina izquierda superior (columna 1, fila 1) es ALPWKWPWWPWRR (HH19) y en la esquina derecha inferior (columna 10, fila 13) ILPWKWPWWPWRY (HH252). Los resultados presentados dentro de cada recuadro representan el valor de CE<sub>50</sub> relativo, es decir, la concentración que produce una disminución del 50 % en la luminiscencia con respecto al péptido parental que aparece una vez en cada fila (por ejemplo, fila 1 columna 7, fila 2 columna 9, etc.), como se ha determinado por tratamiento de la cepa indicadora de lux H1001 con péptido durante cuatro horas. Los resultados están codificados en colores como negro = actividad superior a la del péptido parental indolicidina; gris oscuro con caligrafía en blanco = actividad modestamente más fuerte que la del péptido parental; gris claro con caligrafía en negro = actividad similar a la del péptido parental; blanco = muy poca actividad. I\* representa sin actividad, la CE<sub>50</sub> no pudo determinarse ya que la curva no mostró base. **B.** Un índice para la Figura 1A que muestra los números de identificación de secuencias de cada péptido de sustitución.

60 **Figura 4.** Actividad antimicrobiana de 200 péptidos al azar. Todos los péptidos se clasificaron en la clase de actividad "menos activo que el péptido de control Bac2A o inactivo".

**Figura 5.** Aparición de aminoácidos en la nueva biblioteca de péptidos cuasi-aleatorios. Los aminoácidos se facilitan como el código de una letra. Después de la evaluación de la actividad antimicrobiana usando el ensayo de Lux, la aparición de aminoácidos en cada grupo de actividad, excepto el superior (no hay miembros suficientes), se comparó con la aparición del entorno de la biblioteca cuasi-aleatoria.

65 **Figura 6.** Aparición (proporción del total) de aminoácidos en ambas bibliotecas de péptidos cuasi-aleatorios (primera y segunda generación).

**Figura 7.** Actividad antimicrobiana de 500 péptidos cuasi-aleatorios. Los péptidos se clasificaron en clases de actividad correspondientes a su actividad antimicrobiana frente a *P. aeruginosa* en comparación con el péptido de control Bac2A. Se usaron cuatro clases de actividad: “menos activo que el control o inactivo”, “similamente activo al control”, “más activo que el control” y “actividad superior”. El número de péptidos en cada clase se expresa como un porcentaje del número total de péptidos en la biblioteca.

**Figura 8.** Base para secuencias de comandos de SVL customizadas para parámetros inductivos. Las secuencias de comandos de SVL customizadas (un lenguaje especializado de MOE) se calcularon usando las siguientes ecuaciones fundamentales para los parámetros de efecto estérico  $R_S$ , parámetros de influencia inductiva en  $\sigma^*$ , carga parcial inductiva  $\Delta N$ , electronegatividad 'inductiva' de grupo  $\chi_G$  y análogos inductivos de dureza y suavidad química local ( $\eta_i$  y  $s_i$ ) y global ( $\eta_j$  y  $s_j$ ). Aquí,  $R$  es el radio atómico covalente,  $r$  - distancia interatómica,  $\chi$  - electronegatividad atómica. Las variables indexadas con el subíndice  $j$  describen la influencia de un único átomo sobre un grupo  $G$  de  $n$  átomos (normalmente el resto de la molécula N-atómica) mientras que los índices  $G$  designan cantidades de grupos (moleculares). El carácter lineal de las ecuaciones (1) - (6) hace que los descriptores inductivos sean fácilmente calculables y adecuados para bases de datos considerables y los posiciona como parámetros apropiados para modelos de QSAR a gran escala.

**Figura 9.** Propiedades físicas similares de los 4 cuartiles basados en la actividad predicha de péptidos. Panel A: Mediana de MIC, contra PAO1 de *P. aeruginosa*, de péptidos antimicrobianos conocidos de conjuntos de entrenamiento A y B (medidos) y la mediana de valores correspondientes a 25 péptidos experimentalmente probados separados en cuartiles de actividad. Paneles B-D: Mediana de valores de carga ( $Q$ ), hidrofobia ( $P$ ) y anfipaticidad/momento hidrófobo (MH).

**Figura 10.** Capacidad de los nuevos péptidos antimicrobianos HHC-10 y HHC-36 para proteger ratones contra infecciones por *Staph aureus*. Se muestran cargas bacterianas en el lavado peritoneal de ratones individuales después de 24 horas de la infección (círculos rellenos). A los animales muertos se les asignó la mayor cifra de unidades formadoras de colonias (UFC) obtenida en el experimento. La línea continua representa la media aritmética para cada grupo.

**Figura 11.** Ausencia de actividad hemolítica (a 375  $\mu\text{g/ml}$ ) de 20 péptidos antimicrobianos que demostraron actividad antibacteriana. Además de este modesto efecto a esta concentración muy alta no hubo actividad hemolítica a 100  $\mu\text{g/ml}$ .

**Figura 12.** Evaluación de la capacidad de los péptidos para suprimir la producción de  $\text{TNF}\alpha$  estimulada por LPS de *P. aeruginosa* (10  $\text{ng/ml}$ ) en células THP1. Los resultados representados son los valores medios para 4 pocillos realizados en 2 ocasiones separadas. La marca de número del eje x es la cantidad de cada péptido en  $\mu\text{g/ml}$  para los péptidos correspondientes.

**Figura 13.** Supresión de respuestas inflamatorias por péptidos. Células THP-1 adherentes similares a monocitos/macrófagos se estimularon con 10  $\text{ng/ml}$  de LPS de *P. aeruginosa* y se midió la respuesta de  $\text{TNF}\alpha$  resultante. Los péptidos se añadieron a 10, 20 y 50  $\mu\text{g/ml}$ . La liberación de  $\text{TNF}$  observada se midió por ELISA y se relacionó con el valor del 100 % de las células sin tratar (sin péptido).

**Figura 14.** Inducción de la liberación de IL8 por 7,5  $\times 10^5$  CMSP humanas en respuesta al tratamiento con 20 ó 100  $\mu\text{g/ml}$  de diferentes péptidos durante 24 horas.

**Figura 15.** Inducción de la liberación de MCP-1 por 7,5  $\times 10^5$  CMSP humanas en respuesta al tratamiento con 20 ó 100  $\mu\text{g/ml}$  de diferentes péptidos durante 24 horas.

**Figura 16.** Inducción de la liberación de MCP3 por 7,5  $\times 10^5$  CMSP humanas en respuesta al tratamiento con 20 ó 100  $\mu\text{g/ml}$  de diferentes péptidos durante 24 horas.

**Figura 17.** Inducción de la liberación de CXCL1 ( $\text{Gro-}\alpha$ ) por 7,5  $\times 10^5$  CMSP humanas en respuesta al tratamiento con 20 ó 100  $\mu\text{g/ml}$  de diferentes péptidos durante 24 horas.

**Figura 18.** Protección de ratones de infecciones por *S. aureus* por péptidos HH-2 y HH-18 en comparación con péptido de control negativo HH-17. Los ratones se trataron con 1,6  $\times 10^{10}$  UFC de *S. aureus* intraperitonealmente. Cuatro horas después de la infección recibieron una dosis de 8  $\text{mg/kg}$  de péptido IP. La infección se dejó progresar durante 4 ó 24 horas después de lo cual los ratones se sacrificaron y se determinaron los recuentos en placa de *Staphylococci* que sobreviven en el peritoneo. Se muestran las cargas bacterianas en el lavado peritoneal de ratones individuales después de 24 horas de infección (círculos rellenos). La línea continua representa la media aritmética para cada grupo.

**Figura 19.** Protección de ratones de infecciones por *S. aureus* por el péptido 1002. Los ratones se trataron con 1,6  $\times 10^{10}$  UFC de *S. aureus* intraperitonealmente. Cuatro horas después de la infección recibieron una dosis de 8  $\text{mg/kg}$  de péptido IP. La infección se dejó progresar durante 4 ó 24 horas después de lo cual los ratones se sacrificaron y se determinaron los recuentos en placa de *Staphylococci* que sobreviven en el peritoneo. Se muestran las cargas bacterianas en el lavado peritoneal de ratones individuales después de 24 horas de infección (círculos rellenos). La línea continua representa la media aritmética para cada grupo.

**Figura 20.** Actividades de 200 péptidos del conjunto de prueba de 100k. Q1: primeros del 1º cuartil; Q2: primeros del 2º Cuartil; Q3: últimos del 3º cuartil; Q4: últimos del 4º cuartil.  $\text{Cl}_{50\text{rel}}$  es la  $\text{Cl}_{50}$  relativa, la relación de la  $\text{Cl}_{50}$  para el péptido experimental con respecto a la  $\text{Cl}_{50}$  de Bac2A. Los péptidos en los que la mayor concentración dejó de reducir la luminiscencia al menos el 50 % se identificaron como inactivos.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

## A. INTRODUCCIÓN

- 5 La presente invención se basa en el descubrimiento de que ciertos péptidos originalmente identificados a partir de los péptidos antimicrobianos e inmunomoduladores catiónicos pequeños bactericina e indolicidina tienen actividad inmunomoduladora. Los péptidos de la invención comprenden las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 2, 1213, 1214, 1222, 1224, 1230, 1232, 1238 ó 12.
- 10 La invención proporciona además polinucleótidos que codifican los péptidos de la invención.
- Los péptidos de defensa del huésped catiónicos (también conocidos como péptidos antimicrobianos) son moléculas cruciales en la defensa del huésped contra la exposición a microbios patógenos. Sus efectos principales incluyen actividad antimicrobiana directa (Hancock, R.E.W., y R. Lehrer. 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. Trends in Biotechnology 16: 82-88) y una capacidad para modular la inmunidad innata (Hancock, R.E.W. y G. Diamond. 2000. The role of cationic peptides in innate host defenses. Trends in Microbiology 8:402-410; Hancock, R.E.W. 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. Lancet Infectious Diseases 1:156-164).
- 15 Los péptidos catiónicos de neutrófilos bovinos bactericina (también llamado dodecapéptido bovino) e indolicidina son discutiblemente los péptidos antimicrobianos que se producen naturalmente más pequeños. La bactericina (RLCRIVVIRVCR- NH<sub>2</sub>) se descubrió en neutrófilos bovinos por Romeo y colaboradores en 1988 (Romeo D, Skerlavaj B, Bolognesi M, Gennaro R. 1988. Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. J Biol Chem 263, 9573-5). La bactericina se estabiliza por un puente de disulfuro interno. Una variante lineal Bac2A (RLARIVVIRVAR-NH<sub>2</sub>) muestra una actividad similar contra bacterias Gram-negativas y un actividad mejorada contra bacterias Gram-positivas (Wu M, Hancock REW. 1999. Improved derivatives of bactericin, a cyclic dodecameric antimicrobial cationic peptide. Antimicrob Agents Chemother 43, 1274-6). El tridecapéptido catiónico amidado del extremo C indolicidina (ILPWKWPWWPWR-NH<sub>2</sub>, MW= 1906) se aisló originariamente de los grandes gránulos citoplásmicos de neutrófilos bovinos (Selsted, M. E., M. J. Novotny, W. L. Morris, Y. Q. Tang, W. Smith y J. S. Cullor. 1992. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. J Biol Chem 267:4292-4295). La indolicidina es activa contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, virus, patógenos fúngicos y protozoos (Ryge TS, Doisy X, Ifrah D, Olsen JE y Hansen PR. New indolicidin analogues with potent antibacterial activity. J Peptide Research 64:171-85, 2004). Tanto la indolicidina como Bac2A son conocidos por tener actividades inmunomoduladoras (Bowdish DM, Davidson DJ, Scott MG, Hancock REW. Immunomodulatory activities of small host defense peptides. Antimicrobial Agents Chemotherapy 49:1727-32, 2005). Tales características comunes, tamaño pequeño, linealidad y múltiples actividades hacen que estos péptidos sean los candidatos ideales para procedimientos de diseño cuasi-aleatorios tales como síntesis de péptidos SPOT sobre membranas de celulosa.
- 20 El campo de la quimioinformática implica la identificación asistida por ordenados de nuevas estructuras de guía y su optimización en candidatos a fármacos (Engel T. Basic Overview of Chemoinformatics. Journal of Chemical Information and Modelling, 46:2267 -2277, 2006). Uno de los enfoques quimioinformáticos más ampliamente usados se llama modelado de relación cuantitativa de estructura-actividad (QSAR) que busca relacionar las características estructurales de una molécula (conocidas como descriptores) con sus propiedades medibles, tales como la actividad biológica.
- 25 El análisis de QSAR encontró una amplia aplicación en el descubrimiento antimicrobiano. En la serie de estudios piloto, los presentes inventores también han utilizado una variedad de descriptores de QSAR en combinación con enfoques de inteligencia artificial para predecir satisfactoriamente actividad antimicrobiana de conjuntos limitados de moléculas orgánicas y péptidos catiónicos (Cherkasov A. 'Inductive' descriptors. 10 successful years in QSAR. Current Computer-Aided Drug Design 1:21-42, 2005; Karakoc E, Sahinalp SC y Cherkasov A. Comparative QSAR- and fragments distribution analysis of drugs, druglikes, metabolic substances, and antimicrobial compounds. Journal of Chemical Information and Modelling. 46, 2167-2182, 2006; Cherkasov A. Can 'bacterial-metabolite-likeness' model improve odds of 'in silico' antibiotic discovery? Journal of Chemical Information and Modelling, 46, 1214-1222, 2006).
- 30 Una visión general del procedimiento usado se presenta en la FIG. 1.
- 35 El procedimiento de síntesis de una matriz de péptidos en paralelo sobre hojas de celulosa se desarrolló por Ronald Frank en 1992 (Frank, R. Spot synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support Tetrahedron. 1992 48, 9217-9232). Esta técnica se llevó a cabo primero manualmente y se usó para la identificación de epitopes de anticuerpo. Ahora, con la ayuda de robots de pipeteado, hasta 8000 péptidos pueden sintetizarse sobre una hoja de celulosa (20 x 30 cm) (Kramer A, Keitel T, Winkler K, Stocklein W, Hohne W, Schneider-Mergener J. 1997. Molecular basis for the binding promiscuity of an anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody. Cell 91, 799-809). Hoy en día, las aplicaciones de esta tecnología incluyen caracterizar superficies de separación de homodímeros, seleccionar sitios de reconocimiento de cinasas, optimizar los inhibidores de proteasas y seleccionar sitios de unión de ADN de proteínas. Los presentes inventores adaptaron previamente esta metodología para crear un gran número de variantes mediante reordenamiento de secuencias,

truncaciones y modificaciones sistemáticas de secuencia de péptidos, y usaron una selección basada en luciferasa para investigar su capacidad para destruir *Pseudomonas aeruginosa* (Hilpert K, Volkmer-Engert R, Walter T, Hancock REW. High-throughput generation of small antibacterial peptides with improved activity. Nature Biotech 23:1008-1012, 2005). Esto les permitió a los inventores seleccionar cientos de péptidos 12-meros basándose en la secuencia del análogo bovino Bac2A y determinar sustituciones de aminoácidos óptimas, y usar combinaciones de sustituciones de aminoácidos para definir péptidos de tanto 8 como 12 aminoácidos de longitud que tenían excelente actividad antimicrobiana de amplio espectro.

Este procedimiento para la amplia selección representa un procedimiento rápido y eficaz para investigar la actividad de péptidos antimicrobianos. Permite una investigación sistemática y altamente detallada de los determinantes de la actividad de péptidos en péptidos muy pequeños. Previamente, intentos por hacer más pequeños los péptidos tendieron a crear moléculas con actividades modestas o con buenas actividades solo cuando se midieron en medio diluido. En los estudios descritos aquí, los presentes inventores han usado una combinación de reordenamiento de secuencias y sustituciones de un único aminoácido para crear una amplia gama de novedosos péptidos. Los presentes inventores también han examinado una gama de péptidos para actividad antiendotóxica y capacidad para inducir quimiocinas en células mononucleares de sangre periférica humanas (equivalente a actividad inmunomoduladora protectora) y demuestran que este procedimiento puede usarse para optimizar péptidos catiónicos 12-meros para estas propiedades. Entonces, esto indica que los péptidos tienen posibilidad de modular la inmunidad.

La presente divulgación adapta esta metodología para crear un gran número de variantes mediante reordenamiento de secuencias, truncaciones y modificaciones sistemáticas de secuencia de péptidos, y usa una selección basada en luciferasa para investigar su capacidad para destruir *Pseudomonas aeruginosa*. Este programa de amplia selección representa un procedimiento rápido y eficaz para investigar la actividad de péptidos antimicrobianos. Se ha permitido por primera vez una investigación sistemática y altamente detallada de los determinantes de la actividad de péptidos en péptidos muy pequeños. Intentos previos por hacer más pequeños los péptidos han tendido a crear moléculas con actividades modestas o con buenas actividades solo cuando se miden en medio diluido.

Los péptidos de la divulgación retienen actividades en los medios típicos usados para probar *in vitro* la actividad antibiótica, haciéndolos candidatos para uso terapéutico clínico. Además, algunos de los péptidos siguen siendo eficaces cuando se unen a hojas de celulosa, que indica que tienen enormes posibilidades de uso en dispositivos médicos de recubrimiento, que incluyen catéteres, para prevenir que sean colonizados con bacterias patógenas.

La divulgación proporciona varios procedimientos, reactivos y compuestos que pueden usarse para inhibir la infección o crecimiento microbiano. Debe entenderse que la presente invención no se limita a procedimientos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos particulares, que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir aspectos particulares solo, y no pretende ser limitante. Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contenido dicte claramente de otro modo. Así, por ejemplo, referencia a "un péptido" incluye una combinación de dos o más péptidos, y similares.

"Aproximadamente", como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende englobar variaciones de  $\pm 20\%$  o  $\pm 10\%$ , más preferentemente  $\pm 5\%$ , incluso más preferentemente  $\pm 1\%$ , y todavía más preferentemente  $\pm 0,1\%$  del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los procedimientos desvelados.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que se refiere la invención. Aunque cualquier procedimiento y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento pueda usarse en la práctica para probar la presente invención, los materiales y procedimientos preferidos se describen en el presente documento. En la descripción y reivindicaciones de la presente invención se usará la siguiente terminología.

"Antimicrobiano" como se usa en el presente documento significa que los péptidos de la presente divulgación inhiben, previenen o destruyen el crecimiento o proliferación de microbios tales como bacterias, hongos, virus, parásitos o similares. "Antiviral" como se usa en el presente documento significa que los péptidos de la presente invención inhiben, previenen o destruyen el crecimiento o proliferación de virus o de células viralmente infectadas. "Antitumoral" como se usa en el presente documento significa que los péptidos de la presente invención pueden usarse para inhibir el crecimiento de o destruir tumores. "Antifúngico" como se usa en el presente documento significa que los péptidos de la presente invención pueden usarse para inhibir el crecimiento de o destruir hongos. "Antiparásito" como se usa en el presente documento significa que los péptidos de la presente invención inhiben, previenen o destruyen el crecimiento o proliferación de cualquier organismo que viva a costa del organismo huésped.

"Potenciación selectiva de la inmunidad innata" como se usa en el presente documento significa que los péptidos de

la invención pueden regular por incremento, en células de mamífero, genes y moléculas que son componentes naturales de la respuesta inmunitaria innata y ayudar en la resolución de infecciones sin excesivo aumento de las citocinas pro-inflamatorias como  $TNF\alpha$  que puede producir inflamación posiblemente perjudicial y así estimular una reacción de septicemia en un sujeto. Los péptidos no estimulan una reacción séptica, pero estimulan la expresión de uno o más genes que codifican quimiocinas o interleucinas que atraen células inmunitarias que incluyen MCP-1, MCP-3, IL8 y CXCL-1. El péptido puede también poseer actividad anti-septicemia que incluye una capacidad para reducir la expresión de  $TNF\alpha$  en respuesta a ligandos bacterianos como LPS.

Los residuos de "aminoácidos" identificados en el presente documento están en la configuración L natural. De acuerdo con la nomenclatura de péptidos convencional, J. Biol. Chem., 243:3557-59 (1969), las abreviaturas para los residuos de aminoácidos son como se muestran en la siguiente tabla.

1-Letras	3-Letras	Amino ácido
Y	Tyr	L-tyrosine
G	Gly	L-glycine
F	Phe	L-phenylalanine
M	Met	L-methionine
A	Ala	L-alanine
s	Ser	L-serine
I	Ile	L-isoleucine
L	Leu	L-leucine
T	Thr	L-threonine
V	Val	L-valine
P	Pro	L-proline
K	Lys	L-lysine
H	His	L-Histidine
Q	Gln	L-Glutamine
E	Glu	L-Glutamic acid
W	Trp	L-tryptohan
R	Arg	L-arginine
D	Asp	L-aspartic acid
N	Asn	L-asparagine
C	Cys	L-cysteine

Debe observarse que todas las secuencias de residuos de aminoácido se representan en el presente documento por fórmulas cuya orientación de izquierda a derecha está en la dirección convencional del extremo amino al extremo carboxi.

## B. PÉPTIDOS

La invención proporciona un péptido aislado con actividad inmunomoduladora. Los péptidos de la invención tienen una secuencia de aminoácidos que comprende SEC ID N°: 2, 1213, 1214, 1222, 1224, 1230, 1232, 1238 ó 12 en la que los péptidos tienen actividad inmunomoduladora.

"Aislado" cuando se usa en referencia a un péptido se refiere a un péptido sustancialmente libre de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, por ejemplo, con los que podría estar naturalmente asociado. Aquellos expertos en la materia pueden hacer sustituciones similares para lograr péptidos con mayor actividad antimicrobiana y una variedad de huésped más amplia.

Todos los péptidos se sintetizaron usando L-aminoácidos, sin embargo, todas las formas D de los péptidos pueden producirse sintéticamente. Además, pueden producirse derivados del extremo C, tales como ésteres metílicos del

extremo C y amidatos del extremo C, con el fin de aumentar la actividad antimicrobiana de un péptido de la invención. El péptido puede sintetizarse de forma que la secuencia se invierta, por lo que el último aminoácido en la secuencia se convierte en el primer aminoácido y el penúltimo aminoácido se convierte en el segundo aminoácido, etc. Es muy conocido que tales péptidos invertidos normalmente tengan actividades antimicrobianas similares a la secuencia original.

Los análogos de péptidos se diseñan generalmente y se producen por modificaciones químicas de un péptido guía, que incluye, por ejemplo, cualquiera de los péptidos particulares descritos en el presente documento, tal como cualquiera de las siguientes secuencias desveladas en las tablas. La presente divulgación establece claramente que estos péptidos en su totalidad y los derivados creados modificando cualquier cadena lateral de los aminoácidos constituyentes tienen la capacidad para inhibir, prevenir o destruir el crecimiento o proliferación de microbios tales como bacterias, hongos, virus, parásitos o similares. La presente invención engloba adicionalmente polipéptidos de hasta aproximadamente 50 aminoácidos de longitud que incluyen las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento.

En otro aspecto, un péptido es un pseudopéptido. Pseudopéptidos o sustitutos de enlaces amida se refiere a péptidos que contienen modificaciones químicas de algunos (o todos) los enlaces peptídicos. La introducción de sustitutos de enlaces amida no solo disminuye la degradación de péptidos, sino que también puede modificar significativamente algunas de las propiedades bioquímicas de los péptidos, particularmente la flexibilidad conformacional e hidrofobia.

Para mejorar o alterar las características de los polipéptidos puede emplearse ingeniería de proteínas. La tecnología de ADN recombinante conocida para aquellos expertos en la materia puede usarse para crear novedosas proteínas mutantes o muteínas que incluyen sustituciones únicas o múltiples sustituciones de aminoácidos, deleciones, adiciones o proteínas de fusión. Tales polipéptidos modificados pueden mostrar, por ejemplo, elevada/reducida actividad biológica o elevada/reducida estabilidad. Además, pueden purificarse con mayores rendimientos y muestran mejor solubilidad que el polipéptido natural correspondiente, al menos bajo ciertas condiciones de purificación y almacenamiento. Además, los polipéptidos de la presente invención pueden producirse como multímeros que incluyen dímeros, trímeros y tetrameros. La multimerización puede facilitarse por ligadores, introducción de cisteínas para permitir la creación de enlaces disulfuro entre cadenas o recombinantemente mediante polipéptidos heterólogos tales como regiones Fc.

Se conoce en la técnica que uno o más aminoácidos pueden deleccionarse del extremo N o extremo C sin pérdida sustancial de la función biológica. Véase, por ejemplo, Ron y col., *Biol Chem.*, 268: 2984-2988. 1993. Similarmente, se conocen muchos ejemplos de mutantes de deleción del extremo C biológicamente funcionales (véase, por ejemplo, Dobeli y col., 1988).

Se desvelan otros mutantes, además de formas de deleción del extremo N y C de la proteína tratada anteriormente. Así, la divulgación incluye adicionalmente variaciones de los polipéptidos que muestran actividad sustancial de polipéptidos de chaperonas. Tales mutantes incluyen deleciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones seleccionadas según reglas generales conocidas en la técnica de manera que tengan poco efecto sobre la actividad.

Hay dos enfoques principales para estudiar la tolerancia de una secuencia de aminoácidos al cambio, véase Bowie y col., *Science*, 247: 1306-1310, 1994. El primer procedimiento se basa en el procedimiento de evolución, en el que las mutaciones tanto son aceptadas como rechazadas por selección natural. El segundo enfoque usa ingeniería genética para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de un gen clonado y selecciones o cribados para identificar secuencias que mantienen la funcionalidad. Estos estudios han revelado que las proteínas son sorprendentemente tolerantes de sustituciones de aminoácidos.

Normalmente consideradas como sustituciones conservativas son las sustituciones, uno por otro, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu y Phe; el intercambio de los residuos de hidroxilo Ser y Thr, el intercambio de los residuos ácidos Asp y Glu, la sustitución entre los residuos de amida Asn y Gln, el intercambio de los residuos básicos Lys y Arg y sustituciones entre los residuos aromáticos Phe, Tyr. Así, el polipéptido puede ser, por ejemplo: (i) uno en el que uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo de aminoácido conservado) y tal residuo de aminoácido sustituido puede o puede no ser uno codificado por el código genético; o (ii) uno en el que uno o más de los residuos de aminoácidos incluye un grupo sustituyente; o (iii) uno en el que el polipéptido está fusionado con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol); o (iv) uno en el que los aminoácidos adicionales están fusionados con la anterior forma del polipéptido, tal como un péptido de la región de fusión Fc de IgG o secuencia conductora o secretora o una secuencia que se emplea para la purificación de la forma anterior del polipéptido o una secuencia de pro-proteínas.

Así, los polipéptidos pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones, tanto de mutaciones naturales como manipulación humana. Como se indica, los cambios son preferentemente de una naturaleza menor, tal como sustituciones de aminoácidos conservativas que no afectan significativamente el

plegamiento o actividad de la proteína. Los siguientes grupos de aminoácidos representan cambios equivalentes: (1) Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr; (2) Cys, Ser, Tyr, Thr; (3) Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe; (4) Lys, Arg, His; (5) Phe, Tyr, Trp, His.

5 Además, los polipéptidos pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos que imitan aminoácidos modificados. Un ejemplo de este tipo de sustitución incluye sustituir aminoácidos que pueden fosforilarse (por ejemplo, serina, treonina o tirosina) con un aminoácido negativamente cargado que se parece a la carga negativa del aminoácido fosforilado (por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico). También se incluye la sustitución de aminoácidos que pueden estar modificados por grupos hidrófobos (por ejemplo, arginina) con aminoácidos que  
10 llevan cadenas laterales hidrófobas voluminosas, tales como triptófano o fenilalanina.

### C. PÉPTIDOS, VARIANTES DE PÉPTIDOS Y PEPTIDOMIMÉTICOS

15 “Polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido que se produce naturalmente correspondiente, además de polímeros de aminoácidos que se producen naturalmente y polímeros de aminoácidos que no se producen naturalmente. Miméticos de aminoácido se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de un modo similar a un  
20 aminoácido que se produce naturalmente. Los residuos naturales se han descrito bien en la bibliografía científica y de patentes; algunas composiciones no naturales a modo de ejemplo útiles como miméticos de residuos de aminoácidos naturales y pautas se describen más adelante. Los miméticos de aminoácidos aromáticos pueden generarse reemplazando por, por ejemplo, D- o L-naftilalanina; D- o L-fenilglicina; D- o L-2 tienoilalanina; D- o L-1, -2,3- o 4-pirenoilalanina; D- o L-3 tienoilalanina; D- o L-(2-piridinil)-alanina; D- o L-(3-piridinil)-alanina; D- o L-(2-pirazinil)-alanina; D- o L-(4-isopropil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilalanina; D-p-fluoro-fenilalanina; D- o L-p-bifenilfenilalanina; K- o L-p-metoxi-bifenilfenilalanina; D- o L-2-indol(alquil)alaninas; y D- o L-alquilalaninas, en los que alquilo puede ser metilo, etilo, propilo, hexilo, butilo, pentilo, isopropilo, isobutilo, sec-isotilo, iso-pentilo sustituido o sin sustituir o un aminoácido no ácido. Anillos aromáticos de un aminoácido no natural incluyen, por ejemplo, anillos aromáticos de tiazolilo, tiofenilo, pirazolilo, bencimidazolilo, naftilo, furanilo, pirrolilo y  
25 piridilo (véase, por tanto, la tabla titulada “Aminoácidos no naturales” en el apéndice más adelante).

30 “Péptido” como se usa en el presente documento incluye péptidos que son variaciones conservativas de aquellos péptidos específicamente ejemplificados en el presente documento. “Variación conservativa” como se usa en el presente documento indica la sustitución de un residuo de aminoácido con otro residuo biológicamente similar. Ejemplos de variaciones conservativas incluyen, pero no se limitan a, la sustitución de un residuo hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina, alanina, cisteína, glicina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina, norleucina o metionina con otro, o la sustitución de un residuo polar con otro, tal como la sustitución de arginina con lisina, ácidos glutámico con aspártico, o glutamina con asparagina, y similares. Aminoácidos hidrófilos neutros que pueden estar sustituidos con otros incluyen asparagina, glutamina, serina y treonina. El término “variación conservativa” también incluye el  
35 uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental sin sustituir a condición de que los anticuerpos producidos contra el polipéptido sustituido también inmunoreaccionen con el polipéptido sin sustituir. Tales sustituciones conservativas están dentro de la definición de las clases de los péptidos de la invención. “Catiónico” como se usa se refiere a cualquier péptido que posea suficientes aminoácidos positivamente cargados para tener un pI (punto isoeléctrico) superior a aproximadamente 9,0.

40 La actividad biológica de los péptidos puede determinarse mediante procedimientos convencionales conocidos para aquellos expertos en la materia, tales como el ensayo de “concentración inhibidora mínima (CIM)” descrito en los presentes ejemplos, por lo que la menor concentración a la que no se observa cambio en la DO durante un periodo de tiempo dado se registra como CIM.

45 La actividad biológica de los péptidos puede determinarse mediante procedimientos convencionales conocidos para aquellos expertos en la materia, tales como el ensayo de “concentración inhibidora mínima (CIM)” descrito en los presentes ejemplos, por lo que la menor concentración a la que no se observa cambio en la DO durante un periodo de tiempo dado se registra como CIM.

50 Los péptidos y polipéptidos de la divulgación, como se han definido anteriormente, incluyen todas las formas de “mimético” y “peptidomimético”. Los términos “mimético” y “peptidomimético” se refieren a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y/o funcionales de los polipéptidos de la divulgación. El mimético puede estar tanto enteramente compuesto de análogos de aminoácidos sintéticos no naturales como ser una molécula quimérica de aminoácidos de péptido parcialmente naturales y análogos  
55 parcialmente no naturales de aminoácidos. El mimético también puede incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservativas de aminoácidos naturales en tanto que tales sustituciones tampoco alteren sustancialmente la estructura y/o actividad del mimético. Al igual que con los polipéptidos de la divulgación que son variantes conservativas, la experimentación rutinaria determinará si un mimético está o no sustancialmente alterado en estructura y/o función. Así, una composición de mimético es cuando se administra a o se expresa en una célula, por ejemplo, un fragmento de polipéptido de una proteína antimicrobiana que tiene actividad antimicrobiana.

60 Las composiciones de miméticos de polipéptidos pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales, que son normalmente de tres grupos estructurales: a) grupos de enlace de residuos distintos de los enlaces de enlace amida natural (“enlace peptídico”); b) residuos no naturales en lugar de residuos de aminoácidos que se producen naturalmente; o c) residuos que inducen imitación estructural secundaria, es decir,

para inducir o estabilizar una estructura secundaria, por ejemplo, un giro beta, giro gamma, beta hoja, conformación de hélice alfa y similares. Por ejemplo, un polipéptido puede caracterizarse como un mimético cuando todos o algunos de sus residuos se una por medios químicos distintos de enlaces peptídicos naturales. Los residuos de peptidomiméticos individuales pueden unirse por enlaces peptídicos, otros enlaces químicos o medios de acoplamiento tales como, por ejemplo, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimidias bifuncionales, N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) o N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC). Los grupos de enlace que pueden ser una alternativa a los enlaces de enlace de amida tradicional ("enlace peptídico") incluyen, por ejemplo, cetometileno (por ejemplo,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-$  para  $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ), aminometileno ( $\text{CH}_2-\text{NH}$ ), etileno, olefina ( $\text{CH}=\text{CH}$ ), éter ( $\text{CH}_2-\text{O}$ ), tioéter ( $\text{CH}_2-\text{S}$ ), tetrazol ( $\text{CN}_4--$ ), tiazol, retroamida, tioamida o éster (véase, por ejemplo, Spatola (1983) en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, vol. 7, pág. 267-357, "Peptide Backbone Modifications", Marcell Dekker, NY).

Pueden generarse miméticos de aminoácidos ácidos por sustitución con, por ejemplo, aminoácidos de no carboxilato mientras que se mantenga una carga negativa; (fosfona)alanina; treonina sulfatada. Grupos laterales de carboxilo (por ejemplo, aspartilo o glutamilo) también pueden modificarse selectivamente mediante reacción con carbodiimidias ( $\text{R}'-\text{N}-\text{C}-\text{N}-\text{R}'$ ) tales como, por ejemplo, 1-ciclohexil-3[2-morfolin-il-(4-etil)]carbodiimida o 1-etil-3(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. También puede convertirse aspartilo o glutamilo en residuos asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones amonio.

Pueden generarse miméticos de aminoácidos básicos por sustitución con, por ejemplo, (además de lisina y arginina) los aminoácidos ornitina o citrulina. Los residuos asparaginilo y glutaminilo pueden desaminarse a los residuos de aspartilo o glutamilo correspondientes.

Pueden generarse miméticos de residuos de arginina haciendo reaccionar arginilo con, por ejemplo, uno o más reactivos convencionales que incluyen, por ejemplo, fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona o ninhidrina, preferentemente bajo condiciones alcalinas. Pueden generarse miméticos de residuos de tirosina haciendo reaccionar tirosilo con, por ejemplo, compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Pueden usarse N-acetilimidizol y tetranitrometano para formar especies de O-acetiltirosilo y derivados de 3-nitro, respectivamente. Pueden generarse miméticos de residuos de cisteína haciendo reaccionar residuos de cisteinilo con, por ejemplo, alfa-haloacetatos tales como ácido 2-cloroacético o cloroacetamida y aminas correspondientes; dando derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. También pueden generarse miméticos de residuos de cisteína haciendo reaccionar residuos de cisteinilo con, por ejemplo, bromo-trifluoroacetona, ácido alfa-bromo-beta-(5-imidazolil)propiónico; fosfato de cloroacetilo, N-alkilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo; 2-piridildisulfuro de metilo; p-cloromercuribenzoato; 2-cloromercuri-4-nitrofenol; o cloro-7-nitrobenzo-oxa-1,3-diazol. Pueden generarse miméticos de lisina (y pueden alterarse residuos del extremo amino) haciendo reaccionar lisinilo con, por ejemplo, anhídridos de ácido succínico u otros ácidos carboxílicos. También pueden generarse miméticos de residuos de lisina y otros residuos que contienen alfa-amino mediante reacción con imidoésteres tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruo, ácido trinitrobencenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona y reacciones catalizadas con transamidasa con glioxilato. Pueden generarse miméticos de metionina mediante reacción con, por ejemplo, sulfóxido de metionina. Pueden generarse miméticos de residuos de histidina haciendo reaccionar histidilo con, por ejemplo, dietilprocarbonato o bromuro de para-bromofenacilo. Otros miméticos incluyen, por ejemplo, aquellos generados por hidroxilación de lisina; fosforilación de los grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo; metilación de los grupos alfa-amino de lisina, arginina e histidina; acetilación de la amina del extremo N; metilación de residuos de amida de la cadena principal o sustitución con N-metilaminoácidos; o amidación de grupos carboxilo del extremo C.

Un componente de un polipéptido también puede sustituirse con un aminoácido (o residuo de peptidomimético) de la quiralidad opuesta. Así, cualquier aminoácido que se produzca naturalmente en la configuración L (que también puede denominarse R o S, dependiendo de la estructura de la entidad química) puede sustituirse con el aminoácido del mismo tipo estructural químico o un peptidomimético, pero de la quiralidad opuesta, denominado el D-aminoácido, pero que puede denominarse adicionalmente la forma R o S.

La divulgación también proporciona polipéptidos que son "sustancialmente idénticos" a un polipéptido a modo de ejemplo. Una secuencia de aminoácidos "sustancialmente idéntica" es una secuencia que se diferencia de una secuencia de referencia por una o más sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, deleciones o inserciones, particularmente cuando una sustitución tal se produce en un sitio que no es el sitio activo de la molécula, y a condición de que el polipéptido retenga esencialmente sus propiedades funcionales. Una sustitución de aminoácidos conservativa, por ejemplo, sustituye un aminoácido con otro de la misma clase (por ejemplo, sustitución de un aminoácido hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina, con otro, o sustitución de un aminoácido polar con otro, tal como sustitución de arginina con lisina, ácido glutámico con ácido aspártico o glutamina con asparagina). Uno o más aminoácidos pueden deleccionarse, por ejemplo, de un polipéptido antimicrobiano que tiene actividad antimicrobiana de la invención, produciendo la modificación de la estructura del polipéptido, sin alterar significativamente su actividad biológica. Por ejemplo, pueden eliminarse aminoácidos del extremo amino o carboxilo, o internos, que no se requieren para la actividad antimicrobiana.

El experto reconocerá que los residuos y polipéptidos sintéticos individuales que incorporan estos miméticos pueden

5 sintetizarse usando una variedad de procedimientos y metodologías, que se describen bien en la bibliografía científica y de patentes, por ejemplo, Organic Syntheses Collective Volumes, Gilman y col. (Eds) John Wiley & Sons, Inc., NY. Los péptidos y peptidomiméticos de la invención también pueden sintetizarse usando metodologías combinatorias. Diversas técnicas para la generación de bibliotecas de péptidos y de peptidomiméticos son muy conocidas e incluyen, por ejemplo, técnicas MultiPin, bolsa de té y Split-couple-mix; véase, por ejemplo, al-Obeidi, Mol. Biotechnol. 9: 205-223, 1998; Hruby, Curr. Opin. Chem. Biol. 1: 114-119, 1997; Ostergaard, Mol. Divers. 3: 17-27, 1997; Ostresh, Methods Enzymol. 267: 220-234, 1996. Los péptidos modificados de la invención pueden producirse adicionalmente por procedimientos químicos de modificación, véase, por ejemplo, Belousov, Nucleic Acids Res. 25: 3440-3444, 1997; Frenkel, Free Radic. Biol. Med. 19: 373-380, 1995; Blommers, Biochemistry 33: 7886-7896, 1994.

15 Los polipéptidos y péptidos de la invención pueden aislarse de fuentes naturales, ser sintéticos o ser polipéptidos recombinantemente generados. Los péptidos y proteínas pueden expresarse recombinantemente *in vitro* o *in vivo*. Los péptidos y polipéptidos de la invención pueden prepararse y aislarse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. El polipéptido y péptidos de la invención también pueden sintetizarse, completos o en parte, usando procedimientos químicos muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Caruthers, Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 215-223, 1980; Horn, Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 225-232, 1980; Banga, Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems Technomic Publishing Co., Lancaster, PA, 1995. Por ejemplo, la síntesis de péptidos puede realizarse usando diversas técnicas en fase sólida (véase, por ejemplo, Roberge, Science 269: 202, 1995; Merrifield, Methods Enzymol. 289: 3-13, 1997) y puede lograrse síntesis automatizada, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos ABI 431A (Perkin Elmer) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

25 Los péptidos de la invención pueden sintetizarse por tales procedimientos comúnmente usados como protección de t-BOC o FMOC de grupos alfa-amino. Ambos procedimientos implican síntesis escalonadas por las cuales un único aminoácido se añade en cada etapa a partir del extremo C del péptido (véase, Coligan y col., Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, 1991, Unidad 9). Los péptidos de la invención también pueden sintetizarse por los muy conocidos procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida descritos en Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149, (1962), y Stewart y Young, Solid Phase Peptides Synthesis (Freeman, San Francisco, 1969, pág. 27-62), usando un copoli(estireno-divinilbenceno) que contiene 0,1-1,0 mmoles de aminos/g de polímero. Al completarse la síntesis química, los péptidos pueden desprotegerse y escindirarse del polímero mediante tratamiento con HF líquido-10 % de anisol durante aproximadamente 1/4-1 horas a 0 °C. Después de la evaporación de los reactivos, los péptidos se extraen del polímero con disolución al 1 % de ácido acético que luego se liofiliza dando el material en bruto. Esto puede normalmente purificarse por técnicas tales como filtración en gel sobre Sephadex G-15 usando 5 % de ácido acético como disolvente. La liofilización de fracciones apropiadas de la columna dará el péptido homogéneo o derivados de péptido, que pueden luego caracterizarse por técnicas convencionales tales como análisis de aminoácidos, cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alta resolución, espectroscopía de absorción ultravioleta, rotación molar, solubilidad y cuantificarse por degradación de Edman en fase sólida.

40 Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos (es decir, aproximadamente el 60 % de identidad, preferentemente el 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, el 99 %, o mayor identidad con respecto a una región especificada (por ejemplo, secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo descrito en el presente documento o secuencia de aminoácidos de un anticuerpo descrito en el presente documento), cuando se compara y alinea para la máxima correspondencia con respecto a una ventana de comparación o región designada) como se mide usando algoritmos de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con parámetros por defecto descritos más adelante, o por alineamiento manual e inspección visual. Entonces se dice que tales secuencias son "sustancialmente idénticas". Este término también se refiere a, o puede aplicarse a, el cumplimiento de una secuencia de prueba. El término también incluye secuencias que tienen deleciones y/o adiciones, además de aquellas que tienen sustituciones. Como se describe más adelante, los algoritmos preferidos pueden explicar huecos y similares. Preferentemente, existe identidad con respecto a una región que tiene al menos aproximadamente 25 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o más preferentemente con respecto a una región que tiene 50-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud.

55 Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa de secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Si se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se entran en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan parámetros de programa del algoritmo de secuencias. Preferentemente pueden usarse parámetros de programa por defecto, o pueden designarse parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa.

65 Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, incluye referencia a un segmento de uno cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionado del grupo que consiste en de 20 a 600, normalmente aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más normalmente aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en

las que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de alinearse óptimamente las dos secuencias. Los procedimientos de alineamiento de secuencias para la comparación son muy conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981, por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970, por la búsqueda del procedimiento de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444, 1988, por implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel y col., eds. 1995, suplemento.

Los programas para buscar alineamientos son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, BLAST y similares. Por ejemplo, si la especie diana es humana, una fuente de tales secuencias de aminoácidos o secuencias de genes (secuencias de anticuerpos de la línea germinal o reorganizados) puede encontrarse en cualquier base de datos de referencia adecuada tal como Genbank, la base de datos de proteínas NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), VBASE, una base de datos de genes de anticuerpos humanos (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc>) y la base de datos de Kabat de inmunoglobulinas (<http://www.immuno.bme.nwu.edu>) o traducirse en productos de las mismas. Si los alineamientos se hacen basándose en las secuencias de nucleótidos, entonces los genes seleccionados deben analizarse para determinar qué genes de ese subconjunto tienen la homología de aminoácidos más próxima al anticuerpo de la especie de origen. Se contempla que las secuencias de aminoácidos o secuencias de genes que se aproximan a una homología de mayor grado con respecto a otras secuencias en la base de datos puedan utilizarse y manipularse según los procedimientos descritos en el presente documento. Además, pueden utilizarse secuencias de aminoácidos o genes que tienen menor homología cuando codifiquen productos que, cuando se manipulan y seleccionan según los procedimientos descritos en el presente documento, presentan especificidad por el antígeno diana predeterminado. En ciertos aspectos, un intervalo aceptable de homología es superior a aproximadamente el 50 %. Debe entenderse que las especies diana pueden ser distintas de humanas.

Un ejemplo preferido de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y col., *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402, 1997, y Altschul y col., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, 1990, respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 se usan, con los parámetros descritos en el presente documento, para determinar el porcentaje de identidad de secuencias para los ácidos nucleicos y proteínas de la invención. El software para realizar los análisis de BLAST está públicamente disponible por el Centro nacional de información de biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud  $W$  en la secuencia de búsqueda, que tanto se coinciden con como satisfacen alguna puntuación de valor umbral positiva  $T$  cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos.  $T$  se denomina el umbral de puntuación de palabra vecina. Estas palabras comunes vecinas iniciales actúan de semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largas que las contienen. Las palabras comunes se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en la medida en que la puntuación de alineamiento acumulado pueda aumentarse. Las puntuaciones acumuladas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros  $M$  (puntuación de recompensa para un par de residuos de apareamiento; siempre  $> 0$ ) y  $N$  (puntuación de penalización para residuos de desapareamiento; siempre  $< 0$ ). Para secuencias de aminoácidos, una matriz de puntuación se usa para calcular la puntuación acumulada. La extensión de las palabras comunes en cada dirección se mantiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulado se diferencia la cantidad  $X$  de su máximo valor alcanzado; la puntuación acumulada tiende a cero o por debajo debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el fin de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST  $W$ ,  $T$  y  $X$  determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra ( $W$ ) de 11, una esperanza ( $E$ ) de 10,  $M=5$ ,  $N=-4$  y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3 y esperanza ( $E$ ) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915, 1989), alineamientos ( $B$ ) de 50, esperanza ( $E$ ) de 10,  $M=5$ ,  $N=-4$ , y una comparación de ambas cadenas.

#### D. POLIPÉPTIDOS Y VARIANTES FUNCIONALES DE LOS MISMOS

"Polipéptido" incluye proteínas, proteínas de fusión, oligopéptidos y derivados de polipéptidos, con la excepción de que se considera que los peptidomiméticos son moléculas pequeñas en el presente documento.

Una "proteína" es una molécula que tiene una secuencia de aminoácidos que están ligados entre sí en una molécula lineal por enlaces peptídicos. El término proteína se refiere a un polipéptido que se aísla de una fuente natural, o se produce a partir de un ADNc aislado usando tecnología de ADN recombinante; y tiene una secuencia de aminoácidos que tienen una longitud de al menos aproximadamente 200 aminoácidos.

Una "proteína de fusión" es un tipo de proteína recombinante que tiene una secuencia de aminoácidos que resulta del enlace de las secuencias de aminoácidos de dos o más polipéptidos normalmente separados.

Un "fragmento de proteína" es un fragmento proteolítico de un polipéptido mayor que puede ser una proteína o una

proteína de fusión. Un fragmento proteolítico puede prepararse por escisión proteolítica *in vivo* o *in vitro* de un polipéptido mayor, y es generalmente demasiado largo para prepararse por síntesis química. Los fragmentos proteolíticos tienen secuencias de aminoácidos que tienen una longitud de aproximadamente 200 a aproximadamente 1.000 aminoácidos.

5 Un “oligopéptido” o “péptido” es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos corta (es decir, 2 a aproximadamente 200 aminoácidos). Un oligopéptido se prepara generalmente por síntesis química.

10 Aunque los oligopéptidos y fragmentos de proteínas pueden prepararse de otro modo, es posible usar tecnología de ADN recombinante y/o manipulaciones bioquímicas *in vitro*. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos puede prepararse y usarse como molde para las reacciones de transcripción/traducción *in vitro*. En tales reacciones, un ácido nucleico exógeno que codifica un polipéptido preseleccionado se introduce en una mezcla que está esencialmente agotada en ácidos nucleicos exógenos que contiene todos los componentes celulares requeridos para la transcripción y traducción. Uno o más aminoácidos radiomarcados se añaden antes o con el ADN exógeno, y se deja que progrese la transcripción y traducción. Debido a que el único ácido nucleico presente en la mezcla de reacción es el ácido nucleico exógeno añadido a la reacción, solo los polipéptidos así codificados se producen, e incorporan el (los) aminoácido(s) radiomarcado(s). De este modo, los polipéptidos codificados por un ácido nucleico exógeno preseleccionado se radiomarcán. Aunque otras proteínas están presentes en la mezcla de reacción, el polipéptido preseleccionado es el único que se produce en presencia de los aminoácidos radiomarcados y así se marca únicamente.

20 Como se explica en detalle más adelante, los “derivados de polipéptidos” incluyen, sin limitación, polipéptidos mutantes, polipéptidos químicamente modificados y peptidomiméticos.

25 Los polipéptidos de la presente invención pueden prepararse generalmente siguiendo técnicas conocidas. Preferentemente, la producción sintética del polipéptido de la invención puede ser según el procedimiento sintético en fase sólida. Por ejemplo, la síntesis en fase sólida está bien entendida y es un procedimiento común para la preparación de polipéptidos, ya que son una variedad de modificaciones de esa técnica. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149, 1964; Stewart y Young, Solid Phase Polypeptide Synthesis, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., 1984; Bodanszky and Bodanszky, The Practice of Polypeptide Synthesis, Springer-Verlag, New York, 1984; Atherton y Sheppard, Solid Phase Polypeptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, New York, 1989. Véanse, por tanto, el procedimiento específico descrito en el Ejemplo 1 más adelante.

35 Alternativamente, los polipéptidos de la presente invención pueden prepararse en sistemas recombinantes usando secuencias de polinucleótidos que codifican los polipéptidos.

Una “variante” o “variante funcional” de un polipéptido es un compuesto que no es, por definición, un polipéptido, es decir, contiene al menos un enlace químico que no es un enlace peptídico. Así, los derivados de polipéptidos incluyen sin limitación proteínas que experimentan naturalmente modificaciones post-traduccionales tales como, por ejemplo, glicosilación. Se entiende que un polipéptido de la invención puede contener más de una de las siguientes modificaciones dentro del mismo polipéptido. Los derivados de polipéptidos preferidos retienen un atributo deseable, que puede ser la actividad biológica; más preferentemente, un polipéptido derivado se potencia con respecto a uno o más atributos deseables, o tiene uno o más atributos deseables no encontrados en el polipéptido parental. Aunque se describen en esta sección, los peptidomiméticos se consideran moléculas pequeñas en la presente divulgación.

45 Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la encontrada en una proteína preparada a partir de una fuente natural es un polipéptido “natural”. Las variantes funcionales de polipéptidos pueden prepararse por síntesis química, que incluye, sin limitación síntesis combinatoria.

50 Pueden prepararse variantes funcionales de polipéptidos mayores que los oligopéptidos usando tecnología de ADN recombinante alterando la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico que codifica un polipéptido. Aunque algunas alteraciones en la secuencia de nucleótidos no alterarán la secuencia de aminoácidos del polipéptido así codificado (mutaciones “silenciosas”), muchas producirán un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos alterada que está alterada con respecto a la secuencia parental. Tales secuencias de aminoácidos alteradas pueden comprender sustituciones, deleciones y adiciones de aminoácidos, con la condición de que tales aminoácidos sean aminoácidos que se producen naturalmente.

60 Así, el someter un ácido nucleico que codifica un polipéptido a mutagénesis es una técnica que puede usarse para preparar variantes funcionales de polipéptidos, particularmente aquellas que tienen sustituciones de aminoácidos pero no deleciones o inserciones de los mismos. Se conoce una variedad de técnicas mutagénicas que pueden usarse *in vitro* o *in vivo* que incluyen, sin limitación, mutagénesis química y mutagénesis mediada por PCR. Tal mutagénesis puede elegirse aleatoriamente como diana (es decir, pueden producirse mutaciones en cualquier parte dentro del ácido nucleico) o dirigirse a una sección del ácido nucleico que codifica un estiramiento de aminoácidos de particular interés. Usando tales técnicas es posible preparar bibliotecas de compuestos aleatorizadas, combinatorias o dirigidas, conjuntos y mezclas.

65 Los polipéptidos que tienen deleciones o inserciones de aminoácidos que se producen naturalmente pueden ser

oligopéptidos sintéticos que resultan de la síntesis química de secuencias de aminoácidos que se basan en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido parental, pero que tienen uno o más aminoácidos insertados o delecionados con respecto a la secuencia del polipéptido parental. Las inserciones y deleciones de residuos de aminoácidos en polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos más largas pueden prepararse por mutagénesis dirigida.

Como se contempla por la presente invención, "polipéptido" incluye aquellos que tienen una o más modificaciones químicas con respecto a otro polipéptido, es decir, polipéptidos químicamente modificados. El polipéptido del que se deriva un polipéptido químicamente modificado puede ser una proteína natural, una proteína de variante funcional o un polipéptido de variante funcional, o fragmentos de polipéptidos de los mismos; un anticuerpo u otro ligando de polipéptido según la invención que incluye, sin limitación, anticuerpos monocatenarios, proteínas cristalinas y derivados de polipéptidos de las mismas; o ligandos de polipéptido preparados según la divulgación. Preferentemente, la(s) modificación (modificaciones) química(s) confiere(n) o mejora(n) atributos deseables del polipéptido, pero sustancialmente no alteran o comprometen la actividad biológica del mismo. Atributos deseables incluyen, pero están limitados a, elevada estabilidad en almacén; estabilidad en suero potenciada u otra estabilidad *in vivo*; resistencia a proteasas; y similares. Tales modificaciones incluyen, a modo de ejemplo no limitante, acetilación, glicosilación y biotilación del extremo N.

Un enfoque eficaz para conferir resistencia a peptidasas que actúan sobre los residuos del extremo N o extremo C de un polipéptido es añadir grupos químicos en los extremos del polipéptido, de forma que el polipéptido modificado no sea más largo que un sustrato para la peptidasa. Una modificación química tal es la glicosilación de los polipéptidos en cualquiera o ambos extremos. Se ha mostrado que ciertas modificaciones químicas, en particular la glicosilación del extremo N, aumentan la estabilidad de los polipéptidos en suero humano (Powell y col., *Pharma. Res.* 10: 1268-1273, 1993). Otras modificaciones químicas que potencian la estabilidad en suero incluyen, pero no se limitan a, la adición de un grupo alquilo del extremo N, que consiste en un alquilo inferior de 1 a 20 carbonos, tal como un grupo acetilo, y/o la adición de una amida del extremo C o grupo amida sustituido.

La presencia de un D-aminoácido del extremo N aumenta la estabilidad en suero de un polipéptido que de otro modo contiene L-aminoácidos, debido a que las exopeptidasas que actúan sobre el residuo del extremo N no pueden utilizar un D-aminoácido como sustrato. Similarmente, la presencia de un D-aminoácido del extremo C también estabiliza un polipéptido, debido a que las exopeptidasas en suero que actúan sobre el residuo del extremo C no pueden utilizar un D-aminoácido como sustrato. Con la excepción de estas modificaciones de los extremos, las secuencias de aminoácidos de polipéptidos con D-aminoácidos del extremo N y/o extremo C son normalmente idénticas a las secuencias del polipéptido de L-aminoácidos parental.

La sustitución de aminoácidos no naturales con aminoácidos naturales en una subsecuencia de un polipéptido puede conferir o potenciar atributos deseables que incluyen actividad biológica. Tal sustitución puede, por ejemplo, conferir resistencia a la proteólisis por exopeptidasas que actúan sobre el extremo N. La síntesis de polipéptidos con aminoácidos no naturales es rutinaria y conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Collier y col., 1993, citado anteriormente).

Diferentes células huésped contendrán diferentes mecanismos de modificación post-traducciona que pueden proporcionar tipos particulares de modificación post-traducciona de una proteína de fusión si las secuencias de aminoácidos requeridas para tales modificaciones están presentes en la proteína de fusión. Se ha descrito un gran número (aproximadamente 100) de modificaciones post-traduccionales, algunas de las cuales se tratan en el presente documento. Un experto en la materia podrá elegir células huésped apropiadas, y diseñar genes quiméricos que codifican miembros de proteína que comprenden la secuencia de aminoácidos necesaria para un tipo de modificación particular.

La glicosilación es un tipo de modificación química post-traducciona que se produce en muchos sistemas eucariotas, y puede influir en la actividad, estabilidad, farmacogenética, inmunogenicidad y/o antigenicidad de proteínas. Sin embargo, aminoácidos específicos deben estar presentes en tales sitios para reclutar la maquinaria de glicosilación apropiada, y no todas las células huésped tienen la maquinaria molecular apropiada. *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* proporcionan la producción de proteínas glicosiladas, como lo hacen los sistemas de expresión que utilizan células de insecto, aunque el patrón de glicosilación puede variar dependiendo de qué células huésped se usen para producir la proteína de fusión.

Otro tipo de modificación post-traducciona es la fosforilación de un grupo hidroxilo libre de la cadena lateral de uno o más residuos de Ser, Thr o Tyr. Las proteínas cinasas catalizan tales reacciones. La fosforilación es frecuentemente reversible debido a la acción de una proteína fosfatasa, una enzima que cataliza la desfosforilación de residuos de aminoácidos.

Diferencias en la estructura química de residuos del extremo amino resultan de diferentes células huésped, cada una de las cuales puede tener una versión química diferente del residuo de metionina codificado por un codón de iniciación, y esto producirá extremos amino con diferentes modificaciones químicas.

Por ejemplo, muchas o la mayoría de las proteínas bacterianas se sintetizan con un aminoácido del extremo amino que es una forma modificada de metionina, es decir, N-formil-metionina (fMet). Aunque frecuentemente se hace la declaración de que todas las proteínas bacterianas se sintetizan con un aminoácido iniciador fMet; aunque esto puede ser cierto para *E. coli*, estudios recientes han mostrado que no es cierto en el caso de otras bacterias tales como *Pseudomonas aeruginosa* (Newton y col., J. Biol. Chem. 274: 22143-22146, 1999). En cualquier caso, en *E. coli*, el grupo formilo de fMet se elimina normalmente enzimáticamente después de la traducción para dar un residuo de metionina del extremo amino, aunque el residuo de fMet entero esté algunas veces eliminado (véase, Hershey, Capítulo 40, "Protein Synthesis" en: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, Neidhardt, Frederick C., Editor in Chief, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1987, volumen 1, páginas 613-647, y referencias citadas en su interior). Los mutantes de *E. coli* que carecen de las enzimas (tales como, por ejemplo, formilasa) que catalizan tales modificaciones post-traduccionales producirán proteínas que tienen un residuo fMet del extremo amino (Guillon y col., J. Bacteriol. 174: 4294-4301, 1992).

En eucariotas, la acetilación del residuo de metionina iniciador, o el penúltimo residuo si la metionina iniciadora se ha eliminado, normalmente se produce co- o post-traduccionalmente. Las reacciones de acetilación se catalizan por acetiltransferasas del extremo N (NAT, también conocidas como N-alfa-acetiltransferasas), mientras que la eliminación del residuo de metionina iniciador se cataliza por aminopeptidasas de metionina (para revisiones véanse Bradshaw y col., Trends Biochem. Sci. 23: 263-267, 1998; y Driessen y col., CRC Crit. Rev. Biochem. 18: 281-325, 1985). Las proteínas acetiladas del extremo amino se dice que están "N-acetiladas", "N-alfa-acetiladas" o simplemente "acetiladas".

Otro procedimiento post-traduccionale que se produce en eucariotas es la alfa-amidación del extremo carboxi. Para revisiones véase Eipper y col., Annu. Rev. Physiol. 50: 333-344, 1988, y Bradbury y col., Lung Cancer 14: 239-251, 1996. Aproximadamente el 50 % de las hormonas peptídicas endocrinas y neuroendocrinas conocidas están alfa-amidadas (Treston y col., Cell Growth Differ. 4: 911-920, 1993). En la mayoría de los casos se requiere la alfa-amidación de carboxi para activar estas hormonas peptídicas.

## E. MIMÉTICO DE POLIPÉPTIDO

En general, un mimético de polipéptido ("peptidomimético") es una molécula que imita la actividad biológica de un polipéptido, pero ya no es de naturaleza química peptídica. Por la estricta definición, un peptidomimético es una molécula que no contiene enlaces peptídicos (es decir, enlaces amida entre aminoácidos). Sin embargo, el término peptidomimético se usa algunas veces para describir moléculas que ya no son completamente peptídicas en la naturaleza, tales como pseudo-peptidos, semi-peptidos y peptoides. Ejemplos de algunos peptidomiméticos por la definición más amplia (en la que parte de un polipéptido está sustituida con una estructura que carece de enlaces peptídicos) se describen a continuación. Tanto si es como si no un péptido completamente o parcialmente, los peptidomiméticos proporcionan una disposición espacial de restos químicos reactivos que se parece mucho a la disposición tridimensional de grupos activos en el polipéptido en el que se basa el peptidomimético. Como resultado de esta geometría de sitio activo similar, el peptidomimético tiene efectos sobre sistemas biológicos que son similares a la actividad biológica del polipéptido.

Hay varias posibles ventajas de uso de un mimético de un polipéptido dado en vez del propio polipéptido. Por ejemplo, los polipéptidos pueden presentar dos atributos no deseables, es decir, mala biodisponibilidad y corta duración de la acción. Los peptidomiméticos son frecuentemente suficientemente pequeños para ser tanto activos por vía oral como para tener una larga duración de la acción. También hay problemas asociados a la estabilidad, almacenamiento e inmunorreactividad de polipéptidos que no son experimentados con peptidomiméticos.

Los polipéptidos candidatos, guía y otros polipéptidos que tienen una actividad biológica deseada pueden usarse en el desarrollo de peptidomiméticos con actividades biológicas similares. Se conocen técnicas de desarrollo de peptidomiméticos a partir de polipéptidos. Los enlaces peptídicos pueden sustituirse por enlaces no peptídicos que permiten que el peptidomimético adopte una estructura similar y, por tanto, actividad biológica, al polipéptido original. También pueden hacerse otras modificaciones reemplazando grupos químicos de los aminoácidos con otros grupos químicos de estructura similar. El desarrollo de peptidomiméticos puede ayudarse determinando la estructura terciaria del polipéptido original, tanto libre como unido a un ligando, por espectroscopía de RMN, cristalografía y/o modelado molecular asistido por ordenador. Estas técnicas ayudan en el desarrollo de novedosas composiciones de mayor potencia y/o mayor biodisponibilidad y/o mayor estabilidad que el polipéptido original (Dean, BioEssays, 16: 683-687, 1994; Cohen y Shatzmiller, J. Mol. Graph., 11: 166-173, 1993; Wiley y Rich, Med. Res. Rev., 13: 327-384, 1993; Moore, Trends Pharmacol. Sci., 15: 124-129, 1994; Hruby, Biopolymers, 33: 1073-1082, 1993; Bugg y col., Sci. Am., 269: 92-98, 1993).

Así, mediante el uso de los procedimientos descritos anteriormente, la presente divulgación proporciona compuestos que presentan actividad terapéutica potenciada en comparación con los polipéptidos descritos anteriormente. Los compuestos de peptidomimético obtenidos mediante los procedimientos anteriores, que tienen la actividad biológica de los polipéptidos anteriormente nombrados y estructura tridimensional similar, están englobados por la presente invención. Será rápidamente evidente para un experto en la materia que un peptidomimético puede generarse a partir de cualquiera de los polipéptidos modificados descritos en la sección previa o a partir de un polipéptido que

lleva más de una de las modificaciones descritas de la sección previa. Además, será evidente que los peptidomiméticos de la presente invención pueden usarse adicionalmente para el desarrollo de compuestos no peptídicos incluso más potentes, además de su utilidad como compuestos terapéuticos.

5 Ejemplos específicos de peptidomiméticos derivados de los polipéptidos descritos en la sección previa se presentan a continuación. Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes en términos de las otras modificaciones o modificaciones adicionales.

10 Las proteasas actúan sobre enlaces peptídicos. Por tanto, se deduce que la sustitución de enlaces peptídicos por pseudoenlaces peptídicos confiere resistencia a la proteólisis. Se han descrito varios enlaces pseudopeptídicos que en general no afectan la estructura del polipéptido y actividad biológica. El reducido enlace pseudopeptídico isótero es un enlace pseudopeptídico adecuado que es conocido por potenciar la estabilidad a la escisión enzimática con ninguna o poca pérdida de actividad biológica (Couder y col., Int. J. Polypeptide Protein Res. 41: 181-184, 1993). Así, las secuencias de aminoácidos de estos compuestos pueden ser idénticas a las secuencias de sus polipéptidos de L-aminoácido parentales, excepto que uno o más de los enlaces peptídicos están sustituidos con un enlace pseudopeptídico isostérico. Preferentemente, el enlace peptídico del extremo N más alejado está sustituido, ya que una sustitución tal conferiría resistencia a la proteólisis por exopeptidasas que actúan sobre el extremo N.

20 Para conferir resistencia a la proteólisis, los enlaces peptídicos también pueden estar sustituidos por enlaces pseudopeptídicos retro-inversos (Dal Pozzo y col., Int. J. Polypeptide Protein Res. 41: 561-566). Según esta modificación, las secuencias de aminoácidos de los compuestos pueden ser idénticas a las secuencias de sus polipéptidos parentales de L-aminoácido, excepto que uno o más de los enlaces peptídicos están sustituidos con un enlace pseudopeptídico retro-inverso. Preferentemente, el enlace peptídico del extremo N más alejado está sustituido, ya que una sustitución tal conferirá resistencia a la proteólisis por exopeptidasas que actúan sobre el extremo N.

30 Los derivados peptoides de polipéptidos representan otra forma de polipéptidos modificados que retienen los importantes determinantes estructurales para actividad biológica, además eliminan los enlaces peptídicos, confiriendo así resistencia a la proteólisis (Simon y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 9367-9371, 1992). Los peptoides son oligómeros de glicinas N-sustituidas. Se han descrito varios grupos N-alquilo, cada uno correspondiente a la cadena lateral de un aminoácido natural.

## F. POLINUCLEÓTIDOS

35 La invención incluye polinucleótidos que codifican péptidos de la invención. "Aislado", cuando se usa en referencia a un polinucleótido, se refiere a un polinucleótido sustancialmente libre de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, por ejemplo, con los que está naturalmente asociado. Como se usa en el presente documento, "polinucleótido" se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, en forma de un fragmento separado o como un componente de una construcción mayor. El ADN que codifica un péptido de la invención puede ensamblarse a partir fragmentos de ADNc o de oligonucleótidos que proporcionan un gen sintético que puede expresarse en una unidad transcripcional recombinante. Las secuencias de polinucleótidos de la invención incluyen secuencias de ADN, ARN y ADNc. Una secuencia de polinucleótidos puede deducirse del código genético, sin embargo, la degeneración del código debe tenerse en cuenta. Los polinucleótidos de la invención incluyen secuencias que están degeneradas como resultado del código genético. Tales polinucleótidos son útiles para la producción recombinante de grandes cantidades de un péptido de interés, tales como el péptido de la invención.

50 En la presente invención, los polinucleótidos que codifican los péptidos de la invención pueden insertarse en un "vector de expresión" recombinante. El término "vector de expresión" se refiere a un plásmido, virus u otro vehículo conocido en la técnica que se ha manipulado por inserción o incorporación de secuencias genéticas. Tales vectores de expresión de la invención son preferentemente plásmidos que contienen una secuencia promotora que facilita la eficaz transcripción de la secuencia genética insertada en el huésped. El vector de expresión normalmente contiene un origen de replicación, un promotor, además de genes específicos que permiten la selección fenotípica de las células transformadas. Por ejemplo, la expresión de los péptidos de la invención puede ponerse bajo el control de ADN cromosómico de *E. coli* que comprende un operón de lactosa lac que media en la utilización de la lactosa elaborando la enzima beta-galactosidasa. El sistema de control lac puede inducirse por IPTG. Puede construirse un plásmido que contiene el gen represor lac Iq, que permite la represión del promotor lac hasta que se añade IPTG. Otros sistemas promotores conocidos en la técnica incluyen beta-lactamasa, promotores lambda, el promotor de proteína A y los sistemas promotores de triptófano. Aunque éstos son los más comúnmente usados, también pueden utilizarse otros promotores microbianos, tanto inducibles como constitutivos. El vector contiene un sitio de replicación y secuencias de control que se derivan de especies compatibles con la célula huésped. Además, el vector puede llevar gene(s) específico(s) que pueden proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, el gen beta-lactamasa confiere resistencia a ampicilina a aquellas células transformadas que contienen el vector con el gen beta-lactamasa. Un sistema de expresión a modo de ejemplo para la producción de los péptidos de la invención se describe en la patente de EE.UU. nº 5.707.855.

La transformación de una célula huésped con el polinucleótido puede llevarse a cabo por técnicas convencionales conocidas para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, si el huésped es procarionta, tal como *E. coli*, células competentes que pueden captar ADN puede prepararse a partir de células recogidas después del crecimiento exponencial y tratarse posteriormente por el procedimiento de  $\text{CaCl}_2$  usando procedimientos conocidos en la técnica. Alternativamente podría usarse  $\text{MgCl}_2$  o  $\text{RbCl}$ .

Además de procedimientos químicos convencionales de transformación, los vectores plasmídicos de la invención pueden introducirse en una célula huésped por medios físicos, tales como por electroporación o microinyección. La electroporación permite la transferencia del vector por impulso eléctrico de alto voltaje, que crea poros en la membrana plasmática del huésped y se realiza según procedimientos conocidos en la técnica. Adicionalmente, el ADN clonado puede introducirse en células huésped por fusión de protoplastos, usando procedimientos conocidos en la técnica.

Las secuencias de ADN que codifican los péptidos pueden expresarse *in vivo* por transferencia de ADN en una célula huésped adecuada. "Células huésped" de la invención son aquellas en las que un vector puede propagarse y su ADN expresarse. El término también incluye cualquier progenie de la célula huésped objeto. Se entiende que no toda la progenie es idéntica a la célula parental, ya que puede haber mutaciones que se producen durante la replicación. Sin embargo, tal progenie está incluida cuando se usan los términos anteriores. Células huésped preferidas de la invención incluyen *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, aunque pueden utilizarse otros organismos Gram-negativos y Gram-positivos conocidos en la técnica en tanto que los vectores de expresión contengan un origen de replicación para permitir la expresión en el huésped.

La secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido usado según el procedimiento de la invención puede aislarse de un organismo o sintetizarse en el laboratorio. Secuencias de ADN específicas que codifican el péptido de interés pueden obtenerse por: 1) aislamiento de una secuencia de ADN bicatenaria del ADN genómico; 2) fabricación química de una secuencia de ADN para proporcionar los codones necesarios para el péptido de interés; y 3) síntesis *in vitro* de una secuencia de ADN bicatenaria para la transcripción inversa de ARNm aislado de una célula donante. En el último caso se forma eventualmente un complemento de ADN bicatenario de ARNm que generalmente se denomina ADNc.

La síntesis de secuencias de ADN es frecuentemente el procedimiento de elección cuando se conoce la secuencia de residuos de aminoácidos entera del producto de péptido deseado. En la presente invención, la síntesis de una secuencia de ADN tiene la ventaja de permitir la incorporación de codones que es más probable que sean reconocidos por un huésped bacteriano, permitiendo así la expresión de alto nivel sin dificultades en la traducción. Además, puede sintetizarse prácticamente cualquier péptido, que incluye aquellos que codifican péptidos naturales, variantes de los mismos o péptidos sintéticos.

Si no se conoce la secuencia entera del péptido deseado, la síntesis directa de secuencias de ADN no es posible y el procedimiento de elección es la formación de secuencias de ADNc. Entre los procedimientos convencionales para aislar secuencias de ADNc de interés está la formación de bibliotecas de ADNc que contienen plásmidos o fagos que se derivan de la transcripción inversa de ARNm que es abundante en células de donante que tienen un alto nivel de expresión genética. Si se usa en combinación con la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa, incluso pueden clonarse productos de expresión raros. En aquellos casos en los que se conozcan porciones significativas de la secuencia de aminoácidos del péptido, la producción de secuencias de sondas de ADN o ARN mono- o bicatenarias marcadas que duplican una secuencia putativamente presente en el ADNc diana pueden emplearse en los procedimientos de hibridación de ADN/ADN que se llevan a cabo en copias clonadas del ADNc que se han desnaturado en una forma monocatenaria (Jay y col., Nuc. Acid Res., 11:2325, 1983).

## G. DESCRIPTORES QSAR Y PROCEDIMIENTOS DE APRENDIZAJE DE MÁQUINAS

La divulgación proporciona además un procedimiento bioinformático de predicción de nuevos péptidos con buena actividad antimicrobiana mediante la creación de una biblioteca de péptidos al azar con composición de aminoácidos sesgada basándose en el espectro de actividad de los péptidos más activos investigados, y luego aplicando una serie de descriptores de relación cuantitativa de estructura-actividad (QSAR) y utilizando enfoques de inteligencia artificial/aprendizaje de máquinas para predecir péptidos adicionalmente activos.

## H. PROCEDIMIENTOS DE USO - ANTIMICROBIANO DIRECTO

La divulgación también proporciona un procedimiento de inhibición del crecimiento de bacterias que incluye poner en contacto las bacterias con una cantidad eficaz inhibidora de un péptido de la divulgación, que incluye SEC ID N°: 1-969 y 973-1264, y análogos, derivados, variaciones amidadas y variaciones conservativas de los mismos, en el que los péptidos tienen actividad antimicrobiana.

El término "poner en contacto" se refiere a exponer las bacterias al péptido de manera que el péptido pueda eficazmente inhibir, destruir, lisar bacterias, unirse a endotoxina (LPS) o permeabilizar membranas externas bacterianas Gram-negativas. El poner en contacto puede ser *in vitro*, por ejemplo, añadiendo el péptido a un cultivo

bacteriano para probar la susceptibilidad de las bacterias al péptido. El poner en contacto puede ser *in vivo*, por ejemplo, administrando el péptido a un sujeto con un trastorno bacteriano, tal como choque séptico o infección. El poner en contacto puede implicar adicionalmente recubrir un objeto (por ejemplo, dispositivo médico) tal como un catéter para inhibir bacterias con las que se pone en contacto, previniendo así que sea colonizado con las bacterias.

5 “Inhibir” o “cantidad eficaz de inhibición” se refiere a la cantidad de péptido que se requiere para producir un efecto bacteriostático o bactericida. Ejemplos de bacterias que pueden inhibirse incluyen *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella enteritidis subspecies Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium xerosis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis* y *Staphylococcus epidermidis*.

10 El procedimiento de inhibición del crecimiento de bacterias puede incluir adicionalmente la adición de antibióticos para terapia de combinación o sinérgica. El antibiótico apropiado administrado normalmente dependerá de la susceptibilidad de las bacterias tanto si las bacterias son Gram-negativas como Gram-positivas, y será fácilmente perceptible por un experto en la materia. Ejemplos de clases particulares de antibióticos útiles para terapia sinérgica con los péptidos de la invención incluyen aminoglucósidos (por ejemplo, tobramicina), penicilinas (por ejemplo, piperacilina), cefalosporinas (por ejemplo, ceftazidima), fluoroquinolonas (por ejemplo, ciprofloxacina), carbapenems (por ejemplo, imipenem), tetraciclinas y macrólidos (por ejemplo, eritromicina y claritromicina). El procedimiento de inhibición del crecimiento de bacterias puede incluir además la adición de antibióticos para terapia de combinación o sinérgica. El antibiótico apropiado administrado normalmente dependerá de la susceptibilidad de las bacterias tanto si las bacterias son Gram-negativas como Gram-positivas, y será fácilmente perceptible por un experto en la materia.

15 Con relación a los antibióticos enumerados anteriormente, antibióticos típicos incluyen, por ejemplo, aminoglucósidos (amikacina, gentamicina, kanamicina, netilmicina, tobramicina, estreptomina), macrólidos (azitromicina, claritromicina, eritromicina, eritromicina estolato/etilsuccinato/gluceptato/lactobionato/estearato), beta-lactamas tales como penicilinas (por ejemplo, penicilina G, penicilina V, meticilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, ampicilina, amoxicilina, ticarcilina, carbenicilina, mezlocilina, azlocilina y piperacilina) o cefalosporinas (por ejemplo, cefalotina, cefazolina, cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefuroxima, cefonicid, cefmetazol, cefotetan, cefprozilo, loracarbef, cefetamet, cefoperazona, cefotaxima, ceftizoxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima, cefixima, cefpodoxima y cefsulodin) o carbapenems (por ejemplo, imipenem, meropenem, panipenem), o monobactámicos (por ejemplo, aztreonam). Otras clases de antibióticos incluyen quinolonas (por ejemplo, fleroxacina, ácido nalidixico, norfloxacina, ciprofloxacina, ofloxacina, enoxacina, lomefloxacina y cinoxacina), tetraciclinas (por ejemplo, doxiciclina, minociclina, tetraciclina) y glicopéptidos (por ejemplo, vancomicina, teicoplanina). Otros antibióticos incluyen cloranfenicol, clindamicina, trimetoprim, sulfametoxazol, nitrofurantoina, rifampina, linezolid, Synercid, polimixina B, colisitina, colimicina, metotrexato, daptomicina, fosfomicina y mupirocina.

20 Los péptidos y/o análogos o derivados de los mismos pueden administrarse a cualquier huésped, que incluye un animal humano o no humano, en una cantidad eficaz para inhibir no solo el crecimiento de una bacteria, sino también un virus, parásito u hongo. Estos péptidos son útiles como agentes antimicrobianos, agentes antivirales y agentes antifúngicos. Los péptidos y/o análogos o derivados de los mismos pueden administrarse a cualquier huésped, que incluye un animal humano o no humano, en una cantidad eficaz para inhibir no solo el crecimiento de una bacteria, sino también un virus u hongo. Estos péptidos son útiles como agentes antimicrobianos, agentes antivirales y agentes antifúngicos.

25 Además de ser activos contra una amplia gama de patógenos, la bactenecina se ha mostrado que es citotóxica para neuronas embrionarias de rata, astrocitos de rata fetal y células de glioblastoma humano (Radermacher y col., J. Neuro. Res. 36:657, 1993). Así, se prevé que los péptidos de la presente invención puedan usarse para inhibir el crecimiento de una célula eucariota poniendo en contacto la célula eucariota con una cantidad eficaz inhibidora de un péptido de la invención. Un procedimiento tal sería útil, por ejemplo, para inhibir un trastorno asociado a proliferación celular en un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno tal. El procedimiento puede implicar, por ejemplo, administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la presente invención para inhibir el crecimiento en exceso de células en un sujeto en necesidad de tal tratamiento. Tales trastornos incluirían, por ejemplo, trastornos relacionados neurológicos.

30 La divulgación proporciona además un procedimiento de protección de objetos de la colonización bacteriana. Los péptidos de la invención siguen siendo activos cuando se conjugan con superficies sólidas. Así, los péptidos pueden usarse para proteger objetos tales como dispositivos médicos de la colonización con bacterias patógenas conjugando químicamente, o recubriendo por cualquier otro medio, al menos un péptido de la invención con la superficie del dispositivo médico. Tales dispositivos médicos incluyen sondas permanentes y similares.

## 60 I. PROCEDIMIENTOS DE USO - INMUNOMODULADOR

La presente invención proporciona péptidos catiónicos novedosos que tienen la capacidad de modular (por ejemplo, regular por incremento y/o por disminución) la expresión de polipéptidos, regulando así septicemia y respuestas inflamatorias y/o inmunidad innata.

65 La “inmunidad innata”, como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad natural de un organismo de defenderse a sí mismo contra invasiones por patógenos. Patógenos o microbios, como se usa en el presente

documento, puede incluir, pero no se limita a, bacterias, hongos, parásitos y virus. La inmunidad innata contrasta con la inmunidad adquirida/adaptativa en la que el organismo desarrolla un mecanismo defensivo basado sustancialmente en anticuerpos y/o linfocitos inmunes que se caracteriza por especificidad, amplificabilidad y discriminación propia frente a no propia. Con la inmunidad innata se proporciona amplia inmunidad no específica y no hay memoria inmunológica de exposición previa. Los distintivos de la inmunidad innata son la eficacia contra una amplia variedad de posibles patógenos, independencia de la exposición previa a un patógeno y eficacia inmediata (a diferencia de la respuesta inmunitaria específica que dura días a semanas para ser provocada). Además, la inmunidad innata incluye respuestas inmunitarias que afectan otras enfermedades tales como cáncer, enfermedades inflamatorias, esclerosis múltiple, diversas infecciones virales y similares.

En la inmunidad innata, la respuesta inmunitaria no es dependiente de antígenos. El proceso de inmunidad innata puede incluir la producción de moléculas secretoras y componentes celulares como se expone anteriormente. En la inmunidad innata, los patógenos son reconocidos por receptores (por ejemplo, receptores similares a Toll) que tienen una amplia especificidad, pueden reconocer muchos patógenos y están codificados en la línea germinal. Estos receptores similares a Toll tienen una amplia especificidad y pueden reconocer muchos patógenos. Cuando los péptidos catiónicos están presentes en la respuesta inmunitaria, ayudan en la respuesta del huésped a patógenos. Este cambio en la respuesta inmunitaria induce la liberación de quimiocinas, que promueven el reclutamiento de células inmunitarias al sitio de infección.

Las quimiocinas, o citocinas quimioatrayentes, son un subgrupo de factores inmunitarios que median en los fenómenos quimiotácticos y otros fenómenos pro-inflamatorios (véase, Schall, 1991, *Cytokine* 3:165-183). Las quimiocinas son moléculas pequeñas de aproximadamente 70-80 residuos de longitud y pueden generalmente dividirse en dos subgrupos,  $\alpha$  que tienen dos cisteínas del extremo N separadas por un único aminoácido (CxC) y  $\beta$  que tienen dos cisteínas adyacentes en el extremo N (CC). RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  son miembros del subgrupo  $\beta$  (revisado por Horuk, R., 1994, *Trends Pharmacol. Sci.*, 15:159-165; Murphy, P. M., 1994, *Annu. Rev. Immunol.*, 12:593-633). El extremo amino de las quimiocinas  $\beta$  RANTES, MCP-1 y MCP-3 participa en la mediación de la migración e inflamación celular inducida por estas quimiocinas. Esta participación se sugiere por la observación de que la delección de 8 residuos del extremo amino de MCP-1, 9 residuos del extremo amino de MCP-3 y 8 residuos del extremo amino de RANTES y la adición de una metionina al extremo amino de RANTES, antagonizan la quimiotaxia, movilización del calcio y/o liberación de enzimas estimulada por sus homólogos nativos (Gong y col., 1996 *J. Biol. Chem.* 271:10521-10527; Proudfoot y col., 1996 *J. Biol. Chem.* 271:2599-2603). Adicionalmente, la actividad quimiotáctica similar a quimiocina  $\alpha$  se ha introducido en MCP-1 mediante una mutación doble de Tyr 28 y Arg 30 a leucina y valina, respectivamente, que indica que las regiones internas de esta proteína también desempeñan una función en regular la actividad quimiotáctica (Beall y col., 1992, *J. Biol. Chem.* 267:3455-3459).

Las formas monoméricas de todas las quimiocinas caracterizadas hasta ahora comparten homología estructural significativa, aunque las estructuras cuaternarias de los grupos  $\alpha$  y  $\beta$  son distintas. Aunque las estructuras monoméricas de las quimiocinas  $\beta$  y  $\alpha$  son muy similares, las estructuras diméricas de los dos grupos son completamente diferentes. También se ha identificado una quimiocina adicional, linfotactina, que solo tiene una cisteína del extremo N y puede representar un subgrupo adicional ( $\gamma$ ) de quimiocinas (Yoshida y col., 1995, *FEBS Lett.* 360:155-159; y Kelner y col., 1994, *Science* 266:1395-1399).

Los receptores para quimiocinas pertenecen a la gran familia de los receptores transmembrana de 7 dominios acoplados a la proteína G (GCR) (véanse revisiones por Horuk, R., 1994, *Trends Pharmacol. Sci.* 15:159-165; y Murphy, P. M., 1994, *Annu. Rev. Immunol.* 12:593-633). Los estudios de unión por competición y desensibilización cruzada han mostrado que los receptores de quimiocinas presentan considerable promiscuidad en la unión a ligando. Ejemplos que demuestran la promiscuidad entre receptores de quimiocinas  $\beta$  incluyen: CC CKR-1, que se une a RANTES y MIP-1 $\alpha$  (Neote y col., 1993, *Cell* 72: 415-425), CC CKR-4, que se une a RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MCP-1 (Power y col., 1995, *J. Biol. Chem.* 270:19495-19500) y CC CKR-5, que se une a RANTES, MIP-1 $\alpha$ , y MIP-1 $\beta$  (Alkhatib y col., 1996, *Science* 272:1955-1958 y Dragic y col., 1996, *Nature* 381:667-674). Los eritrocitos poseen un receptor (conocido como el antígeno Duffy) que se une tanto a quimiocinas  $\alpha$  como  $\beta$  (Horuk y col., 1994, *J. Biol. Chem.* 269:17730-17733; Neote y col., 1994, *Blood* 84:44-52; y Neote y col., 1993, *J. Biol. Chem.* 268:12247-12249). Así, las homologías de secuencias y estructurales evidentes entre quimiocinas y sus receptores permiten algún solapamiento en las interacciones receptor-ligando.

En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de compuestos que incluyen péptidos de la invención para reducir septicemia y respuestas inflamatorias actuando directamente sobre células huésped. En este aspecto se proporciona un procedimiento de identificación de un polinucleótido o polinucleótidos que están regulados por uno o más agentes inductores de septicemia o inflamación en el que la regulación está alterada por un péptido catiónico. Tales agentes inductores de septicemia o inflamación incluyen, pero no se limitan a, lipopolisacárido endotóxico (LPS), ácido lipoteicoico (LTA) y/o ADN de CpG, o bacterias intactas u otros componentes bacterianos. La identificación se realiza poniendo en contacto la célula huésped con los agentes inductores de septicemia o inflamación y poniendo adicionalmente en contacto con un péptido catiónico tanto simultáneamente como inmediatamente después. Se observa la expresión del polinucleótido o polipéptido en presencia y ausencia del péptido catiónico y un cambio en la expresión es indicativo de un polinucleótido o polipéptido o patrón de

polinucleótidos o polipéptidos que está regulado por un agente inductor de septicemia o de inflamación e inhibido por un péptido catiónico. En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido identificado mediante el procedimiento.

5 Se obtienen compuestos candidatos a partir de una amplia variedad de fuentes que incluyen bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, están disponibles numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, que incluyen expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Alternativamente, están disponibles bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales, o se producen fácilmente.  
10 Adicionalmente, las bibliotecas y compuestos naturales o producidos sintéticamente se modifican fácilmente mediante medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y pueden usarse para producir bibliotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación y similares para producir análogos estructurales. Agentes candidatos también se encuentran entre las biomoléculas que incluyen, pero no se limitan a:  
15 péptidos, peptidomiméticos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, polipéptidos, polinucleótidos, compuestos químicos, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

Generalmente, en los procedimientos de la invención, un péptido catiónico se utiliza para detectar y localizar un polinucleótido o polipéptido que es esencial en el proceso de septicemia o inflamación. Una vez identificado, un patrón de expresión de polinucleótidos o polipéptidos puede obtenerse observando la expresión en presencia y ausencia del péptido catiónico. Entonces, el patrón obtenido en presencia del péptido catiónico es útil en identificar compuestos adicionales que pueden inhibir la expresión del polinucleótido y, por tanto, bloquear la septicemia o inflamación. Es muy conocido para un experto en la materia que los productos químicos no peptídicos y peptidomiméticos puedan imitar la capacidad de péptidos para unirse a receptores y sitios de unión de enzima y así  
20 pueden usarse para bloquear o estimular reacciones biológicas. Si un compuesto adicional de interés proporciona un patrón de expresión de polinucleótidos o polipéptidos similar al de la expresión en presencia de un péptido catiónico, ese compuesto también es útil en la modulación de septicemia o una respuesta inmunitaria innata. De este modo, los péptidos catiónicos de la invención, que son inhibidores conocidos de septicemia e inflamación y potenciadores de la inmunidad innata, son útiles como herramientas en la identificación de compuestos adicionales que inhiben septicemia e inflamación y potencian la inmunidad innata.  
25  
30

Como puede apreciarse en los siguientes ejemplos, los péptidos de la invención tienen una capacidad para reducir la expresión de polinucleótidos o polipéptidos regulados por LPS, particularmente la citocina pro-inflamatoria por excelencia  $TNF\alpha$ . Altos niveles de endotoxina en la sangre son responsables de muchos de los síntomas observados durante una grave infección o inflamación tal como fiebre y un elevado número de leucocitos, y muchos de estos efectos se reflejan o se producen por altos niveles de  $TNF\alpha$  inducido. La endotoxina (también llamada lipopolisacárido) es un componente de la pared celular de bacterias Gram-negativas y es un potente desencadenador de la patofisiología de la septicemia. Los mecanismos básicos de inflamación y septicemia están relacionados.  
35  
40

En otro aspecto, la invención identifica agentes que potencian la inmunidad innata. Las células humanas que contienen un polinucleótido o polinucleótidos que codifican un polipéptido o polipéptidos que participa en la inmunidad innata se ponen en contacto con un agente de interés. Se determina la expresión del polinucleótido, tanto en presencia como en ausencia del agente. La expresión se compara y la modulación específica de la expresión fue indicativa de un potenciamiento de la inmunidad innata. En otro aspecto, el agente no estimula una reacción séptica como se reveló por la falta de regulación por incremento de la citocina pro-inflamatoria  $TNF-\alpha$ . En otro aspecto adicional, el agente reduce o bloquea la respuesta inflamatoria o séptica.  
45

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos de regulación directa de polinucleótidos o polipéptidos por péptidos catiónicos y el uso de compuestos que incluyen péptidos catiónicos para estimular elementos de inmunidad innata. En este aspecto, la invención proporciona un procedimiento de identificación de un patrón de expresión de polinucleótidos o polipéptidos para la identificación de un compuesto que potencia la inmunidad innata. En el procedimiento de la invención se hace una detección inicial de un patrón de expresión de polipéptidos para células puestas en contacto en presencia y ausencia de un péptido catiónico. El patrón resultante de la expresión de polipéptidos en presencia del péptido representa estimulación de la inmunidad innata. Entonces se detecta un patrón de expresión de polipéptidos en presencia de un compuesto de prueba, en el que un patrón resultante con el compuesto de prueba que es similar al patrón observado en presencia del péptido catiónico es indicativo de un compuesto que potencia la inmunidad innata. En otro aspecto, la invención proporciona compuestos que se identifican en los procedimientos anteriores. En otro aspecto, el compuesto de la invención estimula la expresión de quimiocinas. La quimiocina o receptores de quimiocinas pueden incluir, pero no se limitan a, IL8,  $Gro-\alpha$ , MCP-1 y MCP-3. En otro aspecto adicional, el compuesto es un péptido, peptidomimético, compuesto químico o una molécula de ácido nucleico.  
50  
55  
60

Se muestra a continuación, por ejemplo, en la FIG. 2, que los péptidos catiónicos pueden neutralizar la respuesta del huésped a las moléculas de señalización de agentes infecciosos, además de modificar las respuestas transcripcionales de células huésped, principalmente regulando por disminución la respuesta pro-inflamatoria y/o  
65

regulando por incremento la respuesta antiinflamatoria. El Ejemplo 5 muestra que los péptidos catiónicos pueden suprimir selectivamente la inducción de la citocina inductora de septicemia  $TNF\alpha$  en células huésped. El Ejemplo 6 muestra que los péptidos catiónicos pueden ayudar en la respuesta del huésped a patógenos induciendo la liberación de quimiocinas, que promueven el reclutamiento de células inmunitarias al sitio de infección.

Se observa de los ejemplos más adelante que los péptidos catiónicos tienen una influencia sustancial sobre la respuesta del huésped a patógenos porque ayudan en la regulación de la respuesta inmunitaria del huésped induciendo respuestas pro-inflamatorias selectivas que, por ejemplo, promueven el reclutamiento de células inmunitarias al sitio de infección, pero no inducen citocinas pro-inflamatorias posiblemente perjudiciales. La septicemia parece que se produce en parte por una respuesta pro-inflamatoria arrolladora a agentes infecciosos. Los péptidos pueden ayudar al huésped en una respuesta "equilibrada" a patógenos induciendo una respuesta antiinflamatoria y suprimiendo ciertas respuestas pro-inflamatorias posiblemente perjudiciales.

La presente invención presenta procedimientos para potenciar una respuesta inmunitaria adaptativa inducida por vacuna en un sujeto que comprende administrar al sujeto una composición de adyuvante que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un péptido inmunomodulador de la invención en una cantidad eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria adaptativa inducida por vacuna en el sujeto. En algunos aspectos, los procedimientos comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una composición de adyuvante que comprende un vehículo farmacéuticamente eficaz y un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 2, 1213, 1214, 1222, 1224, 1230, 1232, 1238 ó 12.

Las composiciones de vacuna pueden comprender agentes que potencian la eficacia protectora de la vacuna, tales como adyuvantes. Los adyuvantes incluyen cualquier compuesto o compuestos que actúen potenciando una respuesta inmunitaria adaptativa inducida por vacuna, reduciendo así la cantidad de antígeno necesaria en la vacuna, y/o la frecuencia de administración necesaria para generar una respuesta inmunitaria protectora. Los adyuvantes pueden incluir, por ejemplo, emulsionantes, muramildipéptidos, avridina, adyuvantes acuosos tales como hidróxido de aluminio, adyuvantes basados en quitosano y cualquiera de las diversas saponinas, aceites y otras sustancias conocidas en la técnica, tales como Amphigen, LPS, extractos de paredes celulares bacterianas, ADN bacteriano, oligonucleótidos sintéticos y combinaciones de los mismos (Schijns y col. (2000) Curr. Opin. Immunol. 12:456), extracto de la pared celular de *Mycobacterium phlei* (*M. phlei*) (MCWE) (patente de EE.UU. n° 4.744.984), ADN de *M. phlei* (M-ADN), complejo de M-ADN-pared celular de *M. phlei* (MCC). Los compuestos que pueden servir de emulsionantes incluyen agentes emulsionantes naturales y sintéticos, además de compuestos aniónicos, catiónicos y no iónicos. Entre los compuestos sintéticos, agentes emulsionantes aniónicos incluyen, por ejemplo, las sales de potasio, sodio y amonio de ácido láurico y oleico, las sales de calcio, magnesio y aluminio de ácidos grasos, y sulfonatos orgánicos tales como laurilsulfato de sodio. Agentes catiónicos sintéticos incluyen, por ejemplo, bromuro de cetiltrimetilamonio, mientras que agentes no iónicos sintéticos se ejemplifican por glicerilésteres (por ejemplo, monoestearato de glicerilo), ésteres y éteres de polioxietilenglicol, y los ésteres de sorbitano de ácidos grasos (por ejemplo, monopalmitato de sorbitano) y sus derivados de polioxietileno (por ejemplo, polioxietileno-monopalmitato de sorbitano). Agentes emulsionantes naturales incluyen goma arábiga, gelatina, lecitina y colesterol.

Otros adyuvantes adecuados pueden formarse con un componente de aceite, tal como un único aceite, una mezcla de aceites, una emulsión de agua en aceite o una emulsión de aceite en agua. El aceite puede ser un aceite mineral, un aceite vegetal o un aceite animal. Los aceites minerales son hidrocarburos líquidos obtenidos de petróleo mediante una técnica de destilación, y también se denominan en la materia parafina líquida, vaselina líquida o aceite mineral blanco. Aceites animales adecuados incluyen, por ejemplo, aceite de hígado de bacalao, aceite de fletán, aceite de sábalo atlántico, aceite de pargo alazán y aceite de hígado de tiburón, todos los cuales están disponibles comercialmente. Aceites vegetales adecuados incluyen, por ejemplo, aceite de canola, aceite de almendra, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de alazor, aceite de sésamo, aceite de soja y similares. Adyuvante completo de Freund (FCA) y adyuvante incompleto de Freund (FIA) son dos adyuvantes comunes que se usan comúnmente en preparaciones de vacuna, y también son adecuados para su uso en la presente invención. Tanto FCA como FIA son emulsiones de agua en aceite mineral; sin embargo, FCA también contiene *Mycobacterium sp.* muerta.

Las citocinas inmunomoduladoras también pueden usarse en las composiciones de vacuna para potenciar la eficacia de la vacuna, por ejemplo, como adyuvante. Ejemplos no limitantes de tales citocinas incluyen interferón alfa ( $IFN-\alpha$ ), interleucina-2 (IL-2) y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), o combinaciones de los mismos. Se prefiere sumamente GM-CSF.

Las composiciones de vacuna que comprenden los péptidos inmunomoduladores de la invención y que comprenden además adyuvantes pueden prepararse usando técnicas muy conocidas para aquellos expertos en la materia que incluyen, pero no se limitan a, mezcla, sonicación y microfluidación. El adyuvante puede comprender de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 50 % (v/v) de la composición de vacuna, más preferentemente aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 40 % (v/v), y más preferentemente de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 30 % (v/v), o cualquier número entero dentro de estos intervalos. Se prefiere sumamente aproximadamente el 25 % (v/v).

**J. PAUTAS DE TRATAMIENTO**

La divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o una combinación de péptidos antimicrobianos, por ejemplo, formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Algunas composiciones incluyen una combinación de múltiples péptidos de la invención (por ejemplo, dos o más).

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. En un aspecto, el vehículo es adecuado para administración parenteral. Alternativamente, el vehículo puede ser adecuado para administración intravenosa, intraperitoneal o intramuscular. En otro aspecto, el vehículo es adecuado para administración por vía oral. Vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones inyectables estériles o dispersión. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es muy conocido en la técnica. Excepto en la medida de que cualquier medio o agente convencional sea compatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas. También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confiere ningún efecto toxicológico no deseado (véase, por ejemplo, Berge y col., J. Pharm. Sci., 66: 1-19, 1977). Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, además de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Sales de adición de base incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, además de aminas orgánicas no tóxicas tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina; etilendiamina, procaína y similares.

En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o medicamentos se administran a un paciente susceptible a, o de otro modo en riesgo de una enfermedad o afección (es decir, como resultado de bacterias, hongos, virus, parásitos o similares) en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar el comienzo de la enfermedad, que incluye síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones o medicamentos se administran a un paciente que se sospecha que, o que ya padece, una enfermedad tal o afección en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad o afección (por ejemplo, bioquímicos y/o histológicos), que incluyen sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en desarrollo de la enfermedad o afección. Una cantidad adecuada para realizar el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéuticamente o profilácticamente eficaz. En tanto pautas profilácticas como terapéuticas, los agentes se administran normalmente en varias dosificaciones hasta que se consigue una respuesta suficiente. Normalmente, la respuesta se monitoriza y se administran dosificaciones repetidas si la respuesta empieza a decrecer.

La composición farmacéutica de la presente invención debe ser estéril y fluida hasta el punto de que la composición sea administrable por jeringuilla. Además de agua, el vehículo puede ser una solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. En muchos casos es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro sódico en la composición. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Si el compuesto activo está adecuadamente protegido, como se ha descrito anteriormente, el compuesto puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, en el tratamiento de bacterias, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente invención con al menos un agente u otra terapia convencional.

**K. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN**

Una composición de la presente invención puede administrarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. La vía y/o modo de administración varían dependiendo de los resultados deseados. Los términos "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" significan modos de administración distintos de administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión

intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. El péptido de la invención puede administrarse parenteralmente mediante inyección o por infusión gradual con el tiempo. El péptido también puede prepararse con vehículos que protegen el compuesto contra la rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulada. Otros procedimientos para la administración del péptido incluyen por vía oral, por encapsulación en microesferas o proteínoides, por administración en aerosol a los pulmones, o transdérmicamente por iontoforesis o electroporación transdérmica. Para administrar un péptido de la invención por ciertas vías de administración puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material para prevenir su inactivación. El procedimiento de la invención también incluye sistemas de administración tales como microencapsulación de péptidos en liposomas o un diluyente. La microencapsulación también permite el co-atrapamiento de moléculas antimicrobianas junto con los antígenos, de manera que estas moléculas, tales como antibióticos, puedan administrarse a un sitio en necesidad de tal tratamiento conjuntamente con los péptidos de la invención. Los liposomas en la corriente sanguínea son generalmente capturados por el hígado y el bazo. Diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina y disoluciones de tampón acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones de agua en aceite en agua CGF, además de liposomas convencionales (Strejan y col., J. Neuroimmunol., 7: 27, 1984). Así, el procedimiento de la invención es particularmente útil para administrar péptidos antimicrobianos a tales órganos. Pueden usarse polímeros biocompatibles biodegradables tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de tales formulaciones se describen, por ejemplo, por Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, Ed., 1978, Marcel Dekker, Inc., New York. Otros procedimientos de administración serán conocidos para aquellos expertos en la materia.

Las preparaciones para administración parenteral de un péptido de la invención incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen solución salina y medios tamponados. Vehículos parentales incluyen disolución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato o aceites no volátiles. Vehículos intravenosos incluyen reforzadores de fluidos y de nutrientes, reforzadores de electrolitos (tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y gases inertes y similares.

Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles, sustancialmente isotónicas y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como disolución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada a alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. En muchos casos es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son secado a vacío y secado por congelación (liofilización) que dan un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración del mismo. Las composiciones terapéuticas también pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en un aspecto preferido, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja tal como los dispositivos desvelados en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824 ó 4.596.556. Ejemplos de implantes y módulos útiles en la presente invención incluyen: patente de EE.UU. n.º 4.487.603, que desvela una bomba de micro-infusión implantable para dispensar medicación a una velocidad controlada; patente de EE.UU. n.º 4.486.194, que desvela un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos mediante la piel; patente de EE.UU. n.º 4.447.233, que desvela una bomba de infusión de medicación para administrar medicación a una velocidad de infusión precisa; patente de EE.UU. n.º 4.447.224, que desvela un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármaco; patente de EE.UU. n.º 4.439.196, que desvela un sistema de administración de fármaco osmótico que tiene compartimentos de múltiples cámaras; y patente de EE.UU. n.º 4.475.196, que desvela un sistema de administración de fármaco osmótico. Se conocen muchos otros de tales implantes, sistemas de administración y módulos.

Si los péptidos de la presente invención se administran como productos farmacéuticos, a seres humanos y animales,

pueden administrarse solos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, 0,01 al 99,5 % (o 0,1 al 90 %) de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

## L. DOSIFICACIONES EFICACES

“Cantidad terapéuticamente eficaz” como se usa en el presente documento para el tratamiento de enfermedades y afecciones relacionadas con antimicrobianas se refiere a la cantidad de péptido usada que es de cantidad suficiente para reducir los números de bacterias, virus, hongos y parásitos en el cuerpo de un sujeto. Los intervalos de dosificación para la administración de péptidos son aquellos suficientemente grandes para producir el efecto deseado. La cantidad de péptido adecuada para realizar esto se define como una “dosis terapéuticamente eficaz”. El programa de dosificación y cantidades eficaces para este uso, es decir, la “pauta de dosificación”, dependerá de una variedad de factores, que incluyen la fase de la enfermedad o afección, la gravedad de la enfermedad o afección, el estado general de la salud del paciente, el estado físico del paciente, edad, formulación farmacéutica y concentración del agente activo y similares. En el cálculo de la pauta de dosificación para un paciente, el modo de administración también se tiene en cuenta. La pauta de dosificación también debe tener en cuenta la farmacocinética, es decir, la velocidad de absorción de la composición farmacéutica, biodisponibilidad, metabolismo, eliminación y similares. Véase, por ejemplo, lo último de Remington (Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA); Egleton, Peptides 18: 1431-1439, 1997; Langer Science 249: 1527-1533, 1990. La pauta de dosificación puede ajustarse por el médico individual en caso de cualquier contraindicación.

Las pautas de dosificación de las composiciones farmacéuticas de la presente invención se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas con el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. Forma unitaria de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que van a tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención está impuesta por y es directamente dependiente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que va a lograrse, y (b) las limitaciones inherentes en la materia de combinar un compuesto activo tal para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

La administración de las composiciones de vacuna puede ser por infusión o inyección (por ejemplo, intravenosamente, intramuscularmente, intracutáneamente, subcutáneamente, intratecal, intraduodenalmente, intraperitonealmente y similares). Las composiciones de vacuna también pueden administrarse intranasalmente, vaginalmente, rectalmente, por vía oral o transdérmicamente como se ha tratado en el presente documento. Preferentemente, las composiciones se administran por inyección intradérmica. La administración puede ser de acuerdo a las indicaciones de un médico.

Las inyecciones pueden fraccionarse en múltiples inyecciones, administrándose tales inoculaciones fraccionadas preferentemente sustancialmente simultáneamente. Cuando se administra como una inoculación fraccionada, la dosis del inmunogén se proporciona preferentemente, pero no necesariamente, igualmente en cada inyección separada. Si un adyuvante está presente en la composición de vacuna, la dosis del adyuvante se proporciona preferentemente, pero no necesariamente, igualmente en cada inyección separada. Las inyecciones separadas para la inoculación fraccionada se administran preferentemente sustancialmente proximales entre sí sobre el cuerpo del paciente. En algunos aspectos preferidos, las inyecciones se administran separadas al menos aproximadamente 1 cm entre sí sobre el cuerpo. En algunos aspectos preferidos, las inyecciones se administran separadas al menos aproximadamente 2,5 cm entre sí sobre el cuerpo. En aspectos altamente preferidos, las inyecciones se administran separadas al menos aproximadamente 5 cm entre sí sobre el cuerpo. En algunos aspectos, las inyecciones se administran separadas al menos aproximadamente 10 cm entre sí sobre el cuerpo. En algunos aspectos, las inyecciones se administran más de 10 cm separadas entre sí sobre el cuerpo, por ejemplo, al menos aproximadamente 12,5, 15, 17,5, 20, o más cm separadas entre sí sobre el cuerpo. La inyecciones de inmunización primaria e inyecciones de refuerzo pueden administrarse como una inoculación fraccionada como se describe y se ejemplifica en el presente documento.

En algunos aspectos, a los pacientes pueden administrársele las composiciones de vacuna 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más veces por mes. Se prefieren cuatro a seis veces por mes para establecer la respuesta inmunitaria protectora, particularmente con respecto al programa de inmunización primaria. En algunos aspectos, los refuerzos pueden administrarse a intervalos regulares tales como cada 2, 3, 4, 5 ó 6 días, cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más semanas, o cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más meses. La administración del refuerzo es preferentemente cada 6 meses. Los refuerzos también puede administrarse según se necesite.

El programa de administración de vacuna, que incluye inmunización primaria y administración de refuerzo, puede continuar mientras que el paciente lo necesite, por ejemplo, durante el transcurso de varias semanas, a varios meses, a varios años, durante toda la vida del paciente. En algunos aspectos, el programa de vacuna incluye

administración más frecuente al principio de la pauta de la vacuna, e incluye administración menos frecuente (por ejemplo, refuerzos) con el tiempo para mantener la inmunidad protectora. "Refuerzo" se refiere a una dosis de un inmunogén administrado a un paciente para potenciar, prolongar o mantener la inmunidad protectora.

5 Las vacunas pueden administrarse a menores dosis al principio de la pauta de la vacuna, administrándose mayores dosis con el tiempo. Las vacunas también pueden administrarse a mayores dosis al principio de la pauta de la vacuna, administrándose menores dosis con el tiempo. La frecuencia de administración de las vacunas primarias y de refuerzo y la dosis de los péptidos inmunomoduladores de la invención administrados puede confeccionarse y/o ajustarse para cumplir las necesidades particulares de pacientes individuales, como se ha determinado por el  
10 médico que administra según cualquiera medio adecuado en la materia.

En algunos aspectos, las composiciones de vacuna, que incluyen composiciones para administración como un refuerzo, comprenden de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 10 mg del péptido o péptidos inmunomoduladores. En algunos aspectos preferidos, las composiciones comprenden aproximadamente 0,1 mg del  
15 péptido o péptidos inmunomoduladores. En algunos aspectos preferidos, las composiciones comprenden aproximadamente 0,5 mg del péptido o péptidos inmunomoduladores. En algunos aspectos preferidos, las composiciones comprenden aproximadamente 1 mg del péptido o péptidos inmunomoduladores.

Los niveles de dosificación actuales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse de manera que se obtenga una cantidad del principio activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado depende de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de eliminación del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con  
20 las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica previa del paciente que está tratándose, y factores similares.

Un médico o veterinario puede iniciar la dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de un compuesto de la invención es la cantidad del compuesto que es la menor dosis eficaz para producir un efecto terapéutico. Una dosis eficaz tal generalmente depende de los factores descritos anteriormente. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, o se administre proximal al sitio de la diana. Si se desea, la  
30 dosis diaria eficaz de una composición terapéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más sub-dosis administradas por separado a intervalos apropiados durante todo el día, opcionalmente, en formas de dosificación unitaria. Aunque es posible administrar solo un compuesto de la presente invención, es preferible administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición).

Una dosis eficaz de cada uno de los péptidos desvelados en el presente documento como posibles terapéuticos para su uso en el tratamiento de enfermedades y afecciones microbianas es de aproximadamente 1 µg a 500 mg/kg de peso corporal, por administración única, que puede determinarse fácilmente por un experto en la materia. Como se trata anteriormente, la dosificación depende de la edad, sexo, salud y peso del receptor, tipo de terapia concurrente, si la hay, y frecuencia de tratamiento. Otros límites superiores del intervalo de dosificación eficaz son 100 mg/kg de peso corporal, 50 mg/kg de peso corporal, 25 mg/kg de peso corporal y 10 mg/kg de peso corporal.  
45

La dosificación y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es o no profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, una dosificación relativamente baja se administra a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas algunas veces se requiere una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, y preferentemente hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de síntomas de enfermedad. A partir de aquí, la patente puede administrar como una pauta profiláctica.  
50

Algunos compuestos de la invención pueden formularse para garantizar la apropiada distribución *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la invención crucen la BHE (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para procedimientos de fabricación de liposomas véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan selectivamente a células u órganos específicos, así potencian la administración de fármacos dirigida (véase, por ejemplo, Ranade, J. Clin. Pharmacol., 29: 685, 1989). Restos que eligen diana a modo de ejemplo incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.416.016 a Low y col.); manósidos (Umezawa y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 153: 1038, 1988); anticuerpos (Bloeman y col., FEBS Lett., 357: 140, 1995; Owais y col., Antimicrob. Agents Chemother., 39: 180, 1995); receptor de proteína A tensioactiva (Briscoe y col., Am. J. Physiol., 1233: 134, 1995), diferentes especies las cuales pueden comprender las formulaciones de la invención, además de componentes de las moléculas inventadas; p120 (Schreier y col., J. Biol. Chem., 269: 9090, 1994). Véanse también  
55  
60  
65

Keinanen y col., FEBS Lett., 346: 123, 1994; Killion y col., Immunomethods, 4: 273, 1994. En algunos procedimientos, los compuestos terapéuticos de la invención se formulan en liposomas; en un aspecto más preferido, los liposomas incluyen un resto que elige diana. En algunos procedimientos, los compuestos terapéuticos en los liposomas se administran mediante inyección en bolo a un sitio proximal al tumor o infección. La composición debe ser fluida hasta el punto de que exista fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

“Cantidad bactericida”, como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad suficiente para lograr una concentración en la sangre destructora de bacterias en el sujeto que recibe el tratamiento. La cantidad bactericida de antibiótico generalmente reconocida como segura para la administración a un ser humano es muy conocida en la técnica, y como se conoce en la técnica, varía con el antibiótico específico y el tipo de infección bacteriana que está tratándose.

Debido a las propiedades antibióticas, antimicrobianas y antivirales de los péptidos, también pueden usarse como conservantes o esterilizantes de materiales susceptibles a contaminación microbiana o viral. Los péptidos de la invención pueden utilizarse como agentes antimicrobianos de amplio espectro dirigidos hacia diversas aplicaciones específicas. Tales aplicaciones incluyen el uso de los péptidos como conservantes en alimentos procesados (organismos que incluyen *Salmonella*, *Yersinia* y *Shigella*), tanto solos como en combinación con aditivos antibacterianos para alimentos tales como lisozimas; como agente tópico (*Pseudomonas*, *Streptococcus*) y para destruir microbios productores del olor (*Micrococci*). La eficacia relativa de los péptidos de la invención para las aplicaciones descritas puede determinarse fácilmente por un experto en la materia determinando la sensibilidad de cualquier organismo a uno de los péptidos.

## M. FORMULACIÓN

Normalmente, las composiciones se preparan como inyectables, bien como disoluciones o bien como suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicolida o copolímero para el efecto adyuvante potenciado, como se trata anteriormente. Langer, Science 249: 1527, 1990 y Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997. Los agentes de la presente invención pueden administrarse en forma de una inyección de liberación prolongada o preparación de implante que puede formularse de tal manera que se permita una liberación sostenida o pulsada del principio activo.

Formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales, intranasales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas.

Para supositorios, los agentes de unión y vehículos incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo del 0,5 % al 10 %, preferentemente 1 %-2 %. Las formulaciones orales incluyen excipientes tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa y carbonato de magnesio. Estas composiciones adoptan la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen el 10 %-95 % de principio activo, preferentemente 25 %-70 %.

La administración tópica puede producir administración transdérmica o intradérmica. La administración tópica puede facilitarse por co-administración del agente con toxina del cólera o derivados o subunidades desintoxicados de la misma u otras toxinas bacterianas similares. Glenn y col., Nature 391: 851, 1998. La co-administración puede lograrse usando los componentes como una mezcla o como moléculas ligadas obtenidas por reticulación o expresión química como una proteína de fusión.

Alternativamente, la administración transdérmica puede lograrse usando un parche para la piel o usando transferosomas. Paul y col., Eur. J. Immunol. 25: 3521-24, 1995; Cevc y col., Biochem. Biophys. Acta 1368: 201-15, 1998.

Las composiciones farmacéuticas se formulan generalmente como estériles, sustancialmente isotónicas y en cumplimiento completo con todos los reglamentos de las Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) de la Agencia Estadounidense del Medicamento.

Todos los ejemplos con referencia a péptidos no explícitamente reivindicados deben entenderse como exclusivamente ilustrativos.

## REALIZACIONES A MODO DE EJEMPLO

### EJEMPLO 1:

**MATERIALES, PROCEDIMIENTOS Y PÉPTIDOS**

*Síntesis de péptidos* – Las síntesis de péptidos sobre celulosa se realizaron usando un robot de pipeteado (Abimed, Langenfeld, Alemania) y membranas de celulosa Whatman 50 (Whatman, Maidstone, Reino Unido) como se ha descrito previamente (Kramer A, Schuster A, Reinecke U, Malin R, Volkmer-Engert R, Landgraf C, Schneider-Mergener J. 1994. Cellulose-bound peptide libraries: screening tool for the identification of peptides that bind ligands with predefined specificity. *Comp. Meth. Enzymol.* 6, 388-395; Kramer A, Keitel T, Winkler K, Stocklein W, Hohne W, Schneider-Mergener J. 1997. Molecular basis for the binding promiscuity of an anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody. *Cell* 91, 799-809). Los péptidos purificados por HPLC usados para la caracterización adicional (CD, permeabilidad de membranas, CIM) se compraron de Thermo Electron Corporation (Ulm, Alemania). Tabla 2A

**Tabla 2A. Péptidos utilizados en estos estudios.** Todos los péptidos se amidaron en el extremo C, a menos que se indique lo contrario.

Nombre	Secuencia	ID
HH1	QRLRIRVAVIRA	SEQ ID NO 1
HH2	VQLRIRVAVIRA	SEQ ID NO 2
HH3	VRFRIRVAVIRA	SEQ ID NO 3
HH4	VRWRIRVAVIRA	SEQ ID NO 4
HH5	VRLWIRVAVIRA	SEQ ID NO 5
HH6	VRLRIRVWVIRA	SEQ ID NO 6

ES 2 497 441 T3

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
	HH7	VRLRIRVAVRRA	SEQ ID NO 7
5	HH8	VRLRIRVAVIRK	SEQ ID NO 8
	HH9	VQLRIRVRVIRK	SEQ ID NO 9
	HH10	KRFIRVAVRRA	SEQ ID NO 10
10	HH11	VRLRIRVRVIRK	SEQ ID NO 11
	HH12	KQFRIRVRVIRK	SEQ ID NO 12
	HH13	HQFRFRFRVRRK	SEQ ID NO 13
15	HH14	HQWRIRVAVRRH	SEQ ID NO 14
	HH15	KRFIRVRVIRK	SEQ ID NO 15
	HH16	KRWIRVRVIRK	SEQ ID NO 16
20	HH17	KIWVRWR	SEQ ID NO 17
	HH18	IWVIWRR	SEQ ID NO 18
	HH19	ALPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 19
25	HH20	IAPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 20
	HH21	ILAWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 21
	HH22	ILPAKWPWWPWRR	SEQ ID NO 22
30	HH23	ILPWAWPWWPWRR	SEQ ID NO 23
	HH24	ILPWKAPWWPWRR	SEQ ID NO 24
	HH25	ILPWKAWWWPWRR	SEQ ID NO 25
35	HH26	ILPWKWPAPWRR	SEQ ID NO 26
	HH27	ILPWKWPWAPWRR	SEQ ID NO 27
	HH28	ILPWKWPWWAWRR	SEQ ID NO 28
40	HH29	ILPWKWPWWPARR	SEQ ID NO 29
	HH30	ILPWKWPWWPWARR	SEQ ID NO 30
	HH31	ILPWKWPWWPWARR	SEQ ID NO 31
45	HH32	DLPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 32
	HH33	IDPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 33
	HH34	ILDWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 34
50	HH35	ILPDKWPWWPWRR	SEQ ID NO 35
	HH36	ILPWDWPWWPWRR	SEQ ID NO 36
	HH37	ILPWKDPWWPWRR	SEQ ID NO 37
55	HH38	ILPWKWDWWPWRR	SEQ ID NO 38
	HH39	ILPWKWPDPWRR	SEQ ID NO 39
	HH40	ILPWRWPDPWRR	SEQ ID NO 40
60	HH41	ILPWKWPWWDWRR	SEQ ID NO 41
	HH42	ILPWKWPWWPDRR	SEQ ID NO 42
	HH43	ILPWKWPWWPWDR	SEQ ID NO 43
65	HH44	ILPWKWPWWPWDR	SEQ ID NO 44

ES 2 497 441 T3

continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
	HH45	ELPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 45
5	HH46	IEPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 46
	HH47	ILEWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 47
	HH48	ILPEKWPWWPWRR	SEQ ID NO 48
10	HH49	ILPWEWPWWPWRR	SEQ ID NO 49
	HH50	ILPWKEPWWPWRR	SEQ ID NO 50
	HH51	ILPWKWEWWPWRR	SEQ ID NO 51
15	HH52	ILPWKWPEWPWRR	SEQ ID NO 52
	HH53	ILPWKWPWEPWRR	SEQ ID NO 53
	HH54	ILPWKWPWWEWRR	SEQ ID NO 54
20	HH55	ILPWKWPWWPERR	SEQ ID NO 55
	HH56	ILPWKWPWWPWER	SEQ ID NO 56
	HH57	ILPWKWPWWPWRE	SEQ ID NO 57
25	HH58	FLPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 58
	HH59	IFPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 59
	HH60	ILFWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 60
30	HH61	ILPFKWPWWFWRR	SEQ ID NO 61
	HH62	ILPWFWPWWPWRR	SEQ ID NO 62
	HH63	ILPWKFPWWPWRR	SEQ ID NO 63
35	HH64	ILPWKWFMPWRR	SEQ ID NO 64
	HH65	ILPWKWPFWPWRR	SEQ ID NO 65
	HH66	ILPWKWPWFPWRR	SEQ ID NO 66
40	HH67	ILPWKWPWWFWRR	SEQ ID NO 67
	HH68	ILPWKWPWWPFRR	SEQ ID NO 68
	HH69	ILPWKWPWWPWFR	SEQ ID NO 69
45	HH70	ILPWKWPWWPWRF	SEQ ID NO 70
	HH71	GLPWRWPWWPWRR	SEQ ID NO 71
	HH72	IGPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 72
50	HH73	ILGWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 73
	HH74	ILPGKWPWWPWRR	SEQ ID NO 74
	HH75	ILPWGWPWWPWRR	SEQ ID NO 75
55	HH76	ILPWKGPWWPWRR	SEQ ID NO 76
	HH77	ILPWRWGWWPWRR	SEQ ID NO 77
	HH78	ILPWKWPWGPWRR	SEQ ID NO 78
60	HH79	ILPWKWPWGPWRR	SEQ ID NO 79
	HH80	ILPWRWPWWGWRR	SEQ ID NO 80
	HH81	ILPWRWPWWPGRR	SEQ ID NO 81
65	HH82	ILPWKWPWWPWGR	SEQ ID NO 82

ES 2 497 441 T3

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
	HH83	ILPWKWPWWPWRRG	SEQ ID NO 83
5	HH84	HLPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 84
	HH85	IHPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 85
	HH86	ILHWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 86
10	HH87	ILPHKWPWWPWRR	SEQ ID NO 87
	HH88	ILPWHWPWWPWRR	SEQ ID NO 88
	HH89	ILPWKHPWWPWRR	SEQ ID NO 89
15	HH90	ILPWKMHWPPWRR	SEQ ID NO 90
	HH91	ILPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 91
	HH92	ILPWRWPWWPWRR	SEQ ID NO 92
20	HH93	ILPWKWPWWHWRR	SEQ ID NO 93
	HH94	ILPWKWPWWPHRR	SEQ ID NO 94
	HH95	ILPWKWPWWPWHR	SEQ ID NO 95
25	HH96	ILPWKWPWWPWRRH	SEQ ID NO 96
	HH97	IIPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 97
	HH98	ILIWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 98
30	HH99	ILPIKWPWWPWRR	SEQ ID NO 99
	HH100	ILPWIWPWWPWRR	SEQ ID NO 100
	HH101	ILPWKIPWWPWRR	SEQ ID NO 101
35	HH102	ILPWKWIWWPWRR	SEQ ID NO 102
	HH103	ILPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 103
	HH104	ILPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 104
40	HH105	ILPWKWPWWIWRR	SEQ ID NO 105
	HH106	ILPWKWPWWPIRR	SEQ ID NO 106
	HH107	ILPWKWPWWPWIR	SEQ ID NO 107
45	HH108	ILPWKWPWWPWRI	SEQ ID NO 108
	HH109	KLPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 109
	HH110	IKPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 110
50	HH111	ILKWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 111
	HH112	ILPKKWPWWPWRR	SEQ ID NO 112
	HH113	ILPWKKPWWPWRR	SEQ ID NO 113
55	HH114	ILPWKWKWWPWRR	SEQ ID NO 114
	HH115	ILPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 115
	HH116	ILPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 116
60	HH117	ILPWKWPWWKWRR	SEQ ID NO 117
	HH118	ILPWKWPWWPWKRR	SEQ ID NO 118
	HH119	ILPWKWPWWPWKR	SEQ ID NO 119
65	HH120	ILPWKWPWWPWKR	SEQ ID NO 120

ES 2 497 441 T3

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
	HH121	LLPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 121
5	HH122	ILLWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 122
	HH123	ILPLKWPWWPWRR	SEQ ID NO 123
	HH124	ILPWLWPWWPWRR	SEQ ID NO 124
10	HH125	ILPWKLPWWPWRR	SEQ ID NO 125
	HH126	ILPWKWLWWPWRR	SEQ ID NO 126
	HH127	ILPWKWPLWPWRR	SEQ ID NO 127
15	HH128	ILPWKWPWLPWRR	SEQ ID NO 128
	HH129	ILPWKWPWWLWRR	SEQ ID NO 129
	HH130	ILPWKWPWWPLRR	SEQ ID NO 130
20	HH131	ILPWKWPWWPWLR	SEQ ID NO 131
	HH132	ILPWKWPWWPWRL	SEQ ID NO 132
	HH133	MLPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 133
25	HH134	IMPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 134
	HH135	ILMWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 135
	HH136	ILPMKWPWWPWRR	SEQ ID NO 136
30	HH137	ILPMMWPWWPWRR	SEQ ID NO 137
	HH138	ILPWKMPWWPWRR	SEQ ID NO 138
	HH139	ILPWKWMWWPWRR	SEQ ID NO 139
35	HH140	ILPWKWPMPWRR	SEQ ID NO 140
	HH141	ILPWKWPWMPWRR	SEQ ID NO 141
	HH142	ILPWKWPWMMWRR	SEQ ID NO 142
40	HH143	ILPWKWPWPMRR	SEQ ID NO 143
	HH144	ILPWKWPWWPMMR	SEQ ID NO 144
	HH145	ILPWKWPWWPWMM	SEQ ID NO 145
45	HH146	NLPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 146
	HH147	INPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 147
	HH148	ILNWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 148
50	HH149	ILPNKWPWWPWRR	SEQ ID NO 149
	HH150	ILPWNWPWWPWRR	SEQ ID NO 150
	HH151	ILPWKNPWWPWRR	SEQ ID NO 151
55	HH152	ILPWKWNWWPWRR	SEQ ID NO 152
	HH153	ILPWKWPNNPWRR	SEQ ID NO 153
	HH154	ILPWKWPNNPWRR	SEQ ID NO 154
60	HH155	ILPWKWPWWNWRR	SEQ ID NO 155
	HH156	ILPWKWPWWPNRR	SEQ ID NO 156
	HH157	ILPWKWPWWPNRR	SEQ ID NO 157
65	HH158	ILPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 158

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH159	PLPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 159
	HH160	IPPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 160
	HH161	ILPPKWPWWPWRR	SEQ ID NO 161
10	HH162	ILPWPWPWWPWRR	SEQ ID NO 162
	HH163	ILPWKPPWWPWRR	SEQ ID NO 163
	HH164	ILPWKWPWPWWPWRR	SEQ ID NO 164
15	HH165	ILPWKWPWPPWRR	SEQ ID NO 165
	HH166	ILPWKWPWNPPRR	SEQ ID NO 166
	HH167	ILPWKWPWWPWPR	SEQ ID NO 167
20	HH168	ILPWKWPWWPWPRP	SEQ ID NO 168
	HH169	QLPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 169
	HH170	IQPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 170
25	HH171	ILQWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 171
	HH172	ILPQKWPWWPWRR	SEQ ID NO 172
	HH173	ILPWQWPWWPWRR	SEQ ID NO 173
30	HH174	ILPWKQPWWPWRR	SEQ ID NO 174
	HH175	ILPWKWQWWPWRR	SEQ ID NO 175
	HH176	ILPWKWPQWPWRR	SEQ ID NO 176
	HH177	ILPWKWPWQPWRR	SEQ ID NO 177
35	HH178	ILPWKWPWWQWRR	SEQ ID NO 178
	HH179	ILPWKWPWWPQRR	SEQ ID NO 179
	HH180	ILPWKWPWWPWQR	SEQ ID NO 180
40	HH181	ILPWKWPWWPWQRQ	SEQ ID NO 181
	HH182	RLPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 182
	HH183	IRPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 183
45	HH184	ILRWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 184
	HH185	ILPRKWPWWPWRR	SEQ ID NO 185
	HH186	ILPWRWPWWPWRR	SEQ ID NO 186
50	HH187	ILPWKRPWWPWRR	SEQ ID NO 187
	HH188	ILPWKWRWWPWRR	SEQ ID NO 188
	HH189	ILPWKWPWPWWPWRR	SEQ ID NO 189
55	HH190	ILPWKWPWRPWRR	SEQ ID NO 190
	HH191	ILPWRWPWWRWRR	SEQ ID NO 191
	HH192	ILPWKWPWWPRRR	SEQ ID NO 192
60	HH193	SLPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 193
	HH194	ISPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 194
	HH195	ILSWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 195
65	HH196	ILPSKWPWWPWRR	SEQ ID NO 196

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH197	ILPWSWPWWPWRR	SEQ ID NO 197
	HH198	ILPWKSPWWPWRR	SEQ ID NO 198
	HH199	ILPWKWSWWPWRR	SEQ ID NO 199
10	HH200	ILPWKWPSPWRR	SEQ ID NO 200
	HH201	ILPWKWPWSPWRR	SEQ ID NO 201
	HH202	ILPWKWPWWSWRR	SEQ ID NO 202
15	HH203	ILPWRWPWWPSRR	SEQ ID NO 203
	HH204	ILPWKWPWWPWSR	SEQ ID NO 204
	HH205	ILPWKWPWWPWRS	SEQ ID NO 205
20	HH206	TLPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 206
	HH207	ITPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 207
	HH208	ILTWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 208
25	HH209	ILPTKWPWWPWRR	SEQ ID NO 209
	HH210	ILPWTWPWWPWRR	SEQ ID NO 210
	HH211	ILPWKTPWWPWRR	SEQ ID NO 211
30	HH212	ILPWKWTWWPWRR	SEQ ID NO 212
	HH213	ILPWKWPTWPWRR	SEQ ID NO 213
	HH214	ILPWKWPWTPWRR	SEQ ID NO 214
	HH215	ILPWRWPWWTWRR	SEQ ID NO 215
35	HH216	ILPWKWPWWPTRR	SEQ ID NO 216
	HH217	ILPWKWPWWPWTR	SEQ ID NO 217
	HH218	ILPWKWPWWPWRT	SEQ ID NO 218
40	HH219	VLPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 219
	HH220	IVPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 220
	HH221	ILVWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 221
45	HH222	ILPVKWPWWPWRR	SEQ ID NO 222
	HH223	ILPWWPWWPWRR	SEQ ID NO 223
	HH224	ILPWKVPWWPWRR	SEQ ID NO 224
50	HH225	ILPWKWWWWPWRR	SEQ ID NO 225
	HH226	ILPWKWPVWPWRR	SEQ ID NO 226
	HH227	ILPWKWPWVPWRR	SEQ ID NO 227
55	HH228	ILPWKWPWWWRR	SEQ ID NO 228
	HH229	ILPWKWPWWPVRR	SEQ ID NO 229
	HH230	ILPWKWPWWPWVR	SEQ ID NO 230
60	HH231	ILPWKWPWWPWV	SEQ ID NO 231
	HH232	WLPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 232
	HH233	WPPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 233
65	HH234	ILWWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 234

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH235	ILPWWWPWWPWRR	SEQ ID NO 235
	HH236	ILPWKWWWWPWRR	SEQ ID NO 236
	HH237	ILPWKWPWWWWRR	SEQ ID NO 237
10	HH238	ILPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 238
	HH239	ILPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 239
	HH240	YLPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 240
15	HH241	IYPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 241
	HH242	ILYWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 242
	HH243	ILPYKWPWWPWRR	SEQ ID NO 243
20	HH244	ILPWYWPWWPWRR	SEQ ID NO 244
	HH245	ILPWKYPWWPWRR	SEQ ID NO 245
	HH246	ILPWKWYWWPWRR	SEQ ID NO 246
	HH247	ILPWKWPYWPWRR	SEQ ID NO 247
25	HH248	ILPWKWPWYPWRR	SEQ ID NO 248
	HH249	ILPWKWPWWYWRR	SEQ ID NO 249
	HH250	ILPWKWPWWPYRR	SEQ ID NO 250
30	HH251	ILPWKWPWWPWYR	SEQ ID NO 251
	HH252	ILPWKWPWWPWRY	SEQ ID NO 252
	HH253	ARLRIRVA VIRA	SEQ ID NO 253
35	HH254	DRLRIRVA VIRA	SEQ ID NO 254
	HH255	ERLRIRVA VIRA	SEQ ID NO 255
	HH256	FRLRIRVA VIRA	SEQ ID NO 256
40	HH257	GRLRIRVA VIRA	SEQ ID NO 257
	HH258	HRLRIRVA VIRA	SEQ ID NO 258
	HH259	IRLRIRVA VIRA	SEQ ID NO 259
45	HH260	KRLRIRVA VIRA	SEQ ID NO 260
	HH261	LRLRIRVA VIRA	SEQ ID NO 261
	HH262	MRLRIRVA VIRA	SEQ ID NO 262
50	HH263	NRLRIRVA VIRA	SEQ ID NO 263
	HH264	PRLRIRVA VIRA	SEQ ID NO 264
	HH265	QLRIRVA VIRA	SEQ ID NO 265
55	HH266	RRLRIRVA VIRA	SEQ ID NO 266
	HH267	SRLRIRVA VIRA	SEQ ID NO 267
	HH268	TRLRIRVA VIRA	SEQ ID NO 268
60	HH269	WRLRIRVA VIRA	SEQ ID NO 269
	HH270	YRLRIRVA VIRA	SEQ ID NO 270
	HH271	VALRIRVA VIRA	SEQ ID NO 271
65	HH272	VDLRIRVA VIRA	SEQ ID NO 272

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH273	VELRIRVAVIRA	SEQ ID NO 273
	HH274	VFLRIRVAVIRA	SEQ ID NO 274
	HH275	VGLRIRVAVIRA	SEQ ID NO 275
10	HH276	VHLRIRVAVIRA	SEQ ID NO 276
	HH277	VILRIRVAVIRA	SEQ ID NO 277
	HH278	VKLRIRVAVIRA	SEQ ID NO 278
15	HH279	VLLRIRVAVIRA	SEQ ID NO 279
	HH280	VMLRIRVAVIRA	SEQ ID NO 280
	HH281	VNLRIRVAVIRA	SEQ ID NO 281
20	HH282	VPLRIRVAVIRA	SEQ ID NO 282
	HH283	VQLRIRVAVIRA	SEQ ID NO 283
	HH284	VSLRIRVAVIRA	SEQ ID NO 284
25	HH285	VTLRIRVAVIRA	SEQ ID NO 285
	HH286	VWLRIRVAVIRA	SEQ ID NO 286
	HH287	VWLRIRVAVIRA	SEQ ID NO 287
	HH288	VYLRIRVAVIRA	SEQ ID NO 288
30	HH289	VRARIRVAVIRA	SEQ ID NO 289
	HH290	VRDRIRVAVIRA	SEQ ID NO 290
	HH291	VRERIRVAVIRA	SEQ ID NO 291
35	HH292	VRFRIRVAVIRA	SEQ ID NO 292
	HH293	VRGRIRVAVIRA	SEQ ID NO 293
	HH294	VRHRIRVAVIRA	SEQ ID NO 294
40	HH295	VRIRIRVAVIRA	SEQ ID NO 295
	HH296	VRKRIRVAVIRA	SEQ ID NO 296
	HH297	VRMRIRVAVIRA	SEQ ID NO 297
45	HH298	VRNRIRVAVIRA	SEQ ID NO 298
	HH299	VRPRIRVAVIRA	SEQ ID NO 299
	HH300	VRQRIRVAVIRA	SEQ ID NO 300
50	HH301	VRRRIRVAVIRA	SEQ ID NO 301
	HH302	VRSRIRVAVIRA	SEQ ID NO 302
	HH303	VRTRIRVAVIRA	SEQ ID NO 303
55	HH304	VRVRIRVAVIRA	SEQ ID NO 304
	HH305	VRWRIRVAVIRA	SEQ ID NO 305
	HH306	VRYSRIRVAVIRA	SEQ ID NO 306
60	HH307	VRLAIRVAVIRA	SEQ ID NO 307
	HH308	VRLDIRVAVIRA	SEQ ID NO 308
	HH309	VRLEIRVAVIRA	SEQ ID NO 309
65	HH310	VRLFIRVAVIRA	SEQ ID NO 310

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH311	VRLGIRVAVIRA	SEQ ID NO 311
	HH312	VRLHIRVAVIRA	SEQ ID NO 312
	HH313	VRLIIRVAVIRA	SEQ ID NO 313
10	HH314	VRLKIRVAVIRA	SEQ ID NO 314
	HH315	VRLLRVAVIRA	SEQ ID NO 315
	HH316	VRLMIRVAVIRA	SEQ ID NO 316
15	HH317	VRLNIRVAVIRA	SEQ ID NO 317
	HH318	VRLPIRVAVIRA	SEQ ID NO 318
	HH319	VRLQIRVAVIRA	SEQ ID NO 319
20	HH320	VRLSIRVAVIRA	SEQ ID NO 320
	HH321	VRLTIRVAVIRA	SEQ ID NO 321
	HH322	VRLVIRVAVIRA	SEQ ID NO 322
25	HH323	VRLWIRVAVIRA	SEQ ID NO 323
	HH324	VRLYIRVAVIRA	SEQ ID NO 324
	HH325	VRLRARVAVIRA	SEQ ID NO 325
30	HH326	VRLRDRVAVIRA	SEQ ID NO 326
	HH327	VRLRERVAVIRA	SEQ ID NO 327
	HH328	VRLRFRVAVIRA	SEQ ID NO 328
	HH329	VRLRGRVAVIRA	SEQ ID NO 329
35	HH330	VRLRHRVAVIRA	SEQ ID NO 330
	HH331	VRLRKRVAVIRA	SEQ ID NO 331
	HH332	VRLRLRVAVIRA	SEQ ID NO 332
40	HH333	VRLRMRVAVIRA	SEQ ID NO 333
	HH334	VRLRNRVAVIRA	SEQ ID NO 334
	HH335	VRLRPRVAVIRA	SEQ ID NO 335
45	HH336	VRLRQRVAVIRA	SEQ ID NO 336
	HH337	VRLRRRVAVIRA	SEQ ID NO 337
	HH338	VRLRSRVAVIRA	SEQ ID NO 338
50	HH339	VRLRTRVAVIRA	SEQ ID NO 339
	HH340	VRLRVRVAVIRA	SEQ ID NO 340
	HH341	VRLRWRVAVIRA	SEQ ID NO 341
55	HH342	VRLRYRVAVIRA	SEQ ID NO 342
	HH343	VRLRIAVAVIRA	SEQ ID NO 343
	HH344	VRLRIDVAVIRA	SEQ ID NO 344
60	HH345	VRLRIEVAVIRA	SEQ ID NO 345
	HH346	VRLRIFVAVIRA	SEQ ID NO 346
	HH347	VRLRIGVAVIRA	SEQ ID NO 347
65	HH348	VRLRIHVAVIRA	SEQ ID NO 348

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH349	VRLRIIVAVIRA	SEQ ID NO 349
	HH350	VRLRIKVA VIRA	SEQ ID NO 350
	HH351	VRLRILVAVIRA	SEQ ID NO 351
10	HH352	VRLRIMVAVIRA	SEQ ID NO 352
	HH353	VRLRINVA VIRA	SEQ ID NO 353
	HH354	VRLRIPVA VIRA	SEQ ID NO 354
15	HH355	VRLRIQVA VIRA	SEQ ID NO 355
	HH356	VRLRISVA VIRA	SEQ ID NO 356
	HH357	VRLRITVAVIRA	SEQ ID NO 357
20	HH358	VRLRIVVA VIRA	SEQ ID NO 358
	HH359	VRLRIWVAVIRA	SEQ ID NO 359
	HH360	VRLRIYVA VIRA	SEQ ID NO 360
25	HH361	VRLRIRAAVIRA	SEQ ID NO 361
	HH362	VRLRIRDA VIRA	SEQ ID NO 362
	HH363	VRLRIREA VIRA	SEQ ID NO 363
	HH364	VRLRIRFA VIRA	SEQ ID NO 364
30	HH365	VRLRIRGA VIRA	SEQ ID NO 365
	HH366	VRLRIRHA VIRA	SEQ ID NO 366
	HH367	VRLRIRIAVIRA	SEQ ID NO 367
35	HH368	VRLRIRKA VIRA	SEQ ID NO 368
	HH369	VRLRIRLA VIRA	SEQ ID NO 369
	HH370	VRLRIRMAVIRA	SEQ ID NO 370
40	HH371	VRLRIRNA VIRA	SEQ ID NO 371
	HH372	VRLRIRPA VIRA	SEQ ID NO 372
	HH373	VRLRIRQA VIRA	SEQ ID NO 373
45	HH374	VRLRIRRA VIRA	SEQ ID NO 374
	HH375	VRLRIRSA VIRA	SEQ ID NO 375
	HH376	VRLRIRTA VIRA	SEQ ID NO 376
50	HH377	VRLRIRWAVIRA	SEQ ID NO 377
	HH378	VRLRIRYA VIRA	SEQ ID NO 378
	HH379	VRLRIRVDVIRA	SEQ ID NO 379
55	HH380	VRLRIRVEVIRA	SEQ ID NO 380
	HH381	VRLRIRVFVIRA	SEQ ID NO 381
	HH382	VRLRIRVG VIRA	SEQ ID NO 382
60	HH383	VRLRIRVH VIRA	SEQ ID NO 383
	HH384	VRLRIRVI VIRA	SEQ ID NO 384
	HH385	VRLRIRVKVIRA	SEQ ID NO 385
65	HH386	VRLRIRVLVIRA	SEQ ID NO 386

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH387	VRLRIRVMVIRA	SEQ ID NO 387
	HH388	VRLRIRVNVIRA	SEQ ID NO 388
	HH389	VRLRIRVPVIRA	SEQ ID NO 389
10	HH390	VRLRIRVQVIRA	SEQ ID NO 390
	HH391	VRLRIRVRVIRA	SEQ ID NO 391
	HH392	VRLRIRVSVIRA	SEQ ID NO 392
15	HH393	VRLRIRVTVIRA	SEQ ID NO 393
	HH394	VRLRIRVVVIRA	SEQ ID NO 394
	HH395	VRLRIRVWVIRA	SEQ ID NO 395
20	HH396	VRLRIRVYVIRA	SEQ ID NO 396
	HH397	VRLRIRVAAIRA	SEQ ID NO 397
	HH398	VRLRIRVADIRA	SEQ ID NO 398
25	HH399	VRLRIRVAEIRA	SEQ ID NO 399
	HH400	VRLRIRVAFIRA	SEQ ID NO 400
	HH401	VRLRIRVAGIRA	SEQ ID NO 401
30	HH402	VRLRIRVAHIRA	SEQ ID NO 402
	HH403	VRLRIRVAIIRA	SEQ ID NO 403
	HH404	VRLRIRVAKIRA	SEQ ID NO 404
	HH405	VRLRIRVALIRA	SEQ ID NO 405
35	HH406	VRLRIRVAMIRA	SEQ ID NO 406
	HH407	VRLRIRVANIRA	SEQ ID NO 407
	HH408	VRLRIRVAPIRA	SEQ ID NO 408
40	HH409	VRLRIRVAQIRA	SEQ ID NO 409
	HH410	VRLRIRVARIRA	SEQ ID NO 410
	HH411	VRLRIRVASIRA	SEQ ID NO 411
45	HH412	VRLRIRVATIRA	SEQ ID NO 412
	HH413	VRLRIRVAWIRA	SEQ ID NO 413
	HH414	VRLRIRVAYIRA	SEQ ID NO 414
50	HH415	VRLRIRVAVARA	SEQ ID NO 415
	HH416	VRLRIRVAVDRA	SEQ ID NO 416
	HH417	VRLRIRVAVERA	SEQ ID NO 417
55	HH418	VRLRIRVAVFRA	SEQ ID NO 418
	HH419	VRLRIRVAVGRA	SEQ ID NO 419
	HH420	VRLRIRVAVHRA	SEQ ID NO 420
60	HH421	VRLRIRVAVKRA	SEQ ID NO 421
	HH422	VRLRIRVAVLRA	SEQ ID NO 422
	HH423	VRLRIRVAVMRA	SEQ ID NO 423
65	HH424	VRLRIRVAVNRA	SEQ ID NO 424

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH425	VRLRIRVAVPRA	SEQ ID NO 425
	HH426	VRLRIRVAVQRA	SEQ ID NO 426
	HH427	VRLRIRVAVRRA	SEQ ID NO 427
10	HH428	VRLRIRVAVSRA	SEQ ID NO 428
	HH429	VRLRIRVAVTRA	SEQ ID NO 429
	HH430	VRLRIRVAVVRA	SEQ ID NO 430
15	HH431	VRLRIRVAVWRA	SEQ ID NO 431
	HH432	VRLRIRVAVYRA	SEQ ID NO 432
	HH433	VRLRIRVAVIAA	SEQ ID NO 433
20	HH434	VRLRIRVAVIDA	SEQ ID NO 434
	HH435	VRLRIRVAVIEA	SEQ ID NO 435
	HH436	VRLRIRVAVIFA	SEQ ID NO 436
25	HH437	VRLRIRVAVIGA	SEQ ID NO 437
	HH438	VRLRIRVAVIHA	SEQ ID NO 438
	HH439	VRLRIRVAVIAA	SEQ ID NO 439
30	HH440	VRLRIRVAVIKA	SEQ ID NO 440
	HH441	VRLRIRVAVILA	SEQ ID NO 441
	HH442	VRLRIRVAVIMA	SEQ ID NO 442
	HH443	VRLRIRVAVINA	SEQ ID NO 443
35	HH444	VRLRIRVAVIPA	SEQ ID NO 444
	HH445	VRLRIRVAVIQA	SEQ ID NO 445
	HH446	VRLRIRVAVISA	SEQ ID NO 446
40	HH447	VRLRIRVAVITA	SEQ ID NO 447
	HH448	VRLRIRVAVIVA	SEQ ID NO 448
	HH449	VRLRIRVAVIWA	SEQ ID NO 449
45	HH450	VRLRIRVAVIYA	SEQ ID NO 450
	HH451	VRLRIRVAVIRD	SEQ ID NO 451
	HH452	VRLRIRVAVIRE	SEQ ID NO 452
50	HH453	VRLRIRVAVIRF	SEQ ID NO 453
	HH454	VRLRIRVAVIRG	SEQ ID NO 454
	HH455	VRLRIRVAVIRH	SEQ ID NO 455
55	HH456	VRLRIRVAVIRI	SEQ ID NO 456
	HH457	VRLRIRVAVIRK	SEQ ID NO 457
	HH458	VRLRIRVAVIRL	SEQ ID NO 458
60	HH459	VRLRIRVAVIRM	SEQ ID NO 459
	HH460	VRLRIRVAVIRN	SEQ ID NO 460
	HH461	VRLRIRVAVIRP	SEQ ID NO 461
65	HH462	VRLRIRVAVIRQ	SEQ ID NO 462

ES 2 497 441 T3

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH463	VRLRIRVAIRR	SEQ ID NO 463
	HH464	VRLRIRVAIRS	SEQ ID NO 464
	HH465	VRLRIRVAIRT	SEQ ID NO 465
10	HH466	VRLRIRVAIRV	SEQ ID NO 466
	HH467	VRLRIRVAIRW	SEQ ID NO 467
	HH468	VRLRIRVAIRY	SEQ ID NO 468
15	HH469	RRRRVKWWR	SEQ ID NO 469
	HH470	WLRKKQGR	SEQ ID NO 470
	HH471	KWVRVYLRW	SEQ ID NO 471
20	HH472	GKVMISIVR	SEQ ID NO 472
	HH473	IKVVRWRWR	SEQ ID NO 473
	HH474	RRRRRWVRR	SEQ ID NO 474
25	HH475	HMNRFRVY	SEQ ID NO 475
	HH476	VRKRGSRM	SEQ ID NO 476
	HH477	RIIRTYKRG	SEQ NO 477
30	HH478	WWRWRLRI	SEQ ID NO 478
	HH479	WLNRLYIRL	SEQ NO 479
	HH480	IWRWTKWFW	SEQ ID NO 480
	HH481	RFKGSWKYR	SEQ ID NO 481
35	HH482	VWVIRKKKW	SEQ ID NO 482
	HH483	RGRRVWRLF	SEQ ID NO 483
	HH484	WRWRKVKQW	SEQ ID NO 484
40	HH485	WWKYWRKVI	SEQ ID NO 485
	HH486	WLVIRIKRI	SEQ ID NO 486
	HH487	WWRWWQRRW	SEQ ID NO 487
45	HH488	RKKWWWKIR	SEQ ID NO 488
	HH489	WWRKKIRRR	SEQ ID NO 489
	HH490	RYRRRWYIR	SEQ ID NO 490
50	HH491	LYRWWKVG	SEQ ID NO 491
	HH492	VRRRWFKWL	SEQ ID NO 492
	HH493	RRLWWWKWL	SEQ ID NO 493
55	HH494	WRFKWTRRG	SEQ ID NO 494
	HH495	KWWRHRRMW	SEQ ID NO 495
	HH496	RRKRWWWRT	SEQ ID NO 496
60	HH497	WRRKIVRVW	SEQ ID NO 497
	HH498	KLRRGSLWR	SEQ ID NO 498
	HH499	RVIWWWRRK	SEQ ID NO 499
65	HH500	TWRVWKVRW	SEQ ID NO 500

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH501	QRGIVWRK	SEQ ID NO 501
	HH502	GKWWKWGIW	SEQ ID NO 502
	HH503	RVRRWWFVR	SEQ ID NO 503
10	HH504	FWRRRVKWR	SEQ ID NO 504
	HH505	FRRYQNIWR	SEQ ID NO 505
	HH506	RFWRWIFKW	SEQ ID NO 506
15	HH507	KRNVKRNWK	SEQ ID NO 507
	HH508	WYSLIIFKR	SEQ ID NO 508
	HH509	RKNRRIRVV	SEQ ID NO 509
20	HH510	FFRKRWRRI	SEQ ID NO 510
	HH511	WKIRKVIKW	SEQ ID NO 511
	HH512	IKWYWRKKK	SEQ ID NO 512
25	HH513	KRGWRKRWW	SEQ ID NO 513
	HH514	RKWMGRRIR	SEQ ID NO 514
	HH515	WKGKRRVI	SEQ ID NO 515
30	HH516	KVIRYKVYI	SEQ ID NO 516
	HH517	RRTRKWILR	SEQ ID NO 517
	HH518	YNWNWLRRW	SEQ ID NO 518
	HH519	KWKHWRWQW	SEQ ID NO 519
35	HH520	RKIVVKVRV	SEQ ID NO 520
	HH521	QYLGWRFKW	SEQ ID NO 521
	HH522	KIKTRKVKY	SEQ ID NO 522
40	HH523	VWIRWRRRW	SEQ ID NO 523
	HH524	WGVRVRLI	SEQ ID NO 524
	HH525	WWKRVWKFI	SEQ ID NO 525
45	HH526	YWIYSRLRR	SEQ ID NO 526
	HH527	RRYWKFKRR	SEQ ID NO 527
	HH528	IVRRVIIRV	SEQ ID NO 528
50	HH529	ARRRGLKVV	SEQ ID NO 529
	HH530	RRWRRWWR	SEQ ID NO 530
	HH531	WKWKWKWQS	SEQ ID NO 531
55	HH532	RWKVKQRRR	SEQ ID NO 532
	HH533	YWTKFRLRI	SEQ ID NO 533
	HH534	WWIKVRIRW	SEQ ID NO 534
60	HH535	ARVQVYKYR	SEQ ID NO 535
	HH536	KWRWHWVYV	SEQ ID NO 536
	HH537	KVKYKFRRW	SEQ ID NO 537
65	HH538	RFRKRKNRI	SEQ ID NO 538

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH539	MFRRRFIWK	SEQ ID NO 539
	HH540	WRLRRFRLW	SEQ ID NO 540
	HH541	WQIRIRIWW	SEQ ID NO 541
10	HH542	RRYHWRIYI	SEQ ID NO 542
	HH543	SRFWRRWRK	SEQ ID NO 543
	HH544	YRVWIIRRK	SEQ ID NO 544
15	HH545	WRVSWLIWR	SEQ ID NO 545
	HH546	RFVKKRIVW	SEQ ID NO 546
	HH547	RIYKIRWII	SEQ ID NO 547
20	HH548	RKFWHRGTI	SEQ ID NO 548
	HH549	AWVVWRKRW	SEQ ID NO 549
	HH550	WWGKVRWG	SEQ ID NO 550
25	HH551	FGIRFRMV	SEQ ID NO 551
	HH552	FWIRKVFRI	SEQ ID NO 552
	HH553	KRWRYRVVW	SEQ ID NO 553
	HH554	KIRIWRIVW	SEQ ID NO 554
30	HH555	RGRWKRIKK	SEQ ID NO 555
	HH556	RLWFLVLR	SEQ ID NO 556
	HH557	IIRVTRWTK	SEQ ID NO 557
35	HH558	AMWRWKWRK	SEQ ID NO 558
	HH559	TRKYFGRFV	SEQ ID NO 559
	HH560	ARRVKKKRR	SEQ ID NO 560
40	HH561	RWWKIWKRR	SEQ ID NO 561
	HH562	RWRKYIQKW	SEQ ID NO 562
	HH563	RVGIKIMK	SEQ ID NO 563
45	HH564	WWLKLRYKW	SEQ ID NO 564
	HH565	FRRKWIFKK	SEQ ID NO 565
	HH566	WQKLWRQR	SEQ ID NO 566
50	HH567	RIVRLHVRK	SEQ ID NO 567
	HH568	VRIGWRRVK	SEQ ID NO 568
	HH569	RRRIGIKRF	SEQ ID NO 569
55	HH570	RRRRKKVRI	SEQ ID NO 570
	HH571	KLWRYKRWR	SEQ ID NO 571
	HH572	RIRRFIKKW	SEQ ID NO 572
60	HH573	LWHKKKKIW	SEQ ID NO 573
	HH574	LTRRFWLRR	SEQ ID NO 574
	HH575	RRRYVIRRR	SEQ ID NO 575
65	HH576	WGWRWMIK	SEQ ID NO 576

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH577	RWRWQRGRF	SEQ ID NO 577
	HH578	RRKKWKVRI	SEQ ID NO 578
	HH579	KMKLYKGSM	SEQ ID NO 579
10	HH580	GTIRWWRRR	SEQ ID NO 580
	HH581	SLRRYIWRP	SEQ ID NO 581
	HH582	GRYWKKWRR	SEQ ID NO 582
15	HH583	WIRQFRWKK	SEQ ID NO 583
	HH584	AKVRRIKHW	SEQ ID NO 584
	HH585	YSRRKTWWI	SEQ ID NO 585
20	HH586	RGRWWIRRQ	SEQ ID NO 586
	HH587	WVFRWVWWR	SEQ ID NO 587
	HH588	VYRVWWLKW	SEQ ID NO 588
	HH589	WVRRRVGW	SEQ ID NO 589
25	HH590	WFKIKRLYL	SEQ ID NO 590
	HH591	WKMWKRJWT	SEQ ID NO 591
	HH592	RWWRKSRL	SEQ ID NO 592
30	HH593	FWRIRWWRW	SEQ ID NO 593
	HH594	VWVFGKRTT	SEQ ID NO 594
	HH595	VRIIWWWR	SEQ ID NO 595
35	HH596	WVRIWRWM	SEQ ID NO 596
	HH597	RKWKKWFHR	SEQ ID NO 597
	HH598	RKWKFWGYK	SEQ ID NO 598
40	HH599	FWYIWSKRV	SEQ ID NO 599
	HH600	YWRQFRRKQ	SEQ ID NO 600
	HH601	WWWKVKSR	SEQ ID NO 601
45	HH602	WRLWIIWR	SEQ ID NO 602
	HH603	QFRVNRRKY	SEQ ID NO 603
	HH604	RYRFWWVRR	SEQ ID NO 604
50	HH605	THIWLRRRR	SEQ ID NO 605
	HH606	RRRFRKRRM	SEQ ID NO 606
	HH607	LYTRVRRYS	SEQ ID NO 607
55	HH608	WSIRRLWWL	SEQ ID NO 608
	HH609	YKIKRRRYG	SEQ ID NO 609
	HH610	WKRIQFRRK	SEQ ID NO 610
60	HH611	HKKRRIWRK	SEQ ID NO 611
	HH612	WRLIRWWIR	SEQ ID NO 612
	HH613	LRKNWWWRR	SEQ ID NO 613
65	HH614	VKRIRIWM	SEQ ID NO 614

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH615	IRYRNWKWL	SEQ ID NO 615
	HH616	GRILSRRWK	SEQ ID NO 616
	HH617	KHWKIHVRW	SEQ ID NO 617
10	HH618	WYWKVWRR	SEQ ID NO 618
	HH619	KLWKVRNRR	SEQ ID NO 619
	HH620	RRVYYYKWV	SEQ ID NO 620
15	HH621	WRWGVFRLR	SEQ ID NO 621
	HH622	IWRVLKCRV	SEQ ID NO 622
	HH623	AKKFWRNWI	SEQ ID NO 623
	HH624	RQWRKVVKK	SEQ ID NO 624
20	HH625	GWKRWWVML	SEQ ID NO 625
	HH626	KWRRTRRRK	SEQ ID NO 626
	HH627	FRRMKRFLR	SEQ ID NO 627
25	HH628	RSWNWWWIR	SEQ ID NO 628
	HH629	WRRRIWINR	SEQ ID NO 629
	HH630	RWKWFYLR	SEQ ID NO 630
30	HH631	RKRTIWRRI	SEQ ID NO 631
	HH632	RRRVWRRR	SEQ ID NO 632
	HH633	KWRFKWWKR	SEQ ID NO 633
35	HH634	KWIWGWRRW	SEQ ID NO 634
	HH635	WIKRKWKMR	SEQ ID NO 635
	HH636	MWKKVLRV	SEQ ID NO 636
40	HH637	WRWRIFHWL	SEQ ID NO 637
	HH638	KIQRWKGKR	SEQ ID NO 638
	HH639	LWYKYWRWR	SEQ ID NO 639
45	HH640	YVRRIWKIT	SEQ ID NO 640
	HH641	RWRQYRSRW	SEQ ID NO 641
	HH642	VGRWKRRRW	SEQ ID NO 642
50	HH643	KSSRIYILF	SEQ ID NO 643
	HH644	AKWWWYRKI	SEQ ID NO 644
	HH645	FYWRWFRV	SEQ ID NO 645
55	HH646	RTRWLRYRR	SEQ ID NO 646
	HH647	WNIIWIRR	SEQ ID NO 647
	HH648	KRGFWWRRI	SEQ ID NO 648
	HH649	RRRKKYIIR	SEQ ID NO 649
60	HH650	VWKVGWYYR	SEQ ID NO 650
	HH651	LKFSTGRVR	SEQ ID NO 651
65	HH652	RRWVRRKR	SEQ ID NO 652

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH653	RFWYMWKYV	SEQ ID NO 653
	HH654	WYVRWMGRR	SEQ ID NO 654
	HH655	WKRRMRRRK	SEQ ID NO 655
10	HH656	RVLRRVSWV	SEQ ID NO 656
	HH657	RRLRKKWGW	SEQ ID NO 657
	HH658	WYKKIRLII	SEQ ID NO 658
	HH659	IYIIIWRTK	SEQ ID NO 659
15	HH660	TWRMRVKVS	SEQ ID NO 660
	HH661	AWWKIRWRI	SEQ ID NO 661
	HH662	RVRRYRWSW	SEQ ID NO 662
20	HH663	IWRIRRFRI	SEQ ID NO 663
	HH664	KIRRKWWWF	SEQ ID NO 664
	HH665	RRFWWIKIR	SEQ ID NO 665
25	HH666	WYWWRVRRV	SEQ ID NO 666
	HH667	WYKLWRRKV	SEQ ID NO 667
	HH668	WWFSWRWRV	SEQ ID NO 668
30	HH669	RFKTRRGWR	SEQ ID NO 669
	HH670	WWIVRRRV	SEQ ID NO 670
	HH671	RRFKKWMYV	SEQ ID NO 671
35	HH672	RWYRVIRWK	SEQ ID NO 672
	HH673	YRWMVRWVR	SEQ ID NO 673
	HH674	KVRRYNRRR	SEQ ID NO 674
40	HH675	WVWNRRRVV	SEQ ID NO 675
	HH676	RWKWRWRWY	SEQ ID NO 676
	HH677	ARWRVRKWW	SEQ ID NO 677
45	HH678	KIKFVIIRR	SEQ ID NO 678
	HH679	WYWRVRLQW	SEQ ID NO 679
	HH680	YWWWKRRRR	SEQ ID NO 680
50	HH681	FIKRVRRRW	SEQ ID NO 681
	HH682	VSVVFRRRY	SEQ ID NO 682
	HH683	KFRVMVRVL	SEQ ID NO 683
55	HH684	WMIYKRRRR	SEQ ID NO 684
	HH685	IWIWRWRW	SEQ ID NO 685
	HH686	WKKKKIIRV	SEQ ID NO 686
60	HH687	RRGWRRRRR	SEQ ID NO 687
	HH688	WRWRKIWKW	SEQ ID NO 688
	HH689	WWRWKRRRI	SEQ ID NO 689
65	HH690	WKVRWKIRR	SEQ ID NO 690

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH691	RFWVRGRRS	SEQ ID NO 691
	HH692	RRWVLWRRR	SEQ ID NO 692
	HH693	KYIWKKRRY	SEQ ID NO 693
10	HH694	KWQWIRKIR	SEQ ID NO 694
	HH695	YWIRRRWRL	SEQ ID NO 695
	HH696	RVKWKWLH	SEQ ID NO 696
15	HH697	YVRQWKRRR	SEQ ID NO 697
	HH698	WKIVGVFRV	SEQ ID NO 698
	HH699	VIKYVRMWW	SEQ ID NO 699
20	HH700	RRRRVWRVR	SEQ ID NO 700
	HH701	RRRKIRVYR	SEQ ID NO 701
	HH702	RRNRWRRIR	SEQ ID NO 702
25	HH703	IRKWIWRRV	SEQ ID NO 703
	HH704	QRWRVRRRY	SEQ ID NO 704
	HH705	WWMIKIRN	SEQ ID NO 705
30	HH706	ARRRGRRVM	SEQ ID NO 706
	HH707	RRWHWRKRK	SEQ ID NO 707
	HH708	KRFLRKRKF	SEQ ID NO 708
	HH709	RWKGWYLRT	SEQ ID NO 709
35	HH710	WSWRGRRKF	SEQ ID NO 710
	HH711	KIIMKRRRW	SEQ ID NO 711
	HH712	VWKRFLHWR	SEQ ID NO 712
40	HH713	RLKRRKKWR	SEQ ID NO 713
	HH714	AVRKFRRT	SEQ ID NO 714
	HH715	IKQRFWWRT	SEQ ID NO 715
45	HH716	WKIVVWIK	SEQ ID NO 716
	HH717	LYRWVWKR	SEQ ID NO 717
	HH718	WWWRWRIK	SEQ ID NO 718
50	HH719	RLWRKWQWN	SEQ ID NO 719
	HH720	RVKLRWGWR	SEQ ID NO 720
	HH721	AWRYKRRIF	SEQ ID NO 721
55	HH722	KRWQIRGIT	SEQ ID NO 722
	HH723	KRWRWRWRW	SEQ ID NO 723
	HH724	KRWYKYRV	SEQ ID NO 724
60	HH725	VHWRWRFWK	SEQ ID NO 725
	HH726	FVGKTKRKR	SEQ ID NO 726
	HH727	RLRFGWFLF	SEQ ID NO 727
65	HH728	AKRWIWIQV	SEQ ID NO 728

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH729	RKYVRRWVY	SEQ ID NO 729
	HH730	YRVYWWWWWR	SEQ ID NO 730
	HH731	KRRKKRRVR	SEQ ID NO 731
10	HH732	KKVRFITW	SEQ ID NO 732
	HH733	KLWYWKKVV	SEQ ID NO 733
	HH734	WRWGLRWWQ	SEQ ID NO 734
15	HH735	AFFYRWWIR	SEQ ID NO 735
	HH736	WYWRRRRLK	SEQ ID NO 736
	HH737	YKFRWRIYI	SEQ ID NO 737
20	HH738	WLRKVWNWR	SEQ ID NO 738
	HH739	RVRFKVYRV	SEQ ID NO 739
	HH740	RWLSKIWRV	SEQ ID NO 740
25	HH741	RRRLGWRRG	SEQ ID NO 741
	HH742	KKWGGGLVK	SEQ ID NO 742
	HH743	YWWLWRKKR	SEQ ID NO 743
30	HH744	WRLWVKWR	SEQ ID NO 744
	HH745	GRRSTHWRI	SEQ ID NO 745
	HH746	KKKLFINTW	SEQ ID NO 746
35	HH747	VYRRRRVKG	SEQ ID NO 747
	HH748	KGWIIWKIV	SEQ ID NO 748
	HH749	VFHRIRRIK	SEQ ID NO 749
40	HH750	RLRLWKSQR	SEQ ID NO 750
	HH751	RRKVFKLRR	SEQ ID NO 751
	HH752	VWLKYYWFK	SEQ ID NO 752
45	HH753	VRWGRRRWV	SEQ ID NO 753
	HH754	RYNWVRRKK	SEQ ID NO 754
	HH755	KIRWRKYHL	SEQ ID NO 755
	HH756	VIWRWRKFY	SEQ ID NO 756
50	HH757	RRWWKWWWR	SEQ ID NO 757
	HH758	WRVKGKRSK	SEQ ID NO 758
	HH759	RWRTRRNIV	SEQ ID NO 759
55	HH760	WWFSIRLWR	SEQ ID NO 760
	HH761	YTWYIKKKR	SEQ ID NO 761
	HH762	VWRRRKYWR	SEQ ID NO 762
60	HH763	YLTRFVKYF	SEQ ID NO 763
	HH764	KRWKHIRRI	SEQ ID NO 764
	HH765	WIVWIRKRI	SEQ ID NO 765
65	HH766	RRWWIRIYK	SEQ ID NO 766

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH767	WFWRRKMIR	SEQ ID NO 767
	HH768	RYRRWVRKR	SEQ ID NO 768
	HH769	RKWWWKWR	SEQ ID NO 769
10	HH770	RIWMFKIFR	SEQ ID NO 770
	HH771	IVRVGIFRL	SEQ ID NO 771
	HH772	IIRLIKWW	SEQ ID NO 772
15	HH773	WVRRYQMRR	SEQ ID NO 773
	HH774	WQWMRYRR	SEQ ID NO 774
	HH775	KKWKVWRFG	SEQ ID NO 775
20	HH776	WRYWWTRRI	SEQ ID NO 776
	HH777	RIRKGWKWG	SEQ ID NO 777
	HH778	KKRRGNRVR	SEQ ID NO 778
	HH779	VMRKLRRRW	SEQ ID NO 779
25	HH780	RNRTHWWRK	SEQ ID NO 780
	HH781	RFTWWWRFK	SEQ ID NO 781
	HH782	KRIRYKRWH	SEQ ID NO 782
30	HH783	RWRRYGRVY	SEQ ID NO 783
	HH784	TVVKKRVKK	SEQ ID NO 784
	HH785	RKYRRRYRR	SEQ ID NO 785
35	HH786	YFRWWKRWI	SEQ ID NO 786
	HH787	WWQWIVWRK	SEQ ID NO 787
	HH788	RKRLYRWIK	SEQ ID NO 788
40	HH789	GWWKNNRWW	SEQ ID NO 789
	HH790	KWWWYWYRR	SEQ ID NO 790
	HH791	RFKWFIRRF	SEQ ID NO 791
45	HH792	RIRLWNIV	SEQ ID NO 792
	HH793	ARWMWRRWR	SEQ ID NO 793
	HH794	LVRWWGKR	SEQ ID NO 794
50	HH795	KRWLKWWRV	SEQ ID NO 795
	HH796	FVYRGWRRK	SEQ ID NO 796
	HH797	RRRWRIYKW	SEQ ID NO 797
55	HH798	KRWWQWRWF	SEQ ID NO 798
	HH799	KRVKRWVT	SEQ ID NO 799
	HH800	RFKYWRWWQ	SEQ ID NO 800
60	HH801	KRQWWRVFK	SEQ ID NO 801
	HH802	FKIVWRRR	SEQ ID NO 802
	HH803	QWWWKYRWK	SEQ ID NO 803
65	HH804	RWLRIRKVY	SEQ ID NO 804

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH805	RYKRVVYRH	SEQ ID NO 805
	HH806	KVRWKWWGW	SEQ ID NO 806
	HH807	WKVRIFKR	SEQ ID NO 807
10	HH808	AIWHKTRRL	SEQ ID NO 808
	HH809	IRQVRWRW	SEQ ID NO 809
	HH810	MKVWIRWRI	SEQ ID NO 810
15	HH811	QRRWWGRFK	SEQ ID NO 811
	HH812	NKRVWFIYR	SEQ ID NO 812
	HH813	RVVNWIKGGL	SEQ ID NO 813
20	HH814	RYRRFRVRW	SEQ ID NO 814
	HH815	KKVRRVIWW	SEQ ID NO 815
	HH816	WFRWKWRW	SEQ ID NO 816
25	HH817	KVWFRWRK	SEQ ID NO 817
	HH818	KYLRVIFY	SEQ ID NO 818
	HH819	FKRSWVQIV	SEQ ID NO 819
30	HH820	RWWFIRKWW	SEQ ID NO 820
	HH821	IRRWKRWWW	SEQ ID NO 821
	HH822	QKWYRQRN	SEQ ID NO 822
	HH823	VWRKWYRVK	SEQ ID NO 823
35	HH824	KKKLWRKFR	SEQ ID NO 824
	HH825	RRWWWWRFN	SEQ ID NO 825
	HH826	WFFKSKVYW	SEQ ID NO 826
40	HH827	RVVNLNWRW	SEQ ID NO 827
	HH828	RWRRNWMTK	SEQ ID NO 828
	HH829	WKIWKIRWF	SEQ ID NO 829
45	HH830	WWFWIRKY	SEQ ID NO 830
	HH831	RYVKIRWVR	SEQ ID NO 831
	HH832	RIWILSWRW	SEQ ID NO 832
50	HH833	KSWRKLFIW	SEQ ID NO 833
	HH834	VVVRWKIYW	SEQ ID NO 834
	HH835	KKRRFKRRY	SEQ ID NO 835
55	HH836	RFWKKIRRH	SEQ ID NO 836
	HH837	RKVVWRVIFY	SEQ ID NO 837
	HH838	YWRRKWRRK	SEQ ID NO 838
60	HH839	KRIRRWKWW	SEQ ID NO 839
	HH840	YWRYLWIRF	SEQ ID NO 840
	HH841	IYKWRWYW	SEQ ID NO 841
65	HH842	QTVYLIFRR	SEQ ID NO 842

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH843	AKKIKWLWV	SEQ ID NO 843
	HH844	YRFVRRWIV	SEQ ID NO 844
	HH845	VWRRYWWYR	SEQ ID NO 845
10	HH846	ARKWKYWRF	SEQ ID NO 846
	HH847	RKRVIKRW	SEQ ID NO 847
	HH848	RSFWWWWFK	SEQ ID NO 848
15	HH849	WRINIFKRI	SEQ ID NO 849
	HH850	RWRVLKRRK	SEQ ID NO 850
	HH851	RWWWIWWWK	SEQ ID NO 851
20	HH852	KLIRIWWWV	SEQ ID NO 852
	HH853	FKRKRWWGI	SEQ ID NO 853
	HH854	VWHWWRWRW	SEQ ID NO 854
25	HH855	WKRWLIIGR	SEQ ID NO 855
	HH856	AYRWWTRFK	SEQ ID NO 856
	HH857	SWWWIWLKK	SEQ ID NO 857
30	HH858	FVIWKYIRV	SEQ ID NO 858
	HH859	RWVRTRRRR	SEQ ID NO 859
	HH860	RRSWWYKRR	SEQ ID NO 860
35	HH861	RKYVWWKSI	SEQ ID NO 861
	HH862	WWKRYIVKK	SEQ ID NO 862
	HH863	WFIRVWR YR	SEQ ID NO 863
40	HH864	WKMWLRKHW	SEQ ID NO 864
	HH865	RRFFWKKGI	SEQ ID NO 865
	HH866	KRWFWSRR	SEQ ID NO 866
45	HH867	AVQRWRWV	SEQ ID NO 867
	HH868	IWKYGWRYK	SEQ ID NO 868
	HH869	IIKWMRRWR	SEQ ID NO 869
50	HH870	AFRKVKRWG	SEQ ID NO 870
	HH871	MGFTRKWQF	SEQ ID NO 871
	HH872	NWIRWRKWR	SEQ ID NO 872
	HH873	RIGRKLIR	SEQ ID NO 873
55	HH874	RWWRWRHVI	SEQ ID NO 874
	HH875	RLVSKRRRK	SEQ ID NO 875
	HH876	RRKYWKKYR	SEQ ID NO 876
60	HH877	IILWWYRRK	SEQ ID NO 877
	HH878	IYFWWWIR	SEQ ID NO 878
	HH879	HKRKWWRF	SEQ ID NO 879
65	HH880	IGRFWRRL	SEQ ID NO 880

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH881	RIRRVLVYV	SEQ ID NO 881
	HH882	WWLRGRRWL	SEQ ID NO 882
	HH883	VRIRKRRWR	SEQ ID NO 883
10	HH884	WWRRKWWRR	SEQ ID NO 884
	HH885	WWWRSFRKR	SEQ ID NO 885
	HH886	VGQKWRKRT	SEQ ID NO 886
15	HH887	FRRRYRVYR	SEQ ID NO 887
	HH888	RIRRKRKGR	SEQ ID NO 888
	HH889	WKWVTRMYI	SEQ ID NO 889
20	HH890	KVVRKKRLR	SEQ ID NO 890
	HH891	RKRRKHWRY	SEQ ID NO 891
	HH892	RVTRTWQRW	SEQ ID NO 892
25	HH893	RRRITRKRI	SEQ ID NO 893
	HH894	RLILIKKKW	SEQ ID NO 894
	HH895	WKRRWSR SR	SEQ ID NO 895
30	HH896	MWWWFLWRR	SEQ ID NO 896
	HH897	RWVRIWKKK	SEQ ID NO 897
	HH898	KRRVWRMWR	SEQ ID NO 898
	HH899	WHWWIRWWR	SEQ ID NO 899
35	HH900	WWRRLRWLV	SEQ ID NO 900
	HH901	KWWIWKRRR	SEQ ID NO 901
	HH902	RYGRKWMIW	SEQ ID NO 902
40	HH903	RVKKIKLFI	SEQ ID NO 903
	HH904	RIRYIQRVW	SEQ ID NO 904
	HH905	RLIRWWRKR	SEQ ID NO 905
45	HH906	QRGRWLRRG	SEQ ID NO 906
	HH907	RRRRWRKR	SEQ ID NO 907
	HH908	LGRRWRYRR	SEQ ID NO 908
50	HH909	FKIVHVKVR	SEQ ID NO 909
	HH910	FRKKYRVRR	SEQ ID NO 910
	HH911	WKYKYRIRL	SEQ ID NO 911
55	HH912	HVRRWWRII	SEQ ID NO 912
	HH913	RFKWWRRYW	SEQ ID NO 913
	HH914	RRRRMRKKI	SEQ ID NO 914
60	HH915	RRIRGRVGR	SEQ ID NO 915
	HH916	AFWRWIRFK	SEQ ID NO 916
	HH917	VKKRKIVY	SEQ ID NO 917
65	HH918	KRVKWTWRK	SEQ ID NO 918

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH919	TGVGRGYRI	SEQ ID NO 919
	HH920	LSWKWRRV	SEQ ID NO 920
	HH921	IKTFIKRWR	SEQ ID NO 921
10	HH922	KMRLKWKRR	SEQ ID NO 922
	HH923	WRWYVTRRK	SEQ ID NO 923
	HH924	IYRRRRKLR	SEQ ID NO 924
15	HH925	VWKWRRWW	SEQ ID NO 925
	HH926	KYKKGWRV	SEQ ID NO 926
	HH927	KWRRWYYWR	SEQ ID NO 927
	HH928	RRWFGRRY	SEQ ID NO 928
20	HH929	GFTWKKKRR	SEQ ID NO 929
	HH930	YKKIRIKRR	SEQ ID NO 930
	HH931	VWIRRIKRR	SEQ ID NO 931
25	HH932	VWKWRKIV	SEQ ID NO 932
	HH933	WRRKWWSRW	SEQ ID NO 933
	HH934	VTRRRTRIK	SEQ ID NO 934
30	HH935	RKRWFVYIW	SEQ ID NO 935
	HH936	IWKKRIMI	SEQ ID NO 936
	HH937	FNRWWWKKI	SEQ ID NO 937
35	HH938	RYKSRRVRR	SEQ ID NO 938
	HH939	VKVKKFVR	SEQ ID NO 939
	HH940	KWKWLQGRR	SEQ ID NO 940
40	HH941	KVRWWYNIK	SEQ ID NO 941
	HH942	FWFRIRIKLK	SEQ ID NO 942
	HH943	KRRKQRKYR	SEQ ID NO 943
45	HH944	AKNSKRRLW	SEQ ID NO 944
	HH945	RNRRIFRYS	SEQ ID NO 945
	HH946	RWTKWFLVR	SEQ ID NO 946
50	HH947	RIRTRRTR	SEQ ID NO 947
	HH948	KIRWWRISI	SEQ ID NO 948
	HH949	YKGRWGRRW	SEQ ID NO 949
55	HH950	MYYRIKQKW	SEQ ID NO 950
	HH951	WRIQRWRWQ	SEQ ID NO 951
	HH952	IRRWSYRRW	SEQ ID NO 952
	HH953	VRIWKIWW	SEQ ID NO 953
60	HH954	RWRWWWLWK	SEQ ID NO 954
	HH955	TKRRWIWT	SEQ ID NO 955
65	HH956	RRWHYKGGW	SEQ ID NO 956

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH957	WRIRKWWMR	SEQ ID NO 957
	HH958	KRRTRWWVR	SEQ ID NO 958
	HH959	RKWRVWKRR	SEQ ID NO 959
10	HH960	WRVWKIRVR	SEQ ID NO 960
	HH961	KYWGIGGWR	SEQ ID NO 961
	HH962	RLISRRRKK	SEQ ID NO 962
	HH963	VSRRIVRRM	SEQ ID NO 963
15	HH964	ITKWWRKRR	SEQ ID NO 964
	HH965	KWKIQLWKI	SEQ ID NO 965
	HH966	KKWTWWYVI	SEQ ID NO 966
20	HH967	SWKKNRKIW	SEQ ID NO 967
	HH968	HKRQYRKWF	SEQ ID NO 968
	HH969	IFKWFYRRK	SEQ ID NO 969
25	Bac2A	RLARIVVIRVAR	SEQ ID NO 970
	Indolicidin	ILPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO 971
	Scrambled	VRLRIRVAVIRA	SEQ ID NO 972
30	HH970	ILKWKWPWWKWRR	SEQ ID NO 973
	HH971	ILPWKWRWWKWRR	SEQ ID NO 974
	HH972	FLPKKFRWWKYRK	SEQ ID NO 975
35	HH973	FIKWKFRWWKWRK	SEQ ID NO 976
	HH974	KWPWWPWRR	SEQ ID NO 977
	HH975	KWPWWPWVK	SEQ ID NO 978
40	HH976	KFPWWPWRR	SEQ ID NO 979
	HH977	KKPWWPWRR	SEQ ID NO 980
	HH978	KWRWWPWRR	SEQ ID NO 981
45	HH979	KWPKWPWRR	SEQ ID NO 982
	HH980	KWPWKPWRR	SEQ ID NO 983
	HH981	KWPWWKWRR	SEQ ID NO 984
50	HH982	KWPWWPKRR	SEQ ID NO 985
	HH983	KPIPWWPWRR	SEQ ID NO 986
	HH984	KFRWWPWRR	SEQ ID NO 987
55	HH985	KFRWWKWRR	SEQ ID NO 988
	HH986	KWRWWKKRR	SEQ ID NO 989
	HH987	KKKWWKWRR	SEQ ID NO 990
60	HH988	KFHWWIWRK	SEQ ID NO 991
	HH989	KFHWWKWRK	SEQ ID NO 992
	HH990	KFKWWKYRK	SEQ ID NO 993
65	HH991	KFKFFKYRK	SEQ ID NO 994

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HH992	KFKFFKFRK	SEQ ID NO 995
	HH993	PWWPWRR	SEQ ID NO 996
	HH994	KWWPWRR	SEQ ID NO 997
10	HH995	PWWKWRR	SEQ ID NO 998
	HH996	RWWPWRR	SEQ ID NO 999
	HH997	PKWPWRR	SEQ ID NO 1000
15	HH998	PWKPWRR	SEQ ID NO 1001
	HH999	PWWKWRR	SEQ ID NO 1002
	HH 1000	PWWPKRR	SEQ ID NO 1003
20	HH1001	PWWPWRR	SEQ ID NO 1004
	HH1002	RWWKWRR	SEQ ID NO 1005
	HH1003	RWWKWRK	SEQ ID NO 1006
25	HH1004	RFWKWRR	SEQ ID NO 1007
	HH1005	RWWIKRR	SEQ ID NO 1008
	HH1006	RWWIYRR	SEQ ID NO 1009
30	HH1007	RFFKFRR	SEQ ID NO 1010
	HH1008	KWWKWKK	SEQ ID NO 1011
	HH1009	KFFKFKK	SEQ ID NO 1012
35	HHC1	RWRWKRWWW	SEQ ID NO 1013
	HHC2	RWRRWKWWW	SEQ ID NO 1014
	HHC3	RWRRWRKWW	SEQ ID NO 1015
40	HHC4	RWRRKWWW	SEQ ID NO 1016
	HHC5	RWRWWKRWY	SEQ ID NO 1017
	HHC6	RRKRWWWWW	SEQ ID NO 1018
45	HHC7	RWRIKRW	SEQ ID NO 1019
	HHC8	KIWWWRKR	SEQ ID NO 1020
	HHC9	RWRRWKWWL	SEQ ID NO 1021
50	HHC10	KRWWKWRW	SEQ ID NO 1022
	HHC11	KRWWWWWKR	SEQ ID NO 1023
	HHC12	IRWWKRWW	SEQ ID NO 1024
	HHC13	IKRWWRWW	SEQ ID NO 1025
55	HHC14	RRKWWRWW	SEQ ID NO 1026
	HHC15	RKWWRWWR	SEQ ID NO 1027
	HHC16	KRWWWRFR	SEQ ID NO 1028
60	HHC17	IKRWWRRW	SEQ ID NO 1029
	HHC18	KRWWWWWKR	SEQ ID NO 1030
	HHC19	KWRRWKRWW	SEQ ID NO 1031
65	HHC20	WRWWKIWKR	SEQ ID NO 1032

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HHC21	WRWRWWKRW	SEQ ID NO 1033
	HHC22	WKRWKWWKR	SEQ ID NO 1034
	HHC23	RIKRWWWWR	SEQ ID NO 1035
10	HHC24	WRRRWRRW	SEQ ID NO 1036
	HHC25	KWWKIWWKR	SEQ ID NO 1037
	HHC26	RKRWLWRWW	SEQ ID NO 1038
15	HHC27	KRWRWWRWW	SEQ ID NO 1039
	HHC28	KKRWLWWWR	SEQ ID NO 1040
	HHC29	RWWRKWWIR	SEQ ID NO 1041
20	HHC30	KWWRWWRKW	SEQ ID NO 1042
	HHC31	KRWWIRWWR	SEQ ID NO 1043
	HHC32	KIWWWWRRR	SEQ ID NO 1044
	HHC33	RRRKWWIWW	SEQ ID NO 1045
25	HHC34	RRRWWWWWW	SEQ ID NO 1046
	HHC35	RWWIRKWWR	SEQ ID NO 1047
	HHC36	KRWWKWWRR	SEQ ID NO 1048
30	HHC37	KRWWRKWWR	SEQ ID NO 1049
	HHC38	RRWRWWWWW	SEQ ID NO 1050
	HHC39	IRRRKWWWWW	SEQ ID NO 1051
35	HHC40	KRKIWWWWIR	SEQ ID NO 1052
	HHC41	RKIWWWRIR	SEQ ID NO 1053
	HHC42	KRWWIWRIR	SEQ ID NO 1054
40	HHC43	RWFRWWKRW	SEQ ID NO 1055
	HHC44	WRWWWWKKWR	SEQ ID NO 1056
	HHC45	WKRWWKKWR	SEQ ID NO 1057
45	HHC46	WKRWRWIRW	SEQ ID NO 1058
	HHC47	WRWWKWWRR	SEQ ID NO 1059
	HHC48	WKKWWKRRW	SEQ ID NO 1060
50	HHC49	WRWYWWKKR	SEQ ID NO 1061
	HHC50	WRRWWKWWR	SEQ ID NO 1062
	HHC51	IRMWVKRWR	SEQ ID NO 1063
55	HHC52	RIWYWKRW	SEQ ID NO 1064
	HHC53	FRRWWKWFK	SEQ ID NO 1065
	HHC54	RVRWWKKRW	SEQ ID NO 1066
60	HHC55	RLKKVRWWW	SEQ ID NO 1067
	HHC56	RWWLKIRKW	SEQ ID NO 1068
	HHC57	LRWWMIKRI	SEQ ID NO 1069
65	HHC58	TRKVVWWRW	SEQ ID NO 1070

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HHC59	KRFWIWFWR	SEQ ID NO 1071
	HHC60	KKRWWVIR	SEQ ID NO 1072
	HHC61	KRWWYRYW	SEQ ID NO 1073
10	HHC62	IRKWRRWWK	SEQ ID NO 1074
	HHC63	RHWKTWWKR	SEQ ID NO 1075
	HHC64	RRFKKWWY	SEQ ID NO 1076
	HHC65	RIKVIWWWR	SEQ ID NO 1077
15	HHC66	RKRLKWWIY	SEQ ID NO 1078
	HHC67	LVFRKYWKR	SEQ ID NO 1079
	HHC68	RRRWWWIV	SEQ ID NO 1080
20	HHC69	KKRWWWIRY	SEQ ID NO 1081
	HHC70	RWRIKFKRW	SEQ ID NO 1082
	HHC71	KWKIFRRWW	SEQ ID NO 1083
25	HHC72	IWKRWKRL	SEQ ID NO 1084
	HHC73	RRRKWWIWG	SEQ ID NO 1085
	HHC74	RWLVLKRW	SEQ ID NO 1086
30	HHC75	RKWWRWFL	SEQ ID NO 1087
	HHC76	KRRRIWWWK	SEQ ID NO 1088
	HHC77	IWWKRRRW	SEQ ID NO 1089
35	HHC78	LRWRWWKIK	SEQ ID NO 1090
	HHC79	RWKMWWRWV	SEQ ID NO 1091
	HHC80	VKRYYRWR	SEQ ID NO 1092
40	HHC81	RWYRKRWSW	SEQ ID NO 1093
	HHC82	KRKLIRWWW	SEQ ID NO 1094
	HHC83	RWRWWIKI	SEQ ID NO 1095
45	HHC84	KFRKRWWWW	SEQ ID NO 1096
	HHC85	IWIWRKLRW	SEQ ID NO 1097
	HHC86	LRFILWWKR	SEQ ID NO 1098
50	HHC87	RVWFKRRWW	SEQ ID NO 1099
	HHC88	RRWFKWWY	SEQ ID NO 1100
	HHC89	KWWLWVKRK	SEQ ID NO 1101
55	HHC90	RWILWWWRI	SEQ ID NO 1102
	HHC91	KRWLTWRFR	SEQ ID NO 1103
	HHC92	RKWRWRWLK	SEQ ID NO 1104
60	HHC93	IRRRWWWIV	SEQ ID NO 1105
	HHC94	IKWWWRMRI	SEQ ID NO 1106
	HHC95	RWKIFIRWW	SEQ ID NO 1107
65	HHC96	IRQWRRWW	SEQ ID NO 1108

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HHC97	RRRKTWYWW	SEQ ID NO 1109
	HHC98	RRWWHLWRK	SEQ ID NO 1110
	HHC99	RRWWMRWWV	SEQ ID NO 1111
10	HHC100	RRFKFIRWW	SEQ ID NO 1112
	HHC101	INRKRRLRW	SEQ ID NO 1113
	HHC102	RRMKKLRRK	SEQ ID NO 1114
15	HHC103	RKVRWKIRV	SEQ ID NO 1115
	HHC104	VRIVRVRIR	SEQ ID NO 1116
	HHC105	IKRVKRRKR	SEQ ID NO 1117
20	HHC106	RVKTWRVRT	SEQ ID NO 1118
	HHC107	RVFVKIRMK	SEQ ID NO 1119
	HHC108	IRGRIIFWV	SEQ ID NO 1120
25	HHC109	ATWIWVFRR	SEQ ID NO 1121
	HHC110	KKSKQLWKR	SEQ ID NO 1122
	HHC111	MINRVRLRW	SEQ ID NO 1123
30	HHC112	GGIRRLRWY	SEQ ID NO 1124
	HHC113	RLVHWIRRV	SEQ ID NO 1125
	HHC114	AWKIKKGRI	SEQ ID NO 1126
	HHC115	FVVMKRIVW	SEQ ID NO 1127
35	HHC116	GIKWRSRRW	SEQ ID NO 1128
	HHC117	RWMVSKIWY	SEQ ID NO 1129
	HHC118	IVRVWVVR	SEQ ID NO 1130
40	HHC119	RWIGVIKY	SEQ ID NO 1131
	HHC120	WRKRSRIF	SEQ ID NO 1132
	HHC121	GWKILRKRK	SEQ ID NO 1133
45	HHC122	YQRLFVRIR	SEQ ID NO 1134
	HHC123	AVWKFVKRV	SEQ ID NO 1135
	HHC124	IRKKRRRWT	SEQ ID NO 1136
50	HHC125	ILRVISKRR	SEQ ID NO 1137
	HHC126	AWRFKNIRK	SEQ ID NO 1138
	HHC127	HYKFQRWIK	SEQ ID NO 1139
55	HHC128	RRIRVRWG	SEQ ID NO 1140
	HHC129	VLVKKRRRR	SEQ ID NO 1141
	HHC130	RWRGIVHIR	SEQ ID NO 1142
60	HHC131	WRNRKVVWR	SEQ ID NO 1143
	HHC132	KFWWWNYLK	SEQ ID NO 1144
	HHC133	KRIMKLKMR	SEQ ID NO 1145
65	HHC134	IRRRKKRIK	SEQ ID NO 1146

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HHC135	RKWMGRFLM	SEQ ID NO 1147
	HHC136	RRVQRGKWW	SEQ ID NO 1148
	HHC137	WHGVRWWKW	SEQ ID NO 1149
10	HHC138	WVRFVYRYW	SEQ ID NO 1150
	HHC139	RKRTKVTWI	SEQ ID NO 1151
	HHC140	IRRVRRKI	SEQ ID NO 1152
15	HHC141	KIRRKVRWG	SEQ ID NO 1153
	HHC142	AIRRWIRK	SEQ ID NO 1154
	HHC143	WRFKVLQR	SEQ ID NO 1155
20	HHC144	RSGKKRWRR	SEQ ID NO 1156
	HHC145	FMWVYRYKK	SEQ ID NO 1157
	HHC146	RGKYIRWRK	SEQ ID NO 1158
	HHC147	WVKVWKYTW	SEQ ID NO 1159
25	HHC148	VVLKIVRRF	SEQ ID NO 1160
	HHC149	GKFYKVVVR	SEQ ID NO 1161
	HHC 150	SWYRTRKRV	SEQ ID NO 1162
30	HHC151	KNRGRWFSH	SEQ ID NO 1163
	HHC152	AFRGSRRHM	SEQ ID NO 1164
	HHC153	GRNGWYRIN	SEQ ID NO 1165
35	HHC154	AGGMRKRTR	SEQ ID NO 1166
	HHC155	ATRKGYSKF	SEQ ID NO 1167
	HHC156	SSGVRWSWR	SEQ ID NO 1168
40	HHC157	RVWRNGYSR	SEQ ID NO 1169
	HHC158	WGRTRWSSR	SEQ ID NO 1170
	HHC159	GKRVWGRGR	SEQ ID NO 1171
45	HHC160	SFNWKRSGK	SEQ ID NO 1172
	HHC161	WGRGGWTNR	SEQ ID NO 1173
	HHC162	ANRWGRGIR	SEQ ID NO 1174
50	HHC163	WGGHKRRGW	SEQ ID NO 1175
	HHC164	WHGGQKWRK	SEQ ID NO 1176
	HHC165	FVWQKGTNR	SEQ ID NO 1177
55	HHC166	HGVWGNRKR	SEQ ID NO 1178
	HHC167	TRGWSLGTR	SEQ ID NO 1179
	HHC168	GRRVMNQKR	SEQ ID NO 1180
60	HHC169	RNKFGGNWR	SEQ ID NO 1181
	HHC170	GVRVQRNSK	SEQ ID NO 1182
	HHC171	NQKWSGRRR	SEQ ID NO 1183
65	HHC172	RQNGVWRVF	SEQ ID NO 1184

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	HHC173	GRMRLWNGR	SEQ ID NO 1185
	HHC174	WHYRSQVGR	SEQ ID NO 1186
	HHC175	GWNTMGRRW	SEQ ID NO 1187
10	HHC176	RRMGNGGFR	SEQ ID NO 1188
	HHC177	SKNVRTWRQ	SEQ ID NO 1189
	HHC178	ARGRWINGR	SEQ ID NO 1190
15	HHC179	GSRRSVWVF	SEQ ID NO 1191
	HHC180	WSQNVRTRI	SEQ ID NO 1192
	HHC181	GMRRWRGKN	SEQ ID NO 1193
20	HHC182	RGRTSNWKM	SEQ ID NO 1194
	HHC183	GRRWGMGVR	SEQ ID NO 1195
	HHC184	WGKRRGWNT	SEQ ID NO 1196
25	HHC185	AMLGGRQWR	SEQ ID NO 1197
	HHC186	QRNKGLRHH	SEQ ID NO 1198
	HHC187	ARGKSIKNR	SEQ ID NO 1199
30	HHC188	NRRNGQMRR	SEQ ID NO 1200
	HHC189	RGRRQIGKF	SEQ ID NO 1201
	HHC190	ASKRVGVRN	SEQ ID NO 1202
	HHC191	GRIGGKNVR	SEQ ID NO 1203
35	HHC192	NKTGYRWRN	SEQ ID NO 1204
	HHC193	VSGNWRGSR	SEQ ID NO 1205
	HHC194	GWGGKRRNF	SEQ ID NO 1206
40	HHC195	KNNRRWQGR	SEQ ID NO 1207
	HHC196	GRTMGNGRW	SEQ ID NO 1208
	HHC197	GRQISWGRT	SEQ ID NO 1209
45	HHC198	GGRGTRWHG	SEQ ID NO 1210
	HHC199	GVRSSWQRT	SEQ ID NO 1211
	HHC200	GSRRFGWNR	SEQ ID NO 1212
50	1001	LVRAIQVRAVIR	SEQ ID NO 1213
	1002	VQRWLIVWRIRK	SEQ ID NO 1214
	1003	IVWKIKRWWVGR	SEQ ID NO 1215
55	1004	RFWKVRVKYIRF	SEQ ID NO 1216
	1005	VQLRIRVAV	SEQ ID NO 1217
	1006	VQLRIWVRR	SEQ ID NO 1218
60	1007	WNRVKWIRR	SEQ ID NO 1219
	1008	RIKWIVRFR	SEQ ID NO 1220
	1009	AIRVVRARLVRR	SEQ ID NO 1221
65	1010	IRWRIRVWVRRRI	SEQ ID NO 1222

Continuación

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
5	1011	RRWVWVWVQRR	SEQ ID NO 1223
	1012	IFWRRIVIVKKF	SEQ ID NO 1224
	1013	VRLRIRVAV	SEQ ID NO 1225
10	1014	RQVIVRRW	SEQ ID NO 1226
	1015	VLIRWNGKK	SEQ ID NO 1227
	1016	LRIRWIFKR	SEQ ID NO 1228
15	1017	KRIVRRLVARIV	SEQ ID NO 1229
	1018	VRLIVAVRIWRR	SEQ ID NO 1230
	1019	IVWRRQLVKNK	SEQ ID NO 1231
20	1020	VRLRIRWWVLR	SEQ ID NO 1232
	1021	VRLRIRVAV	SEQ ID NO 1233
	1022	LRIRVIVWR	SEQ ID NO 1234
25	1023	IRVWVLRQR	SEQ ID NO 1235
	1024	RIRVIVLKK	SEQ ID NO 1236
	1025	RRIVKKFQIVRR	SEQ ID NO 1237
30	1026	VQWRIRVRVIKK	SEQ ID NO 1238
	1027	KKQVSRVKVWRK	SEQ ID NO 1239
	1028	LIQRIRVRNIVK	SEQ ID NO 1240
35	1029	KQFRIRVRV	SEQ ID NO 1241
	1030	FRIRVRVIR	SEQ ID NO 1242
	1031	WRWRVRVWR	SEQ ID NO 1243
40	1032	IRVRVIRK	SEQ ID NO 1244
	1033	RRVIVKKFRIRR	SEQ ID NO 1245
	1034	KQFRNRLRIVKK	SEQ ID NO 1246
45	1035	KRWRWIVRNIRR	SEQ ID NO 1247
	1036	VQFRIRVIVIRK	SEQ ID NO 1248
	1037	KRFRIRVRV	SEQ ID NO 1249
50	1038	IVRRVIRK	SEQ ID NO 1250
	1039	IWVIRRVWR	SEQ ID NO 1251
	1040	FQWKIKVR	SEQ ID NO 1252
	1041	VIWIRWR	SEQ ID NO 1253
55	1042	IVWIWRR	SEQ ID NO 1254
	1043	WVIWRR	SEQ ID NO 1255
	1044	RRWIVWI	SEQ ID NO 1256
60	1045	RWWRIVI	SEQ ID NO 1257
	1046	WRVIRW	SEQ ID NO 1258
	1047	IIRRWWV	SEQ ID NO 1259
65	1048	IRWVIRW	SEQ ID NO 1260

Continuación

Nombre	Secuencia	ID
HH1010	ILRWKWRWWRWRR	SEQ ID NO 1261
HH1011	RWRWWRWRR	SEQ ID NO 1262
HH1012	KWKWWKWKK	SEQ ID NO 1263
HH1013	RWRWWRR	SEQ ID NO 1264

*Determinación de la concentración inhibidora mínima (CIM).* Las CIM de los péptidos se midieron usando un procedimiento de microdilución de caldo modificado en medio Mueller-Hinton (MH) (Wu M, Hancock REW. 1999. Interaction of the cyclic antimicrobial peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane. J Biol Chem 274, 29-35). Brevemente, los péptidos se disolvieron y se guardaron en viales de vidrio. El ensayo se realizó en placas de microtitulación de polipropileno de 96 pocillos estériles. Se realizaron diluciones sucesivas de los péptidos a ensayar en 0,01 % de ácido acético (Fisher) que contenía 0,2 % de albúmina de suero bovino (Boehringer Mannheim GmbH) a 10X la concentración final deseada. Se añadieron diez microlitros de 10X péptidos a cada pocillo de una placa de polipropileno de 96 pocillos que contiene 90 µl de medio MH por pocillo. Las bacterias se añadieron a la placa de un cultivo durante la noche a  $2 - 7 \times 10^5$  unidades formadoras de colonia/ml y se incubaron durante la noche a 37 °C. La CIM se tomó como la concentración a la que no se observó crecimiento.

*Ensayo de CIM basado en luminiscencia para los péptidos no escindidos sobre membranas de celulosa.* El procedimiento se siguió como se ha descrito previamente (Hilpert K, Volkmer-Engert R, Walteran T, Hancock REW. High-throughput generation of small antibacterial peptides with improved activity. Nature Biotech 23:1008-1012, 2005). Los péptidos se sintetizaron robóticamente sobre hojas de celulosa y entonces las manchas de péptido se perforaron y se transfirieron a una placa de microtitulación de 96 pocillos con un fondo de poliestireno claro y lados de polipropileno blancos opacos (PerkinElmer, Boston, EE.UU.). Las manchas se lavaron dos veces con etanol al 100 % durante 5 min y después se equilibraron cinco veces con tampón Tris 100 mM a pH 7,3 durante 5 min. Un cultivo durante la noche de la cepa H1001 *fliC::luxCDABE* de *Pseudomonas aeruginosa* se diluyó 1:50 en medio MH nuevo y se incubó a 37 °C a una  $DO_{600}$  de 0,35. Este cultivo bacteriano se diluyó 1:25 en tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7,3, que contiene glucosa 20 mM. Se añadieron cincuenta µl de este cultivo a todos los pocillos de la placa de microtitulación y se incubaron a 37 °C. La luminiscencia de la cepa producida por el sistema de luciferasa dependiente de FMN se detectó en un modo dependiente del tiempo usando un Tecan Spectra Fluor plus (Tecan, Austria). Al final del experimento, las membranas se limpiaron lavando las manchas dos veces con etanol al 100 % durante cinco minutos. Después de eliminar el etanol, la membrana se secó al aire.

*Ensayo de los péptidos escindidos del soporte de celulosa.* Los péptidos se escindieron de la membrana seca en una atmósfera de amoníaco durante la noche, produciendo péptidos libres con un extremo C amidado. Los péptidos libres contuvieron dos β-alaninas en el extremo C, además de estar amidados debido al ligador entre la membrana de celulosa y la secuencia de péptidos. Las manchas de péptido se perforaron y se transfirieron a una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se llevaron a cabo diluciones sucesivas de las manchas de membranas. Se llenaron cuatro filas con cuatro controles que incluían 2x Bac2A y 2x un péptido sin relacionar. Las otras ocho filas se usaron para la etapa de dilución sucesiva de las variantes de péptido. Un cultivo durante la noche de la cepa H1001 de *Pseudomonas aeruginosa* se diluyó 1:500 usando tanto medio LB como tampón Tris 100 mM a pH 7,3, glucosa 20 mM y se añadió a los pocillos (100 µl/pocillo) que contenían las manchas de péptido. En todos los otros pocillos se añadieron 50 µl. La placa de microtitulación se incubó durante 30 min a 37 °C para liberar los péptidos de la membrana. Posteriormente se realizó una serie de dilución y la placa se incubó a 37 °C. La luminiscencia producida por el sistema de luciferasa dependiente de FMN se detectó de un modo dependiente del tiempo usando un Tecan Spectra Fluor plus.

*Citotoxicidad y ensayo de supresión de TNFα.* Células THP1 se cultivaron en medio RPMI 1640 (complementado con 10 % (v/v) de SBF, 1 % de L-glutamina y piruvato de sodio 1 nM) en un frasco sin endotoxina lavado con E-tox-clean (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canadá). Las células THP1 se contaron y 250 µl por pocillo de  $2-4 \times 10^4$  células/ml se transfirieron a una placa de microtítulo de poliestireno tratada de cultivo de tejido de 96 pocillos (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, EE.UU.). Además, se añadió PMA (1,3 nM) y las células se incubaron durante tres días. Después de tres días el medio se intercambié y se añadieron LPS de *Pseudomonas aeruginosa* y los péptidos. El tiempo de incubación fue cuatro horas y el sobrenadante se congeló a -20 °C. Las células se tiñeron con azul de tripano durante 2 minutos y se lavaron dos veces con PBS. La viabilidad de las células se determinó contando las células teñidas con respecto a las sin teñir. El sobrenadante se usó para medir la producción de TNFα por un ELISA (eBioscience, San Diego, USA) siguiendo el protocolo de fabricación.

*Cepas.* Para el ensayo de destrucción se usó un mutante mini-Tn5-lux en H103 de *Pseudomonas aeruginosa*. La cepa se llama H1001 y contiene una fusión transcripcional *fliC::luxCDABE* que produce la expresión constitutiva de luciferasa. Las cepas bacterianas usadas para los ensayos de actividad antimicrobiana incluyeron UB1005 de *Escherichia coli* (F-, nalA37, metB1), una *Salmonella enterica* ssp. *typhimurium* natural (*S. typhimurium*), cepa H103

de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 natural, ATCC29212 de *Enterococcus faecalis*, ATCC25923 de *Staphylococcus aureus* y una cepa aislada clínica de *Staphylococcus epidermidis* obtenida del Dr. D. Speert (Departamento de Medicina, Universidad de Columbia Británica). La actividad antifúngica se probó usando una cepa aislada de laboratorio de *Candida albicans* obtenida de Dr. B. Dill (Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad de Columbia Británica).

**EJEMPLO 2**

**PÉPTIDOS 12-MEROS**

La bactenecina es un péptido corto de 12 aminoácidos con una longitud máxima de aproximadamente 55 Å. Este péptido puede destruir tanto bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. Los presentes inventores hicieron previamente muchos mutantes de sustitución de aminoácidos reordenados y de un único aminoácido de este péptido. Se sintetizó un análisis de sustitución completa de una variante reordenada de Bac2A, SEC ID N° 972 (Fig. 2) que identifica péptidos que tuvieron ventajas distintas con respecto a su péptido parental y que definen posicionalmente sustituciones ventajosas. **Los residuos más favorecidos fueron:**

- AA<sub>1</sub> = todos excepto D y E
- AA<sub>2</sub> = F, H, K, L, Q, R, S, T, V, Y
- AA<sub>3</sub> = F, W
- AA<sub>4</sub> = K, R
- AA<sub>5</sub> = F, L, M, V, W
- AA<sub>6</sub> = K, R
- AA<sub>7</sub> = V, I
- AA<sub>8</sub> = H, K, N, Q, R, S, Y
- AA<sub>9</sub> = V, M
- AA<sub>10</sub> = I, K, R
- AA<sub>11</sub> = K, R, H
- AA<sub>12</sub> = H, K, N, R, T

Es evidente que algunos aminoácidos, particularmente R, K y W, fueron frecuentemente preferidos al residuo parental. A diferencia, algunos residuos fueron normalmente perjudiciales para la actividad, concretamente los aminoácidos D y E de ácido. Las sustituciones globales fueron raramente conservativas y predecibles precisamente a partir de la obvia sustitución de, por ejemplo, un residuo hidrófobo con otro. Algunas posiciones fueron candidatos particularmente ricos para la sustitución, concretamente las posiciones 2, 5, 8 y 12, mientras que otros fueron muy difíciles de mejorar, especialmente los residuos cargados e isoleucina y valina en la región central. Con respecto a las sustituciones desfavorables, **las sustituciones menos favorables fueron:**

- AA<sub>1</sub> = D, E
- AA<sub>2</sub> = D, E
- AA<sub>3</sub> = D, E
- AA<sub>4</sub> = D, E, F, G, I, Y
- AA<sub>5</sub> = todos excepto F, L, M, V, W, Y
- AA<sub>6</sub> = todos excepto K, R
- AA<sub>7</sub> = todos excepto F, I, L, M, R, V, W, Y
- AA<sub>8</sub> = D, E, P
- AA<sub>9</sub> = D, E, G, P, Q
- AA<sub>10</sub> = ninguno
- AA<sub>11</sub> = D, E, F, I, L, M, Q, T, V, W
- AA<sub>12</sub> = ninguno

Se sintetizaron una gama de péptidos novedosos que son muy distintos, pero poseen similitudes temáticas con la bactenecina lineal (Bac2A), y se probaron para actividad (Tabla 3).

**Tabla 3. Determinación de las concentraciones inhibitoras mínimas (CIM) en medios de Mueller-Hinton para 6 bacterias diferentes y la levadura *Candida albicans*.** Los valores son promedios de tres mediciones independientes.

Secuencia (todo el TerminalC amidado)	nombre	MIC (µg/ml) <sup>a</sup>						
		<i>P. aerug</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epi.</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
RLRIVVIRVAR	Bac2A	50	17	34	17	4	17	9
QRLRIRVAVIRA	HH1	50	6	25	50	12	50	25

Continuación

Secuencia (todo el TerminalC amidado)	nombre	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>						
		<i>P. aerug</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epi.</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
VQLRIRVAVIRA	HH2	>50	6	12	50	12	50	25
VRFRIRVAVIRA	HH3	6	1.6	6	12	1.6	25	6
VRWRIRVAVIRA	HH4	6	1.6	6	12	1.6	12	12
VRLWIRVAVIRA	HH5	>50	6	>50	50	3	25	50
VRLRIRVWVIRA	HH6	12	3	12	6	1.6	6	25
VRLRIRVAVRRA	HH7	12	6	6	12	1.6	25	6
VRLRIRVAVIRK	HH8	6	3	6	6	1.6	12	3
VQLRIRVRVIRK	HH9	6	3	6	12	1.6	12	6
KRFRIRVAVRRA	HH10	25	6	>50	25	3.1	>50	12
VRLRIRVRVIRK	HH11	3	1.6	6	6	0.8	12	3
KQFRIRVRVIRK	HH12	6	3	6	12	1.6	25	6
HQFRFRFRVRRK	HH13	50	25	12	12	6	>50	>50
HQWRIRVAVRRH	HH14	50	6	25	25	12	>50	25
KRFRIRVRVIRK	HH15	6	1.6	3	6	0.8	25	12
KRWRIRVRVIRK	HH16	3	1.6	3	3	0.8	12	6
KIWRVWK-NH2	HH17	>50	50	>50	>50	>50	>50	>50
IWVWRR-NH2	HH18	50	6	12.5	25	6	25	25

Como puede apreciarse de la Tabla 3, cada uno de los péptidos, excepto HH17, representa una mejora sobre el péptido parental. Algunos, en particular HH8, HH9, HH11, HH12, HH 15 y HH16, tienen una actividad antimicrobiana de amplio espectro excelente. Por ejemplo, HH8 y HH11 representan dos de los mejores péptidos anti-*Candida* nunca identificados. HH3, HH4, HH15 y HH16 tienen excelente actividad contra el principal patógeno nosocomial Gram-negativo, *E. coli*. Estos resultados muestran así que es posible optimizar adicionalmente péptidos reordenados y, por tanto, obtener péptidos con secuencias totalmente diferentes a las del péptido original Bac2A.

### EJEMPLO 3

#### ANÁLISIS DE SUSTITUCIÓN COMPLETA DE INDOLICIDINA

La síntesis de péptidos sobre celulosa es una forma muy eficaz y barata de investigar muchas variantes de péptidos diferentes para una actividad particular. Sin embargo, uno de los problemas de esta técnica es la baja cantidad de péptido sintetizada sobre la membrana, aproximadamente 280 nmoles por  $\text{cm}^2$ . Una mancha de péptido promedio usada para los experimentos presentados tiene aproximadamente 0,3  $\text{cm}^2$ . Por tanto, tuvo que desarrollarse un ensayo que fuera suficientemente sensible para mostrar la actividad con esta cantidad de péptidos. H1001 de *P. aeruginosa* tiene un casete del gen luciferasa incorporado en el cromosoma bacteriano en un gen *flhC* (que participa en la biosíntesis flagelar) que se expresa constitutivamente. Así producirá luz si FMN está presente. Si esta cepa se destruye, por ejemplo, por péptidos, la cantidad de luz producida disminuirá debido a una disminución en los niveles de FMN en las células muertas. Esta acción puede así monitorizarse detectando la luminiscencia en un lector de luminiscencia de placas de microtitulación con el tiempo. El volumen y cantidad de células por pocillo se optimizaron para este ensayo. Después de la selección, los presentes inventores pudieron monitorizar la acción destructora con pequeñas cantidades del péptido parental Bac2A (2  $\mu\text{g/ml}$  de péptido libre). Los experimentos de control demostraron que la disminución en la luminiscencia reflejó muerte bacteriana como se evalúa por la pérdida de capacidad de formación de colonias.

Para analizar la importancia de la posición de los aminoácidos específicos en la indolicidina de péptido bovino, cada aminoácido se cambió a los otros 19 aminoácidos uno por uno, creando un total de 247 péptidos únicos. La actividad se evaluó en el ensayo basado en lux (Fig. 3). Los resultados revelaron especificidad posicional definida de aminoácidos particulares y muchas sustituciones que mejoraron la actividad de indolicidina.

Los residuos más favorecidos fueron:

- AA<sub>1</sub> = F, Y
- AA<sub>2</sub> = F, G, H, I, K, M, P, R
- AA<sub>3</sub> = H, I, K, M, N, Q, R, S
- AA<sub>4</sub> = K, R
- AA<sub>5</sub> = sin mejora en K
- AA<sub>6</sub> = F, H, I, K, L, R
- AA<sub>7</sub> = H, K, L, R, S, T
- AA<sub>8</sub> = K, R
- AA<sub>9</sub> = K, R
- AA<sub>10</sub> = I, K, R
- AA<sub>11</sub> = K, R, Y
- AA<sub>12</sub> = K
- AA<sub>13</sub> = K

Es evidente que algunos aminoácidos, particularmente R y K, se prefieren frecuentemente al residuo parental. A diferencia, algunos residuos fueron normalmente perjudiciales para la actividad de la indolicidina, concretamente los aminoácidos ácidos D y E, mientras que otros nunca condujeron a una mejora en la actividad, concretamente A, V y W. Las sustituciones globales fueron raramente conservativas y predecibles precisamente a partir de la obvia sustitución de, por ejemplo, un residuo hidrófobo con otro. Algunas posiciones fueron candidatos particularmente ricos para la sustitución, concretamente las posiciones 2, 3, 6 y 7, mientras que otros fueron muy difíciles de mejorar, especialmente los residuos cargados.

Con respecto a las sustituciones desfavorables, las sustituciones menos favorables fueron:

- AA<sub>1</sub> = ninguno
- AA<sub>2</sub> = D, E, W
- AA<sub>3</sub> = D, E, F, W, Y
- AA<sub>4</sub> = A, D, E, G, V
- AA<sub>5</sub> = todos excepto K y R
- AA<sub>6</sub> = D, E, Q
- AA<sub>7</sub> = D, E, F
- AA<sub>8</sub> = D, E, L
- AA<sub>9</sub> = D, E
- AA<sub>10</sub> = D, E
- AA<sub>11</sub> = D, E, I
- AA<sub>12</sub> = todos excepto K y R
- AA<sub>13</sub> = todos excepto K, R y I

En términos generales, aquellas posiciones con las sustituciones más favorables (AA<sub>2</sub>, AA<sub>3</sub>, AA<sub>6</sub> y AA<sub>7</sub>) fueron las más flexibles y tuvieron algunas sustituciones desfavorables. Tres posiciones con residuos cargados no aceptaron fácilmente las sustituciones, concretamente AA<sub>5</sub>, AA<sub>12</sub> y AA<sub>13</sub>, y para éstos el aminoácido parental solo pudo mejorarse cambiando el residuo básico utilizado.

La actividad de estos péptidos se confirmó sintetizando ejemplos seleccionados de sustituciones únicas y múltiples sustituciones (Tabla 3). La mayoría de estas tuvieron actividad superior al péptido parental indolicidina.

**Tabla 4: Actividad antimicrobiana de variantes de sustitución únicas y múltiples de indolicidina (los aminoácidos sustituidos se indican en negrita en la columna 1).**

Secuencia	Nombre	MIC (µg/ml) <sup>a</sup>						
		<i>P. aerug.</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epi.</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
ILPWW <b>K</b> WPWWPWRR	Indolicidin	62	8	31	16	8	31	16
ILPWW <b>F</b> PWWPWRR	HH63	62	16	31	8	4	31	16
IL <b>K</b> WWKWPWWPWRR	HH111	16	8	31	8	4	31	8
ILPWW <b>K</b> PWWPWRR	HH113	31	31	62	31	8	125	62

Continuación

Secuencia	Nombre	MIC (µg/ml) <sup>a</sup>						
		<i>P. aerug.</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epi.</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
ILPWKWPWWKWRR	HH117	16	8	31	8	2	31	16
ILPW <del>W</del> WPWWPWRR	HH235	>84	>84	>84	20	5	84	84
IL <del>K</del> WKWPWWKWRR	HH970	16	8	16	8	2	31	16
ILPWKWR <del>W</del> WWKWRR	HH971	16	8	16	8	2	31	8
<b>FLPKKFRWWKYRK</b>	HH972	31	16	31	31	8	>125	31
<b>FIKWKFRWWKWR</b>	HH973	8	4	8	4	2	8	8

Esto se usó para sintetizar una serie de péptidos de 9 y 7 aminoácidos y la actividad se probó para el procedimiento de luciferasa (Tabla 5). Todos los 9-meros sintetizados fueron activos mientras que los péptidos de tan solo 7 aminoácidos también tuvieron excelente actividad antimicrobiana.

**Tabla 5: Actividad antimicrobiana de péptidos de 9 aminoácidos y 7 aminoácidos seleccionados.**

Nombre	ID	Secuencia del péptido	Actividad antimicrobial*
HH974	SEQ ID NO 977	KWPWWPWRR	+ / ++
HH975	SEQ ID NO 978	KWPWWPWRRK	+
HH976	SEQ ID NO 979	KFPWVOPWRR	+
HH977	SEQ ID NO 980	KKPWWPWRR	+
HH978	SEQ ID NO 981	KWRWWPWRR	++
HH979	SEQ ID NO 982	KWPKWPWRR	+
HH980	SEQ ID NO 983	KWPWKPWRR	+
HH981	SEQ ID NO 984	KWPWWKWRR	++
HH982	SEQ ID NO 985	KWPWWPKRR	+
HH983	SEQ ID NO 986	KWPWWPWRR	+ / ++
HH984	SEQ ID NO 987	KFRWWPWRR	++
HH985	SEQ ID NO 988	KFRWWKWRR	++
HH986	SEQ ID NO 989	KWRWWKKRR	++
HH987	SEQ ID NO 990	KKKWWKWRR	++
HH988	SEQ ID NO 991	KFHWWIWRK	++
HH989	SEQ ID NO 992	KFHWWKWRK	++
HH990	SEQ ID NO 993	KFKWWKYRK	++
HH991	SEQ ID NO 994	KFKFFKYRK	+
HH992	SEQ ID NO 995	KFKFFKFRK	+
HH993	SEQ ID NO 996	PWWPWRR	+
HH994	SEQ ID NO 997	KWWPWRR	+
HH995	SEQ ID NO 998	PWWKWRR	+ / ++
HH996	SEQ ID NO 999	RWWPWRR	+
HH997	SEQ ID NO 1000	PKWPWRR	-
HH998	SEQ ID NO 1001	PWKPWRR	-

## Continuación

Nombre	ID	Secuencia del péptido	Actividad
HH999	SEQ ID NO 1002	PWWKWRR	+
HH1000	SEQ ID NO 1003	PWWPKRR	-
HH1001	SEQ ID NO 1004	PWWPWRR	-
HH1002	SEQ ID NO 1005	RWWKWRR	++
HH1003	SEQ ID NO 1006	RWWKWRR	+ / ++
HH1004	SEQ ID NO 1007	RFWKWRR	+
HH1005	SEQ ID NO 1008	RWWIKRR	+ / ++
HH1006	SEQ ID NO 1009	RWWIYRR	+
HH1007	SEQ ID NO 1010	RFFKFRR	-
HH1008	SEQ ID NO 1011	KWWKWKK	+
HH1009	SEQ ID NO 1012	KFFKFKK	-
<p>* La actividad Antimicrobial contra <i>P. aeruginosa</i> de H1001 fue determinada después de 4 horas de tiempo de incubación con el péptido usando liminiscencia como indicador (metodo descrito arriba). La actividad antimicrobial fue clasificada usando los siguiente simbolos, - actividad mínima o sin actividad, + actividad semanal, + / ++ actividad intermedia, ++ fuerte actividad</p>			

## EJEMPLO 4

## DESARROLLO DE BIBLIOTECAS DE PÉPTIDOS CUASI-ALEATORIOS CON ACTIVIDADES ANTIMICROBIANAS ENRIQUECIDAS

Las bibliotecas de péptidos cuasi-aleatorios son una herramienta simple y poderosa para crear secuencias de péptidos novedosas. Estos péptidos novedosos pueden cribarse para la actividad biológica deseada. Este enfoque es independiente del conocimiento de péptidos que se producen naturalmente, y puede crear secuencias a partir del espacio de secuencia completa de todos los posibles péptidos. En los primeros intentos de los presentes inventores, los presentes inventores crearon 200 péptidos de 9 aminoácidos al azar (9-meros) *de novo* [secuencias no incluidas en esta patente ya que son inactivas]. Para este conjunto de péptidos la cisteína se excluyó para evitar las posibilidades de formación de dímeros de péptidos. Todos los péptidos se sintetizaron sobre celulosa y se probaron para su capacidad para destruir *P. aeruginosa*, usando el ensayo de *lux* y la cepa luminiscente H1001. Después de 4 horas de tiempo de incubación de H1001 con los péptidos no se detectó actividad antimicrobiana (Fig. 4).

Así, una biblioteca de péptidos totalmente al azar no produjo esencialmente péptidos antimicrobianos activos, y esto demuestra que no es factible cribar miles de péptidos al azar para encontrar algunos con actividad antimicrobiana. Para mejorar las posibilidades de encontrar péptidos antimicrobianos activos, la información obtenida de las bibliotecas de péptidos Bac2A previas (Hilpert, K., M.R. Elliott, R. Volkmer-Engert, P. Henklein, O. Donini, Q. Zhou, D.F.H. Winkler y R.E.W. Hancock. 2006. Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane. *J Biol Chem* 13:1101-1107) se usó para diseñar nuevos parámetros relacionados con la composición de aminoácidos de entrada para crear un enfoque cuasi-aleatorio. Así, en lugar de usar la misma aparición para cada aminoácido, la aparición se cambió para ciertos aminoácidos, según su aparición en péptidos con buena actividad, como se presenta en la FIG. 5.

Usando estos nuevos parámetros de aparición se diseñaron cuasi-aleatoriamente 943 péptidos y se sintetizaron sobre celulosa. El veintiocho por ciento de los péptidos demostraron actividad similar al control mientras que el 2 % fueron más activos, y el 0,3 % demostró actividad superior. Estas evaluaciones se repitieron con 152 de estos péptidos de la biblioteca de péptidos cuasi-aleatorios y pudieron confirmarse el 96 % de las actividades. Adicionalmente, los estudios de CIM con una selección de péptidos aleatorios indicó que los péptidos activos dentro de la biblioteca cuasi-aleatoria son adecuados para usar como estructuras de guía para el diseño de fármacos.

Para mejorar adicionalmente el diseño de bibliotecas, los diferentes grupos de actividad encontrados dentro de la primera biblioteca cuasi-aleatoria se compararon con el parámetro usado para diseñar la primera biblioteca cuasi-aleatoria. La comparación se presenta en la FIG. 5. El grupo más activo mostró menor uso de los aminoácidos A, D, E, G, H, M, N, P, Q, S y T en comparación con el parámetro de la biblioteca. Por otra parte, los aminoácidos I, R, V y

W se usaron más frecuentemente en comparación con el parámetro de la biblioteca. Usando esta información se diseñó una biblioteca de péptidos cuasi-aleatorios de segunda generación. Los nuevos parámetros se presentan como una comparación entre los parámetros de la primera y la segunda biblioteca en la FIG. 6.

5 Usando estos parámetros se diseñaron 500 péptidos nuevos y se sintetizaron sobre celulosa (HH469-HH969), y sus actividades antimicrobianas se probaron contra H1001. El resultado de esta selección se facilita en la FIG. 7.

10 Así, las posibilidades de encontrar un péptido antimicrobiano, con actividad contra *P. aeruginosa* que fuera comparable a Bac2A o mejor, usando este parámetro de bibliotecas de segunda generación, fueron superiores al 50 %. Las características de la biblioteca podrían todavía optimizarse lo más probablemente ya que una comparación de las apariciones de aminoácido en las diferentes clases de péptidos todavía mostró que había margen de mejora. Así, los presentes inventores usaron los parámetros de la biblioteca de segunda generación adoptados combinados con un enfoque de QSAR que se utilizó las bibliotecas de péptidos de los presentes inventores como conjuntos de entrenamiento para los análisis de QSAR y diseñaron 100.000 péptidos.

15 **EJEMPLO 5**

**ANÁLISIS DE QSAR COMO VÍA PARA PREDECIR NUEVOS PÉPTIDOS**

20 El procedimiento de redes neuronales artificiales representa una de las técnicas de aprendizaje de máquinas más ampliamente usadas que utilizan principios básicos de la organización del cerebro y mecanismos de memoria. La estructura de una red neuronal imita tres componentes principales de una célula neuronal y consiste en una capa de entrada en la que se entra la información, una o más capas ocultas en las que se realizan y procesan las señales y una capa de salida en la que termina el resultado del cálculo. Tal flujo de datos se parece al paso de una señal eléctrica entre células neuronales. En resumen, un cuerpo de la dendrita de una célula recibe múltiples señales de entrada de otras neuronas, y dependiendo de la intensidad de la entrada acumulada, la señal de activación puede pasarse al axón y, de ahí, a lo largo de las conexión aguas abajo. Igual que una red biológica compleja de neuronas conectadas, por ejemplo, el modelo de redes neuronales artificiales pueden aprenderse. Durante la fase de aprendizaje, define la relación entre n variables de entrada Input\_node<sub>ij</sub> y un valor dependiente conocido Output\_node<sub>i</sub> por ajustes recurrentes de los atributos de pesos w<sub>ij</sub> asignados a cada nodo de la red. En particular, un conjunto de entradas multiplicado por cada peso de la neurona se suman para cada nodo oculto m:

35 
$$Hidden\_node_i = \tanh \left[ \sum_{i=1}^n (Input\_node_i * w_{ij} + const_0 * w_0) \right]$$

Entonces, las sumas transformadas para las unidades ocultas se multiplican por los pesos de salida:

40 
$$Output\_node = \sum_{i=1}^m (Hidden\_node_i * w_{ij} + const_0 * w_0)$$

en la que se sumen un tiempo final y se transforman con la función de aprendizaje

45 
$$\frac{1}{1 + e^{-x}}$$

50 que se parece a un potencial eléctrico sigmoide que se produce entre una neurona y célula dendrítica. Con una red cualificada, los argumentos independientes (descriptores de QSAR) de una entrada desconocida (péptido sin probar) pueden pasarse a través de los nodos de entrada y transformarse mediante las conexiones de red predefinidas en la señal de salida (actividad predicha). Entonces, los valores de salida pueden interpretarse como predicción activa de inactiva por su proximidad respectiva a 1,0 ó 0,0 umbrales.

55 Se usaron descriptores de QSAR comunes e 'inductivos' descritos en la Tabla 6.

60

65

**Tabla 6. Descriptores moleculares 'inductivos' y convencionales utilizados en el modelado de QSAR de actividad antimicrobiana de péptidos catiónicos cortos.**

5	□ Cytotoxicity	Actividad antimicrobiana contra <i>P. aeruginosa</i> de H1001 fue determinada después de 4 horas de incubación con el péptido usando liminiscencia como indicador (metodo descrito en el texto). La actividad antimicrobiana fue clasificada usando los siguiente simbolos, - actividad mínima actividad, + actividad semanal, +/+ actividad intermedia, ++ fuerte actividad
	<b>Cytotoxicity</b>	<b>Parámetro QSAR</b>
	<b>Basados en electronegatividad</b>	
10	EO_Equalized	Electronegatividad iterativamente igualada de una molecula
	Average_EO_Pos	Media aritmética de electronegatividades de los átomos con parcial positiva
15	Average_EO_Neg partial	Media aritmética de electronegatividades de los átomos con carga negativa
	<b>Basados en dureza</b>	
	Sum_Hardness	Suma de durezas de átomos de una molécula
20	Sum_Neg_Hardness	Suma de durezas de átomos con carga parcial negativa
	Average_Hardness	Media aritmética de durezas de todos los átomos de una molécula
	Average_Neg_Hardness	Media aritmética de durezas de átomos con carga parcial negativa
25	Smallest_Pos_Hardness	Dureza atómica mas pequeña entre los valores de átomos cargados positivamente
	Smallest_Neg_Hardness	Dureza atómica mas pequeña entre los valores de átomos cargados positivamente
	Largest_Pos_Hardness	Dureza atómica mas grande entre los valores de átomos cargados positivamente
30	Largest_Neg_Hardness	Dureza atómica mas grande entre los valores de átomos cargados positivamente
	Hardness_of_Most_Pos	Dureza atómica de un átomo con la carga mas positiva
35	Hardness_of_Most_Neg	Dureza atómica de un átomo con la carga mas negativa
	<b>Basados en suavidad</b>	
	Total_Neg_Softness	Suma de suavidades de átomos con carga parcial negativa
40	Average_Neg_Softness	Media aritmética de suavidades de átomos con carga parcial negativa
	<b>Basados en carga</b>	
	Average_Pos_charge	Media aritmética de las cargas parciales positivas de los atomos de 1 molecula
45	Average_Neg_Charge	Media aritmética de las cargas parciales negativas de los atomos de 1 molecula
	<b>Descriptores basados en constantes sustituyentes inductivas</b>	
50	Total_Sigma_mol_i	Suma de parámetros inductivos sigma (molecula -> atomo) para todos los átomos dentro de una molecula.
	Most_Pos_Sigma_mol_i	Mayor grupo positivo de parámetros inductivos sigma (molecula->atomo) para los átomos de una molécula.
	Most_Neg_Sigma_mol_i	Parametro sigma inductivo mas grande para los atomos en un molecula.
55	Sum_Pos_Sigma_mol_i	Suma de todos los parámetros inductivos de grupo psotivo sigma (molécula->átomo) dentro de una molécula.
	Sum_Neg_Sigma_mol_i	Suma de todos los parámetros inductivos de grupo negativo sigma (molécula->átomo) dentro de una molécula.
	<b>Descriptores basadas en constantes sustituyentes estéricos</b>	
60	Smallest_Rs_mol_i	Valos mas pequeño de Rs de grupo estérico de influencia en una molecula.
	Larges_Rs_i_mol	Valor mayor de Rs atomico estérico de influencia en una molecula.
65	Most_Neg_Rs_mol_i	Rs influencia estérica en el átomo con mas carga negativa en una molécula

Descriptorios QSAR convencionales aplicadas por el entorno operativo molecular (MOE) v.2006.05 software, Chemical Computation Group Inc., Montreal, Canada.		
5	a_acc	Número de enlaces de hidrógeno en átomos aceptores
	a_don	Número de enlaces de hidrógeno en átomos donadores
	ASA	Área de superficie accesible de agua
10	ASA_H	Área de superficie accesible de agua de todos los átomos hidrófobos
	ASA_P	Área de superficie accesible de agua de todos los átomos polares
15	ASA-	Área de superficie accesible de agua de todos los átomos con carga parcial negativa
	ASA+	Área de superficie accesible de agua de todos los átomos con carga parcial positiva
	FCharge	Carga total de la molécula
20	logP(o/w)	Log del coeficiente de reparto octanol/agua
	Logs	Log de la solubilidad acuosa
	PC-	Carga parcial negativa total
25	PC+	Carga parcial positiva total
	RPC+	Carga parcial positiva relativa
30	Vdw_area	Area superficial de Van der Waals calculada usando una aproximación de la tabla de conexiones.
	vsa_acc	Aproximación a la suma de las áreas superficiales de VDW acetoras de enlaces de hidrógeno puro
	vsa_acid	Aproximación a la suma de las áreas superficiales de VDW de átomos de ácidos
35	vsa_hyd	Aproximación a la suma de las áreas superficiales de VDW de átomos básicos
	Weight	Peso molecular

40 Los descriptorios de QSAR convencionales se calcularon para los compuestos del conjunto de entrenamiento y del conjunto externo usando el parámetro por defecto del paquete MOE, mientras que los parámetros 'inductivos' se han calculado por secuencias de comandos de SVL customizadas (un lenguaje especializado de MOE) usando las ecuaciones fundamentales encontradas en la FIG. 8 para parámetros de efecto estérico, parámetros de influencia inductiva, carga parcial 'inductiva', electronegatividad 'inductiva' de grupos y análogos 'inductivos' de dureza y suavidad química local y global. El carácter lineal de estas ecuaciones hizo a los descriptorios inductivos en la FIG. 8 fácilmente calculables y adecuados para bases de datos considerables y los posiciona como parámetros apropiados para los modelos de QSAR a gran escala.

50 Las distancias interatómicas se calcularon para todos los péptidos evaluados usando sus estructuras tridimensionales optimizadas con el campo de fuerza de MMFF94. Los tipos atómicos se han diseñado según el nombre, estado de valencias y una carga formal de átomos como se define dentro del MOE.

55 Los descriptorios de QSAR usados en el estudio se han normalizado en el intervalo  $[0,0 \div 1,0]$  y los conjuntos de entrenamiento y de prueba que no se superponen se han sacado al azar por las secuencias de comandos de Java customizadas. El entrenamiento y prueba de las redes neuronales se ha realizado usando el simulador de redes neuronales de Stuttgart. El entrenamiento se realizó mediante el algoritmo de retropropagación con alimentación hacia adelante con el decaimiento de peso y barajado de patrones. Los valores de tasas iniciales se asignaron al azar en un intervalo  $[0,0 \div 1,0]$ , la tasa de aprendizaje se ha fijado a 0,8 con el umbral 0,10. El conjunto externo de 100.000 candidatos a péptido diseñados usando los parámetros de la biblioteca de segunda generación descritos en la FIG. 6 se creó usando secuencias de comandos de SVL customizadas.

60 **EJEMPLO 6**

### PREDICCIÓN DE PÉPTIDOS NOVEDOSOS

65 Para relacionar los descriptorios de QSAR con la actividad antimicrobiana conocida de péptidos previamente estudiados, como se describe en el Ejemplo 5, se empleó el procedimiento de redes neuronales artificiales, una de

las técnicas de reconocimiento de patrones más eficaces que es altamente reconocida entre enfoques de aprendizaje de máquinas. Dos conjuntos de datos de entrenamiento de 943 péptidos (Hilpert K, y REW Hancock, sin publicar) y 500 péptidos (Fig. 7) se trataron por separado, ya que se ensayaron en momentos diferentes bajo condiciones ligeramente diferentes, y en el conjunto combinado de 933+500=1433 sustancias y, por consiguiente, se entrenaron tres modelos de redes neuronales independientes basadas respectivamente en los conjuntos de entrenamiento 'A', 'B' y 'A+B'.

Dentro de cada uno de aquellos conjuntos de entrenamiento, un valor de salida de 1,0 se asignó para los más activos (el 5 % superior) de los péptidos y se usaron valores de 0,0 para todos los otros. Con esto, múltiples series de entrenamientos de las redes neuronales se llevaron a cabo, mientras que se cambiaba el número de sus nodos ocultos. Como resultado, se estableció que el rendimiento más óptimo de las soluciones basadas en redes se logró con 10 nodos en la capa oculta. Usando esto, la configuración 44-10-1 optimizada de las soluciones de QSAR de redes neuronales se entrenaron usando 10 veces la técnica de validación cruzada. En particular, para cada conjunto de entrenamiento 'A', 'B' y 'A+B' se crearon 10 modelos independientes, cada uno derivado de un 90 % de la porción del conjunto de entrenamiento. Entonces, cada solución se aplicó al 10 % restante de los datos que se habían excluido del procedimiento de entrenamiento. Así, para cada péptido en los conjuntos de entrenamiento 'A', 'B' y 'A+B' se calcularon 10 predicciones y éstas se promediaron adicionalmente como medias aritméticas. Entonces, las salidas promediadas se interpretaron como predicciones activas/inactivas aplicando el criterio del 5 % superior previamente utilizado (péptidos más activos). Finalmente, los resultados predichos se compararon con actividades de péptidos experimentales (también separados en el 5 % superior frente al 95 % restante) para producir matrices de confusión. Los parámetros resultantes de especificidad, sensibilidad, exactitud y el valor predictivo positivo observado cuando se delinean el 5, 10 ó 25 % superior de los péptidos como los "más activos" se presentan en la Tabla 7.

**Tabla 7. Parámetros que caracterizan la capacidad de las redes neuronales para reconocer los péptidos más activos en los conjuntos de entrenamiento A, B y 'A+B' que contienen péptidos antimicrobianos conocidos.**

Conjunto de entrenamiento	% max de los más activos	Precisión	Especificidad	Sensibilidad	Valor predictivo positivo
<b>A</b>	5%	0.96	0.98	0.62	0.58
	10%	0.93	0.94	0.76	0.39
	25%	0.78	0.78	0.85	0.17
<b>B</b>	5%	0.94	0.97	0.33	0.30
	10%	0.88	0.90	0.33	0.12
	25%	0.77	0.77	0.80	0.12
<b>A+B</b>	5%	0.95	0.97	0.47	0.47
	10%	0.91	0.92	0.54	0.27
	25%	0.76	0.77	0.66	0.13

Además, los tres modelos de QSAR desarrollados se evaluaron usando las curvas de características operativas del receptor (que representan tasas positivas verdaderas promedio en función de tasas positivas falsas promedio). Los valores 'área bajo la curva' calculados del conjunto de entrenamiento A = 0,87, B = 0,83 y A+B = 0,80 confirmaron la exactitud de estos modelos de QSAR y demostraron que el conjunto seleccionado de los 44 descriptores de QSAR puede capturar adecuadamente propiedades estructurales de péptidos que son relevantes para sus actividades antibacterianas.

**Interrogación por ordenador de bibliotecas de péptidos diseñadas.** Para utilizar más la solución de QSAR desarrollada, se crearon 100.000 variantes virtuales de péptidos de 9 aminoácidos de longitud usando las proporciones favorables de aminoácidos utilizadas para la biblioteca de segunda generación como se describe en la FIG. 6.

En la siguiente etapa, los presentes inventores calcularon 44 parámetros de QSAR para cada péptido virtual y puntuaron los 100.000 con 30 soluciones de QSAR basadas en redes neuronales creadas con los conjuntos de entrenamiento 'A', 'B' y 'A+B' y descritos en la sección previa. Así, para cada péptido hipotético, los presentes inventores produjeron 30 salidas de redes independientes que representan potenciales antimicrobianos hipotéticos, pero en lugar de promediarse, se sometieron a un sistema de votación binario. En particular, después de clasificarse 30 conjuntos de actividades predichas, los votos acumulados se calcularon para ~100.000 péptidos, por lo que cada péptido recibiría un voto de 1 para cada clasificación del 5 % superior (así, el máximo valor posible se fijó a 30). Además, también se calcularon las clasificaciones acumuladas de péptidos. La predicción de actividad para los 100.000 péptidos se resume en la Tabla 7 (véase, apéndice) y se ordena según cuartiles (cuartil predicho más activo al menos activo).

Para probar la exactitud de las predicciones se tomaron cincuenta péptidos de los límites de cada cuartil (total de 200 péptidos) y se resintetizaron sobre matrices de celulosa y se probaron para actividad antimicrobiana usando el ensayo de luminiscencia descrito anteriormente, véase la Tabla 7. Los resultados fueron del siguiente modo:

- 5 • Para los 50 primeros (que representan el primer cuartil), 47 de ellos (94 %) fueron más activos que Bac2A de control, siendo solo 3 péptidos tan activos como el control.
- Para los 50 segundos (que representan el segundo cuartil), 32 de ellos (64 %) fueron más activos que el control, mientras que 17 péptidos fueron similares o peores que el control y 1 péptido fue inactivo.
- 10 • Para los 50 terceros (que representan el tercer cuartil), solo 8 (16 %) fueron similares a o mejores que el control, 38 fueron peores que el control y 4 fueron inactivos
- Para los 50 finales (que representan el cuarto cuartil con la menor actividad predicha), 44 fueron peores que el control y 6 fueron inactivos.

Así, es bastante evidente que el modelo derivado de QSAR fue muy exacto en predecir péptidos con excelente actividad antimicrobiana. Véase, Figura 20.

**Tabla 8. Péptidos seleccionados del conjunto de 100.000 péptidos.** Las actividades predichas se facilitan en cuartiles de actividad, siendo el cuartil de péptidos predicho más activo (25.000 péptidos superiores) el Cuartil 1, se predice que los Cuartiles 2 y 3 son sucesivamente menos activos y se predice que el menos activo es el Cuartil 4. La actividad antimicrobiana de estos péptidos se determinó por el ensayo de luminiscencia. La actividad se determinó representando gráficamente los valores de luminiscencia en función de la concentración de péptido. La concentración de péptido más alta se fija a 1. Como consecuencia, los valores de  $IC_{50}$  determinados, redondeados a 2 cifras significativas, son relativos (Hilpert, K. y R.E.W. Hancock, Use of luminescent bacteria for rapid screening and characterization of short cationic antimicrobial peptides synthesized on cellulose using peptide array technology, Nature Protocols, 2007, vol. 2, pág. 1652 - 1660).

Nombre	Secuencia	Actividad prevista (en cuartiles)	Actividad medida ( $IC_{50}$ )
HHC1	RWRWKRWWWW	1	0.25
HHC2	RWRRWKWWW	1	0.40
HHC3	RWWWWRKWWW	1	0.28
HHC4	RWRRKWWWWWW	1	0.39
HHC5	RWRWWKRWY	1	0.20
HHC6	RRKRWWWWW	1	0.43
HHC7	RWRIKRWWWW	1	0.12
HHC8	KIWWWWWWRKR	1	0.13
HHC9	RWRRWKWWL	1	0.078
HHC10	KRWWKWIRW	1	0.037
HHC11	KRWWWWWVKR	1	0.22
HHC12	IRWWKRWWR	1	0.21
HHC13	IKRWWRWWR	1	0.23
HHC14	RRKVWWWRRWW	1	0.27
HHC15	RKWWRWWRW	1	0.31
HHC16	KRWWWWWRF	1	0.24
HHC17	IKRWWWRRW	1	0.22
HHC18	KRWWWWWVKR	1	0.36
HHC19	KWRRWKRW	1	0.15
HHC20	WRWWKIWK	1	0.14
HHC21	WRWRWWKRW	1	0.28

ES 2 497 441 T3

Continuación

5	HHC22	WKRWKWWKR	1	0.25
	HHC23	RIKRWWWWWR	1	0.31
	HHC24	IWKRWWRRW	1	0.24
	HHC25	KWWWKIWWKR	1	0.20
10	HHC26	RKRWLWRWW	1	0.25
	HHC27	KRWRWWRWW	1	0.28
	HHC28	KKRWLWWWR	1	0.30
15	HHC29	RWWRKWWIR	1	0.24
	HHC30	KWWRWWRKW	1	0.20
	HHC31	KRWWIRWWR	1	0.21
20	HHC32	KIWWWWRRR	1	0.21
	HHC33	RRRKWWIWW	1	0.18
	HHC34	RRRWWWWWW	1	1.8
25	HHC35	RWWIRKWWR	1	0.21
	HHC36	KRWWKWWRR	1	0.13
	HHC37	KRWWRKWWR	1	0.15
30	HHC38	RRIWRWWWW	1	0.68
	HHC39	IRRRKWWWW	1	0.21
	HHC40	KRKIWWWIR	1	0.28
35	HHC41	RKIWWWRIR	1	0.59
	HHC42	KRWWIWRIR	1	0.35
	HHC43	RWFRWWKRW	1	0.26
40	HHC44	WRWWWWKKWR	1	0.19
	HHC45	WKRWWKKWR	1	0.20
	HHC46	WKRWRWIRW	1	0.28
	HHC47	KRWWKWWRR	1	0.23
45	HHC48	WKKWWKRRW	1	0.19
	HHC49	WRWYWWKKR	1	0.22
	HHC50	WRRWWKWWR	1	0.23
50	HHC51	IRMVVKRWR	2	0.61
	HHC52	RIWYWKRW	2	0.36
	HHC53	FRRWWKWFK	2	0.12
55	HHC54	RVRWWKKRW	2	0.27
	HHC55	RLKKVRWWW	2	0.34
	HHC56	RWWLKIRKW	2	0.18
60	HHC57	LRWWWIKRI	2	0.33
	HHC58	TRKWWWRW	2	0.76

65

ES 2 497 441 T3

Continuación

5	HHC59	KRFW WFWR	2	3.0
	HHC60	KKRW VVIR	2	0.35
	HHC61	KRW VYRYW	2	0.54
	HHC62	IRKW RWWK	2	0.41
10	HHC63	RHWKT WVKR	2	0.95
	HHC64	RRFKK WYWY	2	0.26
	HHC65	RIKV WWWW	2	0.51
15	HHC66	RKRLK WWY	2	0.18
	HHC67	LVFRKY WKR	2	0.99
	HHC68	RRR WWWWIV	2	0.85
20	HHC69	KKRW VVIRY	2	0.22
	HHC70	RWR IKFKRW	2	0.26
	HHC71	KWKIFRR WW	2	0.16
25	HHC72	IWKRW RKRL	2	0.33
	HHC73	RRRKW WIWG	2	0.57
	HHC74	RWLVL RKRW	2	0.53
30	HHC75	RKW IWRWFL	2	0.15
	HHC76	KRRR IWWWK	2	0.40
	HHC77	IWWW RRRWV	2	0.29
35	HHC78	LRWR WWKIK	2	0.26
	HHC79	RWK MWWRWV	2	0.24
	HHC80	VKRY YWRWR	2	1.2
40	HHC81	RWYR KRWSW	2	0.70
	HHC82	KRKL IRWWW	2	0.23
	HHC83	RWRWW IKII	2	0.46
	HHC84	KFRKR VWWW	2	0.30
45	HHC85	W IWRKLRW	2	0.46
	HHC86	LRFIL WVKR	2	0.88
	HHC87	RVWFKRR WW	2	0.26
50	HHC88	RRWFVK WWY	2	0.52
	HHC89	KWWLV WKRK	2	0.23
	HHC90	RWILV WWWWRI	2	25
55	HHC91	KRWLT WRFR	2	0.54
	HHC92	RKWRWR WLK	2	0.31
	HHC93	IRRR WWWWIV	2	0.23
60	HHC94	IKWWW RMRI	2	0.39
	HHC95	RWKIFIR WW	2	1.8

65

ES 2 497 441 T3

Continuación

5	HHC96	IRQWVRRWW	2	0.50
	HHC97	RRRKTWYWW	2	0.32
	HHC98	RRWWHLWRK	2	0.38
	HHC99	RRWWMRWWV	2	0.33
10	HHC100	RRFKFIRWW	2	0.24
	HHC101	INRKRRLRW	3	4.2
	HHC102	RRMKLRRK	3	4.2
15	HHC103	RKVRWKIRV	3	0.32
	HHC104	VRIVRVRIR	3	2.2
	HHC105	IKRVKRRKR	3	2.9
20	HHC106	RVKTWRVRT	3	5.7
	HHC107	RVFVKIRMK	3	0.72
	HHC108	IRGRIFWV	3	0.44
25	HHC109	ATWIVFRR	3	4.9
	HHC110	KKSKQLWKR	3	3.2
	HHC111	MINRVRLRW	3	2.8
30	HHC112	GGIRRLRWY	3	1.2
	HHC113	RLVHWIRRV	3	2.6
	HHC114	AWKIKKGR	3	3.6
35	HHC115	FVVMKRIVW	3	5.4
	HHC116	GIKWRSRRW	3	1.1
	HHC117	RWMVSKWY	3	25
40	HHC118	IVRVWVVR	3	3.5
	HHC119	RWIGVIIKY	3	2.2
	HHC120	WIRKRSRIF	3	3.4
45	HHC121	GWKILRKRK	3	2.7
	HHC122	YQRLFVRIR	3	25
	HHC123	AVWKFVKRV	3	8.2
50	HHC124	IRKKRRRWT	3	6.6
	HHC125	ILRVISKRR	3	25
	HHC126	AWRFKNIRK	3	9.2
	HHC127	HYKFQRWIK	3	2.8
55	HHC128	RRIRRVRWG	3	8.2
	HHC129	VLVKKRRRR	3	12
	HHC130	RWRGIVHIR	3	4.9
60	HHC131	WRNRKVWVR	3	6.8
	HHC132	KFWWWNYLK	3	1.8

65

ES 2 497 441 T3

Continuación

5	HHC133	KRIMKLMR	3	6.5
	HHC134	IRRRKKRIK	3	6.4
	HHC135	RKWMGRFLM	3	4.4
	HHC136	RRVQRGKWW	3	6.3
10	HHC137	WHGVRWWKW	3	2.5
	HHC138	WVRFVYRYW	3	2.1
	HHC139	RKRTKVTWI	3	5.1
15	HHC140	IRRVRRKI	3	11.1
	HHC141	KIRRKVRWG	3	10.6
	HHC142	AIRRWIRK	3	4.6
20	HHC143	WRFKVLQR	3	7.1
	HHC144	RSGKKRWRR	3	6.5
	HHC145	FMWVYRYKK	3	1.5
25	HHC146	RGKYIRWRK	3	3.8
	HHC147	WVKVKYTW	3	5.6
	HHC148	VVLKIVRRF	3	25
30	HHC149	GKFYKVVWR	3	1.2
	HHC150	SWYRTRKRV	3	6.7
	HHC151	KNRGRWFSH	4	9.8
35	HHC152	AFRGSRHRM	4	11
	HHC153	GRNGWYRIN	4	11
	HHC154	AGGMRKRTR	4	25
	HHC155	ATKGYSKF	4	25
40	HHC156	SSGVRWSWR	4	8.2
	HHC157	RVWRNGYSR	4	10
	HHC158	WGRTRWSSR	4	9.6
45	HHC159	GKRWWGRGR	4	8.2
	HHC160	SFNWKRSGK	4	25
	HHC161	WGRGGWTNR	4	25
50	HHC162	ANRWGRGIR	4	11
	HHC163	WGGHKRRGW	4	6.2
	HHC164	WHGGQKWRK	4	8.5
55	HHC165	FVWQKGTNR	4	11
	HHC166	HGVWGNRKR	4	7.9
	HHC167	TRGWSLGR	4	12
60	HHC168	GRRVMNQKR	4	9.8
	HHC169	RNKFGGNWR	4	25

65

continuación

5	HHC170	GVRVQRNSK	4	25
	HHC171	NQKWSGRRR	4	8.0
	HHC172	RQNGVWRVF	4	8.3
	HHC173	GRMRLWNGR	4	7.9
10	HHC174	WHYRSQVGR	4	6.6
	HHC175	GWNTMGRRW	4	6.3
	HHC176	RRMGNGGFR	4	8.7
15	HHC177	SKNVRTWRQ	4	7.6
	HHC178	ARGRWINGR	4	7.2
	HHC179	GSRRSVWVF	4	2.3
20	HHC180	WSQNVRTRI	4	5.7
	HHC181	GMRRWRGKN	4	6.0
	HHC182	RGRTSNWKM	4	7.1
25	HHC183	GRRWGMGVR	4	7.7
	HHC184	WGKRRGWNT	4	7.9
	HHC185	AMLGGRQWR	4	6.7
30	HHC186	QRNKGLRHH	4	8.8
	HHC187	ARGKSIKNR	4	8.3
	HHC188	NRRNGQMRR	4	8.4
35	HHC189	RGRRQIGKF	4	8.5
	HHC190	ASKRVGVRN	4	8.2
	HHC191	GRIGGKNVR	4	9.1
40	HHC192	NKTGYRWRN	4	8.3
	HHC193	VSGNWRGSR	4	8.5
	HHC194	GWGGKRRNF	4	7.3
	HHC195	KNNRRWQGR	4	6.4
45	HHC196	GRTMGNGRW	4	6.9
	HHC197	GRQISWGRT	4	8.0
	HHC198	GGRGTRWHG	4	8.6
50	HHC199	GVRSWSQRT	4	8.5
	HHC200	GSRRFGWNR	4	8.1

55 Para evaluar adicionalmente la exactitud de los modelos de estructura-actividad desarrollados, 25 candidatos a péptido (Tabla 9) se seleccionaron al azar de los 200 péptidos anteriormente descritos y que representan el intervalo entero de actividades predichas. Así, se seleccionaron cinco a ocho secuencias de cada cuartil de los 100.000 péptidos predichos ordenados por sus votos acumulados y clasificación. Así, se esperaba que el conjunto de 25 péptidos seleccionados contuviera entradas de alta, media, baja inactividad y completamente inactivas (aproximadamente correspondientes a los cuartiles).

60 Los péptidos seleccionados se sintetizaron y se ensayaron contra varios patógenos resistentes a antibióticos importantes. Inicialmente, los péptidos se cribaron contra la cepa de laboratorio de *P. aeruginosa* PAO1 para comparar los resultados con los datos de entrenamiento. Se confirmó que los candidatos a péptido seleccionados del 'cuarto cuartil' no poseyeron ninguna actividad antimicrobiana, como se había predicho por QSAR (HHC-152, HHC-183, HHC-186, HHC-189 y HHC-190). La actividad antibacteriana en forma de concentración inhibitoria mínima (CIM) de los otros péptidos estudiados se evaluó en mayor profundidad (Tabla 9) contra muchos patógenos

altamente resistentes a antibióticos.

**Tabla 9. Valores de actividad de CIM para los péptidos diseñados por QSAR.**

Péptido	Secuencia	MIC (µM)															
		PA	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
Bac2A	RLARIVRVAR	35	48	192	95	12	3	24	24	192	24	24	12	48	12	3	48
HHC-8	KIWWWIKR	5	6	47	24	5.9	3	94	6	47	6	6	24	94	6	1.5	94
HHC-9	RWRRWKWWL	37	3	12	12	0.3	0.7	6	3	11	3	3	23	92	6	1.4	92
HHC-10	KRWKWRW	1.4	0.8	6	1.5	0.8	0.4	3	1.5	6	3	1.5	12	99	3	1.5	49
HHC-20	WRWIKIKR	5	6	24	24	1.5	0.8	12	6	24	3	3	24	94	6	1.5	94
HHC-36	KRWKWRWR	4	0.7	5.7	1.4	0.3	1.4	11	3	22	3	1.4	43	>174	11	1.3	174
HHC-45	WKRWWWKWR	7	23	46	46	6	1.4	93	3	46	68	6	93	>186	23	6	>186
HHC-48	WKWKWRWR	7	23	46	46	6	1.4	23	3	46	1.4	39	93	>186	12	6	>186
HHC-53	FRRWKWFK	4.2	1.5	12	3.0	1.5	0.8	24	6	24	1.5	3	24	195	6	6	97
HHC-57	LRWWWIKRI	12	13	50	25	6	3	50	13	50	6	63	13	50	6	1.5	25
HHC-66	RKRLKWWY	7	25	50	50	6	3	13	6	50	6	6	50	>202	13	3	202
HHC-69	KRWVWIRY	8	25	51	25	3	1.6	25	13	51	13	13	25	102	6	6	102
HHC-71	KWKIFRRWW	6	12	24	24	3	1.5	6	12	97	3	3	24	97	24	6	97
HHC-75	RKWIWRWFL	5	6	12	3	1.5	1.5	3	1.5	3.1	31	3	6	24	3	3	24
HHC-77	IWWWKRRWV	10	6	48	12	6	1.5	6	6	12	3	3	24	48	6	3	48
HHC-100	RRFKFIRWW	9	6	24	49	3	0.8	12	12	49	6	6	12	98	6	6	49
HHC-123	AVWKFKRV	360	240	>240	240	120	60	>240	120	>240	240	240	>240	>240	120	120	>240
HHC-126	AWRFKIRK	376	>223	>223	>223	111	>223	>223	223	>223	223	>223	>223	>223	>223	223	>223
HHC-133	KRIMKIKMR	269	>226	>226	>226	>226	>226	>226	>226	>226	>226	>226	>226	>226	>226	>226	>226
HHC-142	AIRWRIRK	184	>217	>217	>217	217	108	108	108	>217	54	54	>217	>217	108	14	>217
HHC-148	VVLKIVRRF	1104	>241	>241	>241	241	60	241	241	>241	241	241	241	>241	241	60	>241
HHC-152	AFRGRHRM	506	NT														
HHC-183	GRRWGMGVR	360	NT														
HHC-186	QRNKGLRHH	381	NT														

(Continuación)

Péptido	Secuencia	MIC (µM)																
		PA	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	
HHC-189	RGRRQIGKF	379	NT															
HHC-190	ASKRVGVRN	413	NT															

Column legends: **PA01**, *P. aeruginosa* Lab strain; **A**, *P. aeruginosa* wild type strain H103; **B,C**, *P. aeruginosa* multidrug resistant strains from Brazil strain H9 and H123; **D**, *P. aeruginosa* multidrug resistant Liverpool epidemic strains H1031, H1030, and H1027 respectively; **E**, multidrug resistant *Pseudomonas maltophilia* ATCC13637; **F**, Extended-Spectrum β-lactamase-producing β-lactam resistant (ESBL) *Enterobacter cloacae* strain C601; **G**, ESBL *E. coli* clinical strain 64771; **H**, ESBL *Klebsiella pneumoniae* clinical strain 63575; **I**, *S. aureus* ATCC25923; **J**, Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) strain C623; **K**, *Enterococcus faecalis* ATCC29212; **L,M**, VRE Vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* clinical isolates w61950 (VanA) and f43559 (VanB); **N,O**, VRE Vancomycin resistant *Enterococcus faecium* clinical isolates mic80 (VanA) and t62764 (VanB).

Todos los péptidos en la Tabla 9 tuvieron propiedades físicas similares. Estos resultados experimentales demostraron inequívocamente que el enfoque de QSAR puede utilizarse para predecir con exactitud la actividad antimicrobiana de péptidos diseñados *de novo*. Así, los 7 derivados del 'primer cuartil' demostraron actividad muy significativa contra PAO1 de *P. aeruginosa* oscilando los parámetros de CIM correspondientes de 1,4  $\mu\text{M}$  a 6,8  $\mu\text{M}$ . Además, 2 de los 7 péptidos del 'primer cuartil' (HHC-8, HHC-9, HHC-10, HHC-20, HHC-36, HHC-45 y HHC-48) superaron en realidad al líder más activo del conjunto de entrenamiento 'conjunto A' (con CIM = 3,29  $\mu\text{M}$ ). De forma suficientemente interesante, solo hubo 6 péptidos con CIM < 7  $\mu\text{M}$  que pudieron encontrarse en el 'conjunto A' completo. En otro 'conjunto B' de entrenamiento pre-diseñado, solo 1 de las 500 entradas demostraron una CIM < 6  $\mu\text{M}$ . Y, lo que es más importante, los péptidos seleccionados del 'segundo cuartil' también demostraron actividad antimicrobiana sustancial porque sus valores de CIM oscilaron entre 4  $\mu\text{M}$  y 12  $\mu\text{M}$  (HHC-53, HHC-57, HHC-66, HHC-69, HHC-71, HHC-75, HHC-77 y HHC-100). Como se predice por QSAR, la selección del tercer cuartil (HHC-123, HHC-126, HHC-133, HHC-142, HHC-148) no devolvió ninguna sustancia generalmente activa, mientras que los péptidos del cuarto cuartil fueron todos prácticamente completamente inactivos.

Estos resultados ilustran claramente que el enfoque de QSAR puede predecir con exactitud la actividad antimicrobiana de péptidos y permitir el desarrollo de modelos de estructura-actividad que crean listas de candidatos a fármaco. Para ilustrar esa importante observación, los presentes inventores derivaron la mediana de MIC para PAO1 de *P. aeruginosa* para los conjuntos de entrenamiento A (91  $\mu\text{M}$ ) y B (127  $\mu\text{M}$ ) en comparación con la mediana de MIC correspondiente para los péptidos experimentalmente probados del 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup> y 4<sup>o</sup> cuartiles (7, 13, 172 y 379  $\mu\text{M}$ , respectivamente). Así, estos resultados demostraron el rendimiento superior de la comparación de enfoques de QSAR basados en átomos con estrategias de diseño de péptidos convencionales que se basan tradicionalmente en propiedades de carga, hidrofobia y/o anfipaticidad de aminoácidos aislados. Para ilustrar más esta noción, la mediana de los valores de carga formal, fracción hidrófoba y momento hidrófobo se calculó para los péptidos presentes en los conjuntos de entrenamiento A y B, además de para los 100.000 candidatos predichos que pueblan los cuartiles (Fig. 9).

Este cuadro demuestra claramente que hubo variación muy limitada en la carga (Q), hidrofobia (P) y momentos hidrófobos (MH) de los péptidos en los 4 cuartiles de actividad, aunque sus actividades antimicrobianas variaron tremendamente. Así, el modelado adecuado de la actividad antimicrobiana de péptidos catiónicos demanda enfoques de estructura-actividad sustancialmente más refinados que incluyen un nivel atómico detallado de consideración de estructuras moleculares, en vez de la simple consideración de las características polares e hidrófobas de los aminoácidos constituyentes.

Todos los péptidos derivados de los 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup> y 3<sup>o</sup> cuartiles se evaluaron adicionalmente para sus actividades antibacterianas contra varios patógenos altamente resistentes a antibióticos (Tabla 3). Éstos incluyeron cepas aisladas clínicas de MRSA, ESBL, *E. cloacae* y cepas de *Pseudomonas* resistentes a múltiples fármacos que incluyen cepas aisladas clínicas brasileñas de *P. aeruginosa* que son resistentes a meropenem, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, ciprofloxacina, cefepima y polimixina B, y las cepas epidémicas de Liverpool. Los 15 péptidos del 1<sup>o</sup> y 2<sup>o</sup> cuartiles demostraron actividad significativa contra cepas resistentes e inhibieron eficazmente el crecimiento bacteriano a bajas concentraciones de  $\mu\text{M}$ . Algunos candidatos tales como HHC-9, HHC-10, HHC-36 y HHC-75 presentaron 1-10  $\mu\text{M}$  de actividad contra casi todas las bacterias multirresistentes probadas. Tales resultados caracterizan los péptidos desarrollados como excelentes candidatos a antibióticos, proporcionando nuevos medios para tratar las formas más peligrosas y graves de infecciones humanas.

Para confirmar adicionalmente esto se utilizó un modelo de ratón de infección bacteriana agresiva, usado ampliamente para evaluar la eficacia antibiótica. Se trataron ratones con  $1,6 \times 10^{10}$  UFC IP. Cuatro horas después de la infección recibieron una dosis de 4 mg/kg del péptido IP. Se dejó que la infección progresara durante 20 horas más, durante un tiempo de infección total de 24 horas. Los ratones de control inyectados con solo solución salina demostraron el 100 % de muerte; a diferencia, HHC-10 protegió el 40 % de ratones mientras que HHC-36 protegió el 60 % de ratones. Un segundo experimento con administración de  $1,4 \times 10^{10}$  IP produjo reducción significativa en el número de bacterias en los animales administrados con el péptido (Fig. 10).

Para evaluar la posible toxicidad del huésped de los compuestos desarrollados, los presentes inventores también probaron 20 péptidos para su actividad hemolítica (Fig. 11) que demostró que los antibióticos desarrollados no afectan las células huésped.

Entre los péptidos antimicrobianos de nueve aminoácidos preferidos se encontró un claro patrón de péptidos relacionados que representó obviamente menores sustituciones, deleciones o adiciones con una secuencia de base representada por SEC ID N<sup>o</sup>: 1022. Así, estos péptidos tienen una clara relación unitaria. En los siguientes alineamientos de secuencias las letras en negrita representan aminoácidos que son idénticos o representan sustituciones conservativas (es decir, sustituciones de aminoácidos hidrófobos A, L, V, W, I o F; o sustituciones de carga R o K).

HHC-10	<b>KRWWK-WIRW</b>	SEQ IDNO:1022
HHC-36	<b>KRWWK-WWRR</b>	SEQ IDNO:1048
HHC-8	<b>KIWWW-W-RKR</b>	SEQ IDNO:1020
HHC-20	<b>WRWWKIWKR</b>	SEQ IDNO:1032
HHC-45	<b>WKRWKWKW-R</b>	SEQ IDNO:1057
HHC-48	<b>WKKWKR-RW</b>	SEQ IDNO:1060

## EJEMPLO 7

### IMPACTO ANTISÉPTICO SOBRE LA INMUNIDAD INNATA

Es muy conocido que los péptidos antimicrobianos catiónicos tengan la capacidad de reforzar la inmunidad a la vez que suprimen las respuestas sépticas a moléculas de patrón molecular asociadas a patógeno bacteriano como lipopolisacárido y ácidos lipoteicoicos, además de reducir la inflamación y endotoxemia (Finlay, B.B. y R.E.W. Hancock. 2004. Can innate immunity be enhanced to treat infections Nature Microbiol. Rev. 2:497-504).

Se ha mostrado previamente en el laboratorio de los presentes inventores que los péptidos 12-meros pequeños como Bac2A y péptidos 13-meros como indolicidina tienen actividad antiendotóxica bastante modesta que puede evaluarse midiendo la capacidad del péptido para suprimir la producción estimulada por LPS de TNF $\alpha$  por macrófagos. Es muy conocido para otros péptidos antimicrobianos catiónicos que esto se corresponde con la actividad antiendotóxica en invertir la endotoxemia letal en modelos animales (Gough M, Hancock REW, y Kelly NM. 1996. Anti-endotoxic potential of cationic peptide antimicrobials. Infect. Immun. 64, 4922-4927). A diferencia, se sabe que LL-37 tiene excelente actividad antiendotóxica *in vitro*, como se ha evaluado por su capacidad para suprimir la inducción mediada por LPS de TNF $\alpha$  en células monocíticas y esto se refleja por su capacidad para tanto reducir la inducción de TNF $\alpha$  mediada por endotoxina como la letalidad en un modelo de ratón (Scott, M.G., D.J. Davidson, M.R. Gold, D. Bowdish, y R.E.W. Hancock. 2002. The human antimicrobial peptide, LL-37, is a multifunctional modulator of innate immune responses. J. Immunol. 169:3883-3891). Se probó una selección de péptidos y algunos de éstos tuvieron de hecho excelente actividad antiendotóxica (Fig. 12).

Solo tres de los péptidos mostraron cualquier evidencia de citotoxicidad hacia células THP-1, y esto fue solo evidente a 100  $\mu$ g/ml de péptido (Tabla 10). Además, los siguientes péptidos se probaron para liberación de LDH: 1002, 1005, 1012, 1010, 1013, 1018, 1020, 1026, 1028, 1032, 1033, 1035 y 1037. Ninguno mostró ninguna liberación de LDH incluso a 200  $\mu$ g/ml.

**Tabla 10. Citotoxicidad de péptidos contra células THP-1 probadas a 10 y 100  $\mu$ g/ml.**

Nombre	Citotoxicidad
HH1	No se observó citotoxicidad
HH2	No se observó citotoxicidad
HH3	No se observó citotoxicidad
HH4	No se observó citotoxicidad
HH5	50-60% a 100 $\mu$ g/ml
HH6	No se observó citotoxicidad
HH7	No se observó citotoxicidad
HH8	No se observó citotoxicidad
HH14	No se observó citotoxicidad
HH15	25% a 100 $\mu$ g/ml
HH16	80% a 100 $\mu$ g/ml
HH17	No se observó citotoxicidad

LPS de la cepa H103 de *P. aeruginosa* se purificó altamente libre de proteínas y lípidos usando el procedimiento de Darveau-Hancock. Brevemente, se cultivó *P. aeruginosa* durante la noche en caldo LB a 37 °C. Las células se recogieron y se lavaron y los sedimentos de LPS aislados se extrajeron con una disolución 2:1 de cloroformo:metanol para eliminar lípidos contaminantes. Las muestras de LPS purificadas se cuantificaron usando un ensayo para el ácido 2-ceto-3-desoxioctosónico (ensayo de KDO) de azúcar específico y luego se resuspendió en agua sin endotoxinas (Sigma-Aldrich).

Se obtuvieron células monocíticas humanas, THP-1, de la Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC® (TIB-202) y se cultivaron en suspensión en medio RPMI-1640 (Gibco®, Invitrogen™ Life technologies, Burlington, ON), complementado con 10 % (v/v) de suero bovino fetal (SBF) inactivado por calor, L-glutamina 2 mM y piruvato de

sodio 1 mM (todos de Invitrogen Life Technologies). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una estufa de incubación con 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub> humidificada hasta un máximo de seis pases. Las células THP-1 a una densidad de 1 x 10<sup>6</sup> células/ml se trataron con 0,3 µg/ml de 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA; Sigma-Aldrich Canada, Oakville ON) durante 24 horas, induciendo células adherentes al plástico que reposaron adicionalmente en medio RPMI-1640 completo durante 24 horas adicionales antes de la estimulación con diversos tratamientos que incluyen LPS de *P. aeruginosa* (10 ng/ml) con o sin péptidos durante 24 horas después de lo cual los sobrenadantes se recogieron y el TNF $\alpha$  se evaluó por ELISA.

Las células THP-1 se estimularon con LPS (10 ng/ml) con o sin péptido (10 ó 100 µg/ml) durante 4 horas como se indica en la sección de resultados. Tras la incubación de las células bajo diversas pautas de tratamiento, los sobrenadantes de cultivo de tejido se centrifugaron a 1000 x g durante 5 min, luego a 10.000 x g durante 2 min para obtener muestras sin células. Lo sobrenadantes se tomaron en alícuotas y luego se guardaron a -20 °C antes del ensayo para diversas citocinas. La secreción de TNF $\alpha$  se detectó con un ELISA de captura (eBioscience y BioSource International Inc., CA, EE.UU., respectivamente).

Los datos en la FIG. 12 demostraron que el LPS como era de esperar indujo grandes niveles de TNF $\alpha$ . Esto se suprimió fuertemente por el péptido de control LL-37, además de por los novedosos péptidos HH2, HH3, HH6, HH8, HH15 y HH16. Además, varios de los péptidos restantes, que incluyen HH1, HH5 y HH17, no provocaron un aumento significativo en la producción de TNF $\alpha$ .

**Efectos antiendotoxina de péptidos derivados de indolicidina.** Se sabe que algunos péptidos más pequeños, como indolicidina (Bowdish DM, Davidson DJ, Scott MG, Hancock REW. Immunomodulatory activities of small host defense peptides. Antimicrobial Agents Chemotherapy 49:1727-32, 2005), pueden inhibir la producción de citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$  en respuesta a endotoxina. Por tanto, se probaron una variedad de péptidos derivados de indolicidina para su capacidad para inhibir respuestas de TNF $\alpha$  después de la exposición a LPS de *P. aeruginosa*. Los resultados se presentan en la FIG. 13. Básicamente, los presentes inventores fueron capaces de demostrar que los siguientes péptidos HH63, HH111, HH117, HH235, HH973, HH1010 y HH1011 fueron ligeramente mejores o equivalentes a la indolicidina.

## EJEMPLO 8

### POTENCIAMIENTO DE LA INMUNIDAD INNATA

El péptido humano natural LL-37 puede proteger contra infecciones bacterianas a pesar de que no tiene actividad antimicrobiana bajo condiciones fisiológicas (Bowdish, D.M.E., D.J. Davidson, Y.E. Lau, K. Lee, M.G. Scott, y R.E.W. Hancock. 2005. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. J. Leukocyte Biol. 77:451-459). Parece que manifiesta esta actividad debido a su capacidad para inducir la producción de ciertas quimiocinas que pueden reclutar subconjuntos de células de inmunidad innata a tejidos infectados. Por tanto, los presentes inventores probaron si los péptidos novedosos descritos aquí tuvieron la capacidad para inducir la producción de quimiocinas en células mononucleares de sangre periférica humanas.

Sangre venosa (20 ml) de voluntarios sanos se recogió en tubos de recogida Vacutainer<sup>®</sup> que contenían heparina sódica como anticoagulante (Becton Dickinson, Mississauga, ON) según la aprobación ética y pautas del UBC. La sangre se diluyó 1:1 con medio RPMI 1640 completo y se separó por centrifugación sobre un gradiente de densidad de Ficoll-Paque<sup>®</sup> Plus (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EE.UU.). Se aislaron glóbulos blancos de la capa leucocitaria, se lavaron dos veces en medio completo RPMI 1640 y el número de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se determinó por exclusión con azul de tripano. Las CMSP (5 x 10<sup>5</sup>) se sembraron en placas de cultivo de tejido de 12 pocillos (Falcon; Becton Dickinson) a 0,75 a 1 x 10<sup>6</sup> células/ml a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub>. Las condiciones anteriores se eligieron para imitar las condiciones para monocitos de sangre circulante que entran en los tejidos en el sitio de infección mediante extravasación.

Tras la incubación de las células bajo diversas pautas de tratamiento, los sobrenadantes de cultivo de tejido se centrifugaron a 1000 x g durante 5 min, luego a 10.000 x g durante 2 min para obtener muestras sin células. Los sobrenadantes se tomaron en alícuotas y luego se guardaron a -20 °C antes del ensayo para diversas quimiocinas por ELISA de captura (eBioscience y BioSource International Inc., CA, EE.UU., respectivamente)

Como se muestra en la FIG. 14, la mayoría de los péptidos estimularon la expresión de la quimiocina de neutrófilos IL8 incluso a la menor concentración de péptido utilizada (20 µg/ml). Los péptidos HH2, HH4, HH7, HH8, HH13, HH7, HH14 y HH18 parecieron tener las capacidades más fuertes para inducir esta quimiocina.

La quimiocina de monocito MCP1 (Fig. 15) también se indujo por un subconjunto de los péptidos que incluyen especialmente, HH1, HH2, HH4, HH7, HH8, HH14 y HH18. Se obtuvo un resultado similar para experimentos que investigan la liberación de la quimiocina de macrófagos MCP3 (Fig. 16) y quimiocina de neutrófilos Gro- $\alpha$  (Fig. 17), aunque HH1 no fue activa en este ensayo.

Basándose en estos resultados, péptidos nuevos se diseñaron iterativamente a partir de los mejores péptidos por sustitución y/o reordenamiento de secuencias de péptidos. La selección de estos péptidos a partir de la inducción de quimiocinas en CMSP humanas dio los resultados presentados en la Tabla 11.

5 **Tabla 11. Inducción de quimiocinas (pg/ml) por nuevos péptidos en CMSP humanas.** Se realizaron experimentos 2-4 veces. Se restaron los valores de referencia en promedio de 204 (MCP-1), 6 (MCP-3) y 196 (Gro- $\alpha$ ). Los números en negrita representan regulación por incremento significativa ( $p < 0,05$ ).

Nombre	Secuencia	La inducción de quimiocinas (pg / ml) por las concentraciones indicadas de péptido					
		MCP-1		MCP-3		Gro- $\alpha$	
		20 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ g/ ml	20 $\mu$ g/ ml	100 $\mu$ g/ ml	20 $\mu$ g/ ml	100 $\mu$ g/ ml
Background	No peptide	204		6		196	
Bac2a	RLARIVIRVAR	<b>316</b>	<b>442</b>	2	2	9	8
<b>HH2</b>	<b>VQLRIRVAVIRA</b>	<b>4882</b>	<b>10235</b>	<b>86</b>	<b>283</b>	<b>867</b>	<b>2693</b>
1001	LVRAIQVRAVIR	<b>516</b>	<b>2491</b>	0	<b>40</b>	<b>89</b>	<b>850</b>
1002	VQRWLIWVRIRK	<b>2472</b>	<b>5566</b>	<b>13</b>	<b>141</b>	<b>1032</b>	<b>2117</b>
1003	IVWKIKRWWWGR	31	<b>1361</b>	0	5	65	170
1004	RFWKVRVKYIRF	<b>300</b>	<b>1680</b>	1	<b>30</b>	55	<b>336</b>
1005	VQLRIRVAV	<b>1228</b>	<b>4555</b>	<b>23</b>	<b>126</b>	<b>332</b>	<b>2247</b>
1006	VQLRIWVRR	<b>392</b>	<b>3004</b>	0	<b>58</b>	65	<b>1245</b>
1007	WNRVKWIRR	103	<b>247</b>	<b>7</b>	<b>28</b>	65	170
1008	RIKWIVRFR	<b>633</b>	<b>1775</b>	1	<b>22</b>	109	<b>869</b>
<b>HH7</b>	<b>VRLRIRVAVRRA</b>	<b>894</b>	<b>1197</b>	<b>11</b>	<b>14</b>	122	152
1009	AIRVVRARLVRR	<b>634</b>	<b>1093</b>	6	<b>6</b>	<b>230</b>	<b>377</b>
1010	IRWRIRVWVRR	<b>706</b>	<b>5662</b>	3	<b>604</b>	149	<b>1384</b>
1011	RRWVWVRVQRR	<b>579</b>	<b>2282</b>	1	<b>35</b>	46	<b>308</b>
1012	IFWRRIVVKKF	<b>11475</b>	<b>30148</b>	<b>1103</b>	<b>3303</b>	<b>3873</b>	<b>7542</b>
1013	VRLRIRVAV	<b>1914</b>	<b>4734</b>	<b>22</b>	<b>214</b>	<b>609</b>	<b>2101</b>
1014	RQVIVRRW	83	175	0	1	6	15
1015	VLIRWNGKK	113	<b>644</b>	0	<b>10</b>	42	178
1016	LRIRWIFKR	<b>269</b>	<b>819</b>	1	<b>27</b>	26	<b>247</b>
<b>HH8</b>	<b>VRLRIRVAVIRK</b>	194	180	1	3	7	4
1017	KRIVRRLVARIV	<b>585</b>	<b>1019</b>	0	0	56	<b>250</b>
1018	VRLIVAVRIVRR	<b>8774</b>	<b>13041</b>	<b>156</b>	<b>604</b>	<b>826</b>	<b>2692</b>
1019	IVWRRQLVKNK	27	<b>438</b>	0	0	5	43
1020	VRLRIRWWWLRK	<b>2485</b>	<b>2813</b>	<b>82</b>	<b>35</b>	<b>760</b>	<b>370</b>
1021	VRLRIRVAV	158	<b>276</b>	3	<b>10</b>	29	112
1022	LRIRVIVWR	52	<b>983</b>	0	1	10	64
1023	IRVWVLRQR	<b>250</b>	<b>712</b>	0	1	36	38
1024	RIRVIVLKK	<b>285</b>	81	1	0	20	-21
<b>HH12</b>	<b>KQFRIRVRVIRK</b>	<b>1649</b>	<b>635</b>	<b>91</b>	<b>21</b>	<b>773</b>	172
1025	RRIVKKFQIVRR	109	<b>284</b>	1	3	-3	32
1026	VQWRIRVRVIRK	<b>403</b>	<b>4717</b>	1	<b>430</b>	77	<b>2124</b>
1027	KKQVSRVKVWRK	54	<b>1466</b>	0	<b>14</b>	8	<b>204</b>
1028	LIQRIRVRNIVK	41	<b>385</b>	0	<b>7</b>	-17	34

Continuación

5	1029	KQFRIRVRV	<b>296</b>	<b>205</b>	3	3	49	60
	1030	FRIRVRVIR	139	<b>2075</b>	1	<b>35</b>	10	<b>674</b>
	1031	WRWRVRVWR	<b>875</b>	<b>552</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	172	112
10	1032	IRVRVWRK	<b>896</b>	203	<b>21</b>	3	<b>297</b>	12
	<b>HH15</b>	<b>KRFRIRVRVIRK</b>	61	<b>303</b>	0	5	17	17
	1033	RRVIVKKFRIRR	<b>1747</b>	<b>301</b>	<b>61</b>	6	<b>359</b>	6
15	1034	KQFRNRLRIVKK	<b>434</b>	<b>796</b>	0	4	60	61
	1035	KRWRWIVRNIRR	15	75	0	1	10	27
	1036	VQFRIRVIVIRK	<b>601</b>	<b>968</b>	1	<b>39</b>	51	137
20	1037	KRFRIRVRV	50	33	0	0	-12	-21
	1038	IVRRVIRK	25	<b>1552</b>	0	<b>41</b>	12	<b>518</b>
	1039	IWVIRRVWR	<b>603</b>	<b>2420</b>	<b>13</b>	<b>67</b>	<b>469</b>	<b>1717</b>
25	1040	FQVVKIKVR	74	<b>1143</b>	0	<b>9</b>	2	<b>264</b>
	<b>HH18</b>	<b>IWVIWRR</b>	<b>1111</b>	<b>9608</b>	<b>32</b>	<b>431</b>	<b>865</b>	<b>2964</b>
	1041	VIWIRWR	146	<b>1218</b>	<b>7</b>	<b>53</b>	110	<b>450</b>
30	1042	IWVIWRR	-7	12	3	3	44	9
	1043	WVIWRR	98	<b>1998</b>	0	<b>21</b>	26	<b>881</b>
	1044	RRWIVWI	<b>1561</b>	<b>5024</b>	<b>115</b>	<b>261</b>	<b>1963</b>	<b>1545</b>
35	1045	RWWRIVI	-2	<b>989</b>	0	<b>31</b>	13	<b>435</b>
	1046	WIRVIRW	46	<b>449</b>	1	4	38	147
	1047	IIRWWWV	8	130	0	0	-1	-3
40	1048	IRWVIRW	96	38	0	0	7	-11
	HH 1	QRLRIRVAVIRA	0	2	<b>35</b>	<b>49</b>	45	<b>516</b>
	HH3	VRFRIRVAVIRA	0	2	<b>26</b>	<b>38</b>	19	179
	HH4	VRWRIRVAVIRA	7	30	<b>157</b>	<b>62</b>	<b>333</b>	<b>370</b>
45	HH13	HQFRFRFRVRRK	1	0	<b>40</b>	<b>54</b>	15	42
	HH14	HQWRIRVAVRRH	0	39	<b>140</b>	<b>273</b>	53	<b>1279</b>
	HH17	KIWVRWK	0	0	<b>37</b>	<b>36</b>	48	132
50	HHC-8	KIWWWWWRKR	68	<b>835</b>	1	4	9	-11
	HHC-9	RWRRWKWWL	9	<b>4493</b>	-1	<b>48</b>	-25	5
	HHC-10	KRWWKWIRW	48	<b>3210</b>	-1	<b>49</b>	-11	2
55	HHC-20	WRWWKIWKR	<b>290</b>	<b>974</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	169	33
	HHC-36	KRWWKWWR	38	168	1	1	19	-8
	HHC-45	WKRWWKKWR	-9	161	-2	-2	-15	-32
60	HHC-48	WKKWWWKRRW	2	12	-1	-1	-8	-10
	HHC-53	FRRWWKWFK	-26	<b>391</b>	-1	5	-23	2

65

Continuación

5	HHC-57	LRWWWIKRI	146	<b>1364</b>	0	<b>9</b>	21	18
	HHC-66	RKRLKWWIY	<b>351</b>	<b>355</b>	0	0	-12	-23
	HHC-69	KKRWWVIRY	<b>440</b>	<b>245</b>	1	0	17	-3
	HHC-71	KWKIFRRWW	-6	99	0	2	-17	1
10	HHC-75	RKWMRWFL	<b>1313</b>	<b>6140</b>	<b>34</b>	<b>322</b>	<b>554</b>	<b>1683</b>
	HHC-77	IWWWKWRRWV	98	<b>4548</b>	0	<b>23</b>	-22	50
	HHC-100	RRFKFIRWW	179	197	-1	0	-18	-43
15	HHC-123	AVWKFVKRV	46	204	0	3	-25	17
	HHC-126	AWRFKNIRK	<b>314</b>	104	3	0	75	-2
	HHC-133	KRIMKLMR	195	<b>444</b>	0	2	15	81
20	HHC-142	AIRRWIRK	67	-16	1	0	59	22
	HHC-148	VVLKIVRRF	25	<b>210</b>	1	3	55	60

Estas actividades inmunomoduladoras condujeron a la protección contra infecciones por *S. aureus*. Brevemente, se utilizó un modelo de ratón de infección bacteriana agresiva, usado ampliamente para evaluar la eficacia antibiótica. Se trataron ratones con  $1,6 \times 10^{10}$  UFC de *S. aureus* intraperitonealmente como se ha descrito previamente (Scott, M.G. y col., 2007. An anti-infective peptide that selectively modulates the innate immune response. Nature Biotechnology 25: 465-472). Cuatro horas después de la infección recibieron una dosis de 4 mg/kg de péptido IP. La infección se dejó progresar durante 4 ó 24 horas tras lo cual los ratones se sacrificaron y se determinaron los recuentos en placa de estafilococos supervivientes en el peritoneo. La Figura 18 muestra los resultados para los péptidos HH2, HH18 y HH17, mientras que la Figura 19 muestra los resultados para 1002 y 1012.

Entre los péptidos inmunomoduladores de doce aminoácidos preferidos se encontró un claro patrón de péptidos relacionados que representó obviamente sustituciones menores, deleciones o adiciones con una secuencia base representada por SEC ID N°: 2. Así, estos péptidos tienen una clara relación unitaria. En los siguientes alineamientos de secuencias las letras en negrita representan aminoácidos que son idénticos o representan sustituciones conservativas (es decir, sustituciones de aminoácidos hidrófobos A, L, V, W, I o F o sustituciones de carga R o K).

40	HH2	<b>VQLR-IRV-AVIRA</b>	SEQ ID NO: 2
	1001	<b>LV-RAIQVRAVIR</b>	SEQ ID NO:1213
	1002	<b>VQ-RWLIV-WRIRK</b>	SEQ ID NO:1214
	1010	<b>IRWR-IRVW-VRRI</b>	SEQ ID NO:1222
	1012	<b>IFWRRI-V-IVKKF</b>	SEQ ID NO:1224
45	1018	<b>VRLI-VAVR-IWRR</b>	SEQ ID NO:1230
	1020	<b>VRLR-IR-WWVLRK</b>	SEQ ID NO:1232
	HH12	<b>KQFR-IRVR-VIRK</b>	SEQ ID NO: 12
50	1026	<b>VQWR-IRVR-VIKK</b>	SEQ ID NO:1238

Entre los péptidos inmunomoduladores de nueve aminoácidos preferidos se encontró un claro patrón de péptidos relacionados que representó obviamente sustituciones menores, deleciones o adiciones con una secuencia base representada por SEC ID N°: 1225. Así, estos péptidos tienen una clara relación unitaria. En los siguientes alineamientos de secuencias las letras en negrita representan aminoácidos que son idénticos o representan sustituciones conservativas (es decir, sustituciones de aminoácidos hidrófobos A, L, V, W, I o F; o sustituciones de carga R o K).

60	1013	<b>VRLRIRVAV</b>	SEQ ID NO:1225
	1005	<b>VQLRIRVAV</b>	SEQ ID NO:1217
	1006	<b>VQLRIWVRR</b>	SEQ ID NO:1218
	1030	<b>FRIRVRVIR</b>	SEQ ID NO:1242
	1031	<b>WRWRVRVWR</b>	SEQ ID NO:1243
65	1032	<b>IRVRV-IWRK</b>	SEQ ID NO:1244

Entre los péptidos inmunomoduladores de siete aminoácidos preferidos se encontró un claro patrón de péptidos relacionados que representó obviamente sustituciones menores, deleciones o adiciones con una secuencia base representada por SEC ID N°: 18. Así, estos péptidos tienen una clara relación unitaria. En los siguientes alineamientos de secuencias las letras en negrita representan aminoácidos que son idénticos o representan sustituciones conservativas (es decir, sustituciones de aminoácidos hidrófobos A, L, V, W, I o F; o sustituciones de carga R o K).

HH18 **IWVIWRR** SEQ ID NO: 18  
 1041 **VIWIRWR** SEQ ID NO: 1253  
 1043 **WIVIWRR** SEQ ID NO: 1255

**EJEMPLO 9**

**ADYUVANTICIDAD COMO RESULTADO DE LA POTENCIACION DE LA INMUNIDAD INNATA**

Es bien aceptado que la inmunización con vacuna se consigue mejor por co-administración de un adyuvante. El mecanismo preciso por el que estos adyuvantes funcionan ha eludido a los inmunólogos, pero parece que funciona en parte regulando por incremento los elementos de inmunidad innata que suavizan la transición a inmunidad adaptativa (específica para antígeno) (Bendelac A y R. Medzhitov. 2002. Adjuvants of immunity: Harnessing innate immunity to promote adaptive immunity J. Exp. Med. 195:F19-F23). Dentro de este concepto hay varios caminos posibles por lo que los adyuvantes podrían funcionar que incluyen la atracción de células inmunitarias en el sitio en el que se inyecta un antígeno particular mediante, por ejemplo, la regulación por incremento de quimiocinas, la apropiada activación de células cuando alcanzan ese sitio, que puede producirse por lesión local de células o tejidos que liberan adyuvantes endógenos o mediante activación celular específica por los adyuvantes, y la compartimentalización de respuestas inmunitarias al sitio de inmunización (el llamado efecto “prolongado”). Debido a su capacidad para modular selectivamente las respuestas de células, que incluyen inducción de la expresión de quimiocinas, los péptidos de defensa del huésped catiónicos tales como LL-37 humano y defensinas se han examinado para la actividad de adyuvante y demostraron que potenciaban respuestas inmunitarias adaptativas con una variedad de antígenos (Bowdish DM, DJ Davidson, REW Hancock. 2006. Immunomodulatory properties of defensins and cathelicidins. Curr Top Microbiol Immunol 2006:27-66). Por tanto, los presentes inventores estudian la capacidad de los pequeños péptidos de defensa del huésped de los presentes inventores para regular por incremento las respuestas de adyuvante en tanto CMSP humanas como células mononucleares de sangre de la médula (CMSM) (que representan las respuestas de glóbulos sanguíneos de neonatos), tanto solos (Tabla 10 y 11) como en combinación con otros agentes de adyuvante propuestos que podrían funcionar mediante otros mecanismos tales como oligodesoxirribonucleótidos de CpG (agonistas de TLR9 que activan células mediante la interacción con TLR9 y se ajustan en 3 clases diferentes A = molécula 2336, B = 10103 y C = 2395) y polifosfaceno P6 (que induce un efecto prolongado). Los resultados demuestran una variedad de péptidos que conducen a la regulación por incremento de la producción de quimiocinas (Tabla 10), y la mayoría de estos están tanto potenciando aditivamente la inducción de quimiocinas en presencia de CpG o la combinación de CpG y P6 (Tabla 12), como en realidad demuestran sinergia significativa (en negrita en la Tabla 12). En particular, HH2 mostró excelente capacidad para regular por incremento la producción de quimiocinas, sinergia significativa con CpG (particularmente CpG-B) en CMSP y CMSM, y una capacidad para potenciar respuestas específicas para antígeno en experimentos de modelo de ratón usando toxina Pertussis como adyuvante.

**Tabla 12. Posibles propiedades del adyuvante (capacidad para inducir citocinas y quimiocinas) de los péptidos en combinación con polifosfazinas (P6) y oligonucleótidos CpG de las clases A-C.** Todos los experimentos se realizaron con CMSP humanas, excepto aquellos indicados como que se han hecho con CMSM. Las referencias indicadas se restaron de las mediciones con diferentes adyuvantes solos y en combinación. Los números en negrita representan combinaciones aparentemente sinérgicas. NH = No hecho.

		Citoquinas inducidas (pg/ml)					
	Tratamiento	<b>Gro-<math>\alpha</math></b>	<b>MCP-3</b>	<b>MCP-1</b>	<b>IL-8</b>	<b>IL-6</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>
Control PBMC	Background	28	6	13	81	13	0

## Continuación

		Citoquinas inducidas (pg/ml)						
		Tratamiento	Gro- $\alpha$	MCP-3	MCP-1	IL-8	IL-6	TNF- $\alpha$
5	Peptide alone (20ug/nE)	HH2	21	0	54	624	23	0
		HH3	8	0	8	490	7	0
10		HH18	143	3	64	2558	180	56
		HH17	0	3	91	146	0	7
15	CpG alone (5ug/mL)	CpG-A (2336)	101	66	462	41	-2	26
		CpG-B (10103)	73	32	250	447	-3	12
		CpG-C (2395)	123	71	350	174	-5	24
20	HH2 + CpG	HH2+CpG-A	152	90	570	393	16	48
		HH2+CpG-B	280	<b>453</b>	<b>772</b>	344	7	56
		HH2+CpG-C	274	352	705	267	10	73
25	HH3 + CpG	HH3+CpG-A	110	47	593	292	-3	25
		HH3+CpG-B	198	207	<b>683</b>	522	0	36
		HH3+CpG-C	181	158	587	823	1	22
30	HH18+CpG	HH18+CpG-A	138	163	466	900	18	53
		HH18+CpG-B	138	<b>368</b>	614	2850	72	35
		HH18+CpG-C	119	<b>339</b>	534	1391	28	46
35	HH17+CpG	HH17+CpG-A	76	38	315	227	-2	40
		HH17+CpG-B	95	33	285	1323	1	26
		HH17+CpG-C	100	93	524	678	0	22
	Control PBMC	Background	5	ND	ND	9	ND	210
40	Peptide alone (5ug/mL)	1012	26	ND	ND	8	ND	-90
		1002	8	ND	ND	10	ND	282
	Polyphosphazene P6	P6 5ug/mL	0	ND	ND	-1	ND	83
		P6 10ug/mL	0	ND	ND	1	ND	35
45	CpG (5ug/mL)	CpG-B(10103)	205	ND	ND	18	ND	968
	Combination 5ug/mL	1012+P6+CpG-B	240	ND	ND	<b>48</b>	ND	1478
		1002+P6+CpG-B	16	ND	ND	23	ND	971
50	P6 10ug/mL, CpG and peptide at 5ug/mL	1002+P6+CpG-B	73	ND	ND	26	ND	373
		1012+P6+CpG-B	77	ND	ND	53	ND	1170
	Control CBMC	Background	25	110	121	413	20	8
55	CBMC Peptide alone (20ug/mL)	HH2	45	-40	131	104	11	-4
		HH3	37	-43	249	471	14	-8
		HH18	55	-24	54	372	7	-4
60		HH17	12	-41	25	41	-2	-8

continuación

5	Tratamiento	Citoquinas inducidas (pg/ml)						
		Gro- $\alpha$	MCP-3	MCP-1	IL-8	IL-6	TNF- $\alpha$	
10	CBMC CpG alone (5ug/mL)	CpG-A (2336)	-4	30	165	473	311	2
		CpG-B (10103)	133	99	204	674	289	15
		CpG-C (2395)	96	134	202	908	259	10
15	CBMC HH2 + CpG	HH2+CpG-A	75	<b>164</b>	410	406	<b>353</b>	<b>12</b>
		HH2+CpG-B	149	<b>347</b>	<b>489</b>	433	<b>873</b>	<b>26</b>
		HH2+CpG-C	52	<b>221</b>	<b>504</b>	734	<b>722</b>	<b>21</b>
20	CBMC HH3 + CpG	HH3+CpG-A	50	<b>149</b>	<b>539</b>	427	<b>408</b>	<b>6</b>
		HH3+CpG-B	126	<b>182</b>	<b>583</b>	704	<b>725</b>	<b>14</b>
		HH3+CpG-C	40	159	551	840	<b>697</b>	<b>26</b>
25	CBMC HH18+CpG	HH18+CpG-A	<b>81</b>	89	308	688	<b>469</b>	5
		HH18+CpG-B	171	146	363	998	<b>461</b>	6
		HH18+CpG-C	122	126	371	1248	<b>559</b>	5
30	CBMC HH17+CpG	HH17+CpG-A	17	-8	<b>393</b>	-38	<b>412</b>	-1
		HH17+CpG-B	94	91	339	<b>1804</b>	241	3
		HH17+CpG-C	86	97	<b>385</b>	<b>2012</b>	<b>405</b>	5

**APÉNDICE**

**Aminoácidos no naturales**

**Variantes de triptófano**

2. DL-7-azatriptófano
3.  $\beta$ -(3-benzotienil)-L-alanina
4.  $\beta$ -(3-benzotienil)-D-alanina
5. 5-benciloxi-DL-triptófano
6. 7-benciloxi-DL-triptófano
7. 5-bromo-DL-triptófano
8. 5-fluoro-DL-triptófano
9. 6-fluoro-DL-triptófano
10. 5-hidroxi-L-triptófano
11. 5-hidroxi-DL-triptófano
12. 5-metoxi-DL-triptófano
13.  $\alpha$ -metil-DL-triptófano
14. 1-metil-DL-triptófano
15. 5-metil-DL-triptófano
16. 6-metil-DL-triptófano
17. 7-metil-DL-triptófano
18. ácido D-1,2,3,4-tetrahidronorharman-3-carboxílico
19. ácido DL-6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidronorharman-1-carboxílico
20. 5-Hidroxitriptófano: ácido 2-amino-3-[5-hidroxiindolil]-propiónico
21. L- Neo-Triptófano
22. D-Neo-Triptófano

**Variantes de fenilalanina y tirosina**

24. 4-aminometil-L-fenilalanina
25. 4-aminometil-D-fenilalanina
26. 4-amino-L-fenilalanina
27. 4-amino-D-fenilalanina
28. 3-amino-L-tirosina

29. 4-bromo-L-fenilalanina  
 30. 4-bromo-D-fenilalanina  
 31. 4-bis(2-cloroetil)amino-L-fenilalanina  
 5 32. 2-cloro-L-fenilalanina  
 33. 2-cloro-D-fenilalanina  
 34. 4-cloro-L-fenilalanina  
 35. 4-cloro-D-fenilalanina  
 36. 3-cloro-L-tirosina  
 10 37. 3,4-dicloro-L-fenilalanina  
 38. 3,4-dicloro-D-fenilalanina  
 39. 3,4-difluoro-L-fenilalanina  
 40. 3,4-difluoro-D-fenilalanina  
 41. 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina  
 15 42. 3,5-diyodo-L-tirosina  
 43. 3,5-diyodo-D-tirosina  
 44. 3,4-dimetoxi-L-fenilalanina  
 45. 3,4-dimetoxi-DL-fenilalanina  
 46. O-etil-L-tirosina  
 20 47. O-etil-D-tirosina  
 48. 2-fluoro-L-fenilalanina  
 49. 2-fluoro-D-fenilalanina  
 50. 4-fluoro-L-fenilalanina  
 51. 4-fluoro-D-fenilalanina  
 25 52. 3-fluoro-DL-tirosina  
 53. L-homofenilalanina  
 54. D-homofenilalanina  
 55. 2-hidroxi-3-metil-L-fenilalanina  
 56. 2-hidroxi-3-metil-D-fenilalanina  
 30 57. 2-hidroxi-3-metil-DL-fenilalanina  
 58. 2-hidroxi-4-metil-L-fenilalanina  
 59. 2-hidroxi-4-metil-D-fenilalanina  
 60. 2-hidroxi-4-metil-DL-fenilalanina  
 61. 2-hidroxi-5-metil-L-fenilalanina  
 35 62. 2-hidroxi-5-metil-D-fenilalanina  
 63. 2-hidroxi-5-metil-DL-fenilalanina  
 64.  $\beta$ -hidroxi-DL-fenilalanina (DL-treo-3-fenilserina)  
 65. ácido 7-hidroxi-(S)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico (hidroxi-Tic-OH)  
 66. ácido 7-hidroxi-(R)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico (hidroxi-D-Tic-OH)  
 40 67. 4-yodo-L-fenilalanina  
 68. 4-yodo-D-fenilalanina  
 69. 3-yodo-L-tirosina  
 70.  $\alpha$ -metil-3-metoxi-DL-fenilalanina  
 71.  $\alpha$ -metil-4-metoxi-L-fenilalanina  
 72.  $\alpha$ -metil-4-metoxi-DL-fenilalanina  
 45 73.  $\alpha$ -metil-L-fenilalanina  
 74.  $\alpha$ -metil-D-fenilalanina  
 75.  $\beta$ -metil-DL-fenilalanina  
 76.  $\alpha$ -metil-DL-tirosina  
 77. O-metil-L-tirosina  
 50 78. O-metil-D-tirosina  
 79. 4-nitro-L-fenilalanina  
 80. 4-nitro-D-fenilalanina  
 81. 3-nitro-L-tirosina  
 55 82. ácido (S)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico (L-Tic-OH)  
 83. ácido (R)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico (D-Tic-OH)  
 84. L-tironina  
 85. DL-tironina  
 86. L-tiroxina  
 87. D-tiroxina  
 60 88. 2,4,5-trihidroxi-DL-fenilalanina  
 89. 3,5,3'-triyodo-L-tironina  
 90. DL-m-tirosina  
 91. DL-o-tirosina  
 65 92. 2-(trifluorometil)-L-fenilalanina  
 93. 2-(trifluorometil)-D-fenilalanina

94. 2-ciano-L-fenilalanina  
 95. 2-ciano-D-fenilalanina  
 96. 2-metil-L-fenilalanina  
 97. 2-metil-D-fenilalanina  
 5 98. 3-(trifluorometil)-L-fenilalanina  
 99. 3-(trifluorometil)-D-fenilalanina  
 100. 3-ciano-L-fenilalanina  
 101. 3-ciano-D-fenilalanina  
 102. 3-fluoro-L-fenilalanina  
 10 103. fluoro-D-fenilalanina  
 104. 3-metil-L-fenilalanina  
 105. 3-metil-D-fenilalanina  
 106. 4-benzoil-L-fenilalanina  
 107. 4-benzoil-D-fenilalanina  
 15 108. 4-(trifluorometil)-L-fenilalanina  
 109. 4-(trifluorometil)-D-fenilalanina  
 110. 4-ciano-L-fenilalanina  
 111. 4-ciano-D-fenilalanina  
 112. 4-metil-L-fenilalanina  
 20 113. 4-metil-D-fenilalanina  
 114. 2,4-dicloro-L-fenilalanina  
 115. 2,4-dicloro-D-fenilalanina  
 116. 3,5-diyodo-L-tirosina OSu
- 25 **Variantes de arginina y lisina**
118. ácido L-2-amino-3-guanidinopropiónico  
 119. ácido L-2-amino-3-ureidopropiónico (Albizziin)  
 120. L-citrulina  
 30 121. DL-citrulina  
 122. ácido 2,6-diaminoheptanodioico (mezcla de isómeros)  
 123. N- $\omega$ , $\omega$ -dimetil-L-arginina (simétrica)  
 124. sal de clorhidrato de N- $\epsilon$ , $\epsilon$ -dimetil-L-lisina  
 125.  $\alpha$ -metil-DL-ornitina  
 35 126. N- $\omega$ -nitro-L-arginina  
 127. N- $\omega$ -nitro-D-arginina  
 128. N- $\delta$ -benciloxicarbonil-L-ornitina  
 129. ((N- $\delta$ )-L-ornitina  
 130. ((N- $\delta$ )-D-ornitina  
 40 131. ((N- $\delta$ -1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)etil)-D-ornitina (D-Om-(Dde)-OH)  
 132. L-ornitina (Orn()-OH)  
 133. ((N-d-4-metiltritol)-L-ornitina (Orn(Mtt)-OH)  
 134. ((N-d-4-metiltritol)-D-ornitina (D-Om(Mtt)-OH)
- 45 **Variantes de prolina**
136. sal de clorhidrato de éster metílico de cis-4-amino-L-prolina  
 137. sal de clorhidrato de éster metílico de trans-4-amino-L-prolina  
 138. ácido ((S)-azetidina-2-carboxílico  
 50 139. trans-4-ciano-L-prolina  
 140. éster metílico de cis-4-ciano-L-prolina  
 141. éster metílico de trans-4-ciano-L-prolina  
 142. 3,4-dehidro-L-prolina  
 143. ácido ((R)-5,5-dimetiltiazolidina-4-carboxílico  
 55 144. ácido ((4S,2RS)-2-etiltiazolidina-4-carboxílico  
 145. trans-4-fluoro-L-prolina  
 146. ácido ((2S,3S)-3-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (trans-3-hidroxi-L-prolina)  
 147. ácido ((2S,4S)-(-)-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (cis-4-hidroxi-L-prolina)  
 148. ácido ((2S,4R)-(-)-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (trans-4-hidroxi-L-prolina)  
 60 149. ácido ((2R,4R)-(+)-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (cis-4-hidroxi-D-prolina)  
 150. ácido ((2S,4R)-(-)-4-t-butoxipirrolidin-2-carboxílico (trans-4-t-butoxi-L-prolina)  
 151. ácido ((2S,SRS)-5-metilpirrolidin-2-carboxílico  
 152. ácido ((4S,2RS)-2-metiltiazolidin-4-carboxílico  
 153. ácido ((2S,3R)-3-fenilpirrolidin-2-carboxílico  
 65 154. ácido ((4S,2RS)-2-feniltiazolidin-4-carboxílico

155. ácido ((S)-tiazolidin-2-carboxílico  
 156. ácido ((R)-tiazolidin-2-carboxílico  
 157. ácido ((S)-tiazolidin-4-carboxílico  
 5 158. ácido ((R)-tiazolidin-4-carboxílico (L-tioprolina)  
 159.  $\alpha$ -alil-DL-prolina  
 160.  $\alpha$ -bencil-DL-prolina  
 161.  $\alpha$ -(2-bromobencil)-DL-prolina  
 162.  $\alpha$ -(4-bromobencil)-DL-prolina  
 10 163.  $\alpha$ -(2-clorobencil)-DL-prolina  
 164.  $\alpha$ -(3-clorobencil)-DL-prolina  
 165.  $\alpha$ -(difenilmetil)-DL-prolina  
 166.  $\alpha$ -(4-fluorobencil)-DL-prolina  
 167.  $\alpha$ -metil-DL-prolina  
 168.  $\alpha$ -(4-metilbencil)-DL-prolina  
 15 169.  $\alpha$ -(1-naftilmetil)-DL-prolina  
 170.  $\alpha$ -propil-DL-prolina  
 171. 4-bencil-L-piroglutámico  
 172. éster bencilico de ácido 4-(2-bromobencil)-L-piroglutámico  
 173. éster bencilico de ácido 4-(4-bromobencil)-L-piroglutámico  
 20 174. éster bencilico de ácido 4-(4-metilbencil)-L-piroglutámico

#### Diversos aminoácidos heterocíclicos

176. ácido  $\alpha$ -amino-3-cloro-4,5-dihidro-5-isoxazolacético  
 25 177. ácido 2-amino- $\alpha$ -(metoxiimino)-4-tiazolacético (predominantemente syn)  
 178. ácido 5-aminoorótico  
 179. ácido 2-aminopiridil-3-carboxílico (ácido 2-aminonicotínico)  
 180. ácido 6-aminopiridil-3-carboxílico (ácido 6-aminonicotínico)  
 30 181. ácido 2-aminotiazol-4-acético  
 182. ácido ((S)-azetidín-2-carboxílico  
 183. ácido azetidín-3-carboxílico  
 184. 4-carboximetilpiperazina  
 185. 4-carboximetilpiperazina  
 35 186. 2-carboxipiperazina  
 187. 3-carboxipiperidina  
 188. ácido indolín-2-carboxílico  
 189. L-mimosina  
 190. ácido 4-fenilpiperidín-4-carboxílico  
 40 191. ácido ((S)-(-)-piperidín-2-carboxílico (ácido L-(-)-pipecólico)  
 192. ácido ((R)-(+)-piperidín-2-carboxílico (ácido D-(+)-pipecólico)  
 193. ácido ((RS)-piperidín-2-carboxílico (ácido DL- pipecólico)  
 194. ácido piperidín-4-carboxílico (ácido isopipecólico)

#### Análogos de alanina, glicina, valina y leucina

- 45 196. 3-(2-furil)-D-Ala-OH  
 197. 3-ciclopentil-DL-Ala-OH  
 198. 3-(4-quinolil)-DL-Ala-OH  
 50 199. diclorhidrato de 3-(4-quinolil)-DL-Ala-OH dihidratado  
 200. 3-(2-quinolil)-DL-Ala-OH  
 201. 3-(2-quinoxalil)-DL-Ala-OH  
 202.  $\alpha$ -alil-L-alanina  
 203. L-alilglicina  
 204. sal de L-alilglicindiciclohexilamonio  
 55 205. D-alilglicina  
 206. sal de D-alilglicindiciclohexilamonio  
 207. ácido L- $\alpha$ -aminobutírico (Abu-OH)  
 208. ácido D- $\alpha$ -aminobutírico (D-Abu-OH)  
 209. ácido DL- $\beta$ -aminobutírico (DL- $\beta$ -Abu-OH)  
 60 210. ácido  $\gamma$ -aminobutírico ( $\gamma$ -Abu-OH)  
 211. ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico (Aib-OH)  
 212. ácido DL- $\beta$ -aminoisobutírico (DL- $\beta$ -Aib-OH)  
 213. Di-N- $\alpha$ -aminometil-L-alanina  
 214. ácido 2-amino-4,4,4-trifluorobutírico

215. ácido 3-amino-4,4,4-trifluorobutírico  
 216. β-(3-benzotienil)-L-alanina  
 217. β-(3-benzotienil)-D-alanina  
 218. t-butil-L-alanina  
 5 219. t-butil-D-alanina  
 220. L-t-butilglicina  
 221. D-t-butilglicina  
 222. β-ciano-L-alanina  
 223. β-ciclohexil-L-alanina (Cha-OH)  
 10 224. β-ciclohexil-D-alanina (D-Cha-OH)  
 225. L-ciclohexilglicina (Chg-OH)  
 226. D-ciclohexilglicina (D-Chg-OH)  
 227. β-ciclopentil-DL-alanina  
 228. β-ciclopenten-1-il-DL-alanina  
 15 229. β-ciclopropil-L-alanina  
 230. ciclopropil-DL-fenilglicina  
 231. DL-dehidroarmentomicina  
 232. 4,5-dehidro-L-leucina  
 233. ácido L-α,γ-diaminobutírico (Dab-OH)  
 20 234. ácido D-α,γ-diaminobutírico (D-Dab-OH)  
 235. ácido Di- L-α,γ-diaminobutírico (DabQ-OH)  
 236. ácido Di-D-α,γ-diaminobutírico (D-Dab()-OH)  
 237. ácido ((N-γ-aliloxicarbonil)-L-α,γ-diaminobutírico (Dab(Aloc)-OH)  
 238. ácido ((N-γ)-L-α,γ-diaminobutírico (Dab()-OH)  
 25 239. ácido ((N-γ-1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)etil)-L-α,γ-diaminobutírico (Dab(Dde)-OH)  
 240. ácido ((N-γ-4-metiltritol)-L-α,γ-diaminobutírico (Dab(Mtt)-OH)  
 241. ácido ((N-γ)-D-α,γ-diaminobutírico (D-Dab()-OH)  
 242. ácido ((N-γ-1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)etil)-D-α,γ-diaminobutírico (D-Dab(Dde)-OH)  
 243. ácido ((N-γ-metiltritol)-D-α,γ-diaminobutírico (D-Dab(Mtt)-OH)  
 30 244. ácido L-α,β-diaminopropiónico (Dap-OH)  
 245. ácido D-α,β-diaminopropiónico (D-Dap-OH)  
 246. ácido Di-L-α,β-diaminopropiónico (Dap()-OH)  
 247. ácido Di-D-α,β-diaminopropiónico (D-Dap()-OH)  
 248. ácido ((N-β-aliloxicarbonil)-L-α,β-diaminopropiónico (Dap(Aloc)-OH)  
 35 249. ácido ((N-β)-L-α,β-diaminopropiónico (Dap()-OH)  
 250. β-(1-naftil)-D-alanina (D-1-Nal-OH)  
 251. β-(2-naftil)-L-alanina (2-Nal-OH)  
 252. β-(2-naftil)-D-alanina (D-2-Nal-OH)  
 253. L-fenilglicina (Phg-OH)  
 40 254. D-fenilglicina (D-Phg-OH)  
 255. L-propargilglicina  
 256. sal de L-propargilglicindiciclohexilamonio  
 257. D-propargilglicina  
 258. sal de D-propargilglicindiciclohexilamonio  
 45 259. β-(2-piridil)-L-alanina (L-2-piridilalanina)  
 260. β-(2-piridil)-D-alanina (D-2-piridilalanina)  
 261. β-(3-piridil)-L-alanina (L-3-piridilalanina)  
 262. β-(3-piridil)-D-alanina (D-3-piridilalanina)  
 263. β-(4-piridil)-L-alanina (L-4-piridilalanina)  
 50 264. β-(4-piridil)-D-alanina (D-4-piridilalanina)  
 265. β-(2-tienil)-L-alanina (Thi-OH)  
 266. β-(2-tienil)-D-alanina (D-Thi-OH)  
 267. L-(2-tienil)glicina  
 268. D-(2-tienil)glicina  
 55 269. L-(3-tienil)glicina  
 270. D-(3-tienil)glicina  
 271. 5,5,5-trifluoro-DL-leucina  
 272. 4,4,4-trifluoro-DL-valina  
 273. ácido L-2-amino-3-(dimetilamino)propiónico (aza-L-leucina)  
 60 274. ácido DL-2-amino-3-(dimetilamino)propiónico (aza-DL-leucina)  
 275. ácido ((N-β-1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)etil)-L-α,β-diaminopropiónico (Dap(Dde)-OH)  
 276. ácido ((N-β-(2,4-dinitrofenil))-L-α,β-diaminopropiónico (Dap(Dnp)-OH)  
 277. ácido ((N-β-4-metiltritol)-L-α,β-diaminopropiónico (Dap(Mtt)-OH)  
 278. ácido ((N-β)-L-α,β-diaminopropiónico (Dap()-OH)

279. ácido ((N-β)-D-α,β-diaminopropiónico (D-Dap)-OH)  
 280. ácido ((N-β-1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)etil)-D-α,β-diaminopropiónico (D-Dap(Dde)-OH)  
 281. 2,5-dihidro-D-fenilglicina  
 282. 2,4-dinitro-DL-fenilglicina  
 5 283. 2-fluoro-DL-fenilglicina  
 284. 4-fluoro-L-fenilglicina  
 285. 4-fluoro-D-fenilglicina  
 286. 3-fluoro-DL-valina  
 287. 4-hidroxi-D-fenilglicina  
 10 288. α-metil-DL-leucina  
 289. β-(1-naftil)-L-alanina (1-Nal-OH)  
 290. β-(1-naftil)-D-alanina (D-1-Nal-OH)

### Análogos de ácido benzoico

- 15 292. ácido 2-amino-4-fluorobenzoico  
 293. ácido 2-amino-5-fluorobenzoico  
 294. ácido 2-amino-6-fluorobenzoico  
 295. ácido 2-amino-5-yodobenzoico  
 20 296. ácido 2-amino-3-metoxibenzoico  
 297. ácido 2-amino-5-metoxibenzoico  
 298. ácido 3-amino-4-metoxibenzoico  
 299. ácido 4-amino-3-metoxibenzoico  
 300. ácido 2-amino-3-metilbenzoico  
 25 301. ácido 2-amino-5-metilbenzoico  
 302. ácido 2-amino-6-metilbenzoico  
 303. ácido 3-amino-2-metilbenzoico  
 304. ácido 3-amino-4-metilbenzoico  
 305. ácido 4-amino-3-metilbenzoico  
 30 306. ácido 3-aminometilbenzoico (Mamb-OH)  
 307. ácido 4-aminometilbenzoico (Pamb-OH)  
 308. ácido 2-amino-3,4,5-trimetoxibenzoico  
 309. ácido Di-3,4-diaminobenzoico  
 310. ácido Di-3,5-diaminobenzoico  
 35 311. ácido 4-metilaminobenzoico  
 312. ácido 5-acetamido-2-aminobenzoico (ácido 5-acetamidoantranílico)  
 313. ácido 2-aminobenceno-1,4-dicarboxílico  
 314. ácido 3-aminobenceno-1,2-dicarboxílico  
 315. ácido 2-aminobenzoico (2-Abz-OH)  
 40 316. ácido 3-aminobenzoico (3-Abz-OH)  
 317. ácido 4-aminobenzoico (4-Abz-OH)  
 318. ácido 2-(2-aminobenzoil)benzoico  
 319. ácido 2-amino-5-bromobenzoico  
 45 320. ácido 2-amino-4-clorobenzoico  
 321. ácido 2-amino-5-clorobenzoico  
 322. ácido 2-amino-6-clorobenzoico  
 323. ácido 3-amino-4-clorobenzoico  
 324. ácido 4-amino-2-clorobenzoico  
 325. ácido 5-amino-2-clorobenzoico  
 50 326. ácido 2-amino-4,5-dimetoxibenzoico  
 327. ácido 2-amino-3,5-dimetilbenzoico  
 328. ácido 2-amino-4-fluorobenzoico

### Diversos aminoácidos aromáticos

- 55 330. ácido di-2-amino-3-(2-aminobenzoil)propiónico  
 331. ácido 4-aminocinámico (predominantemente trans)  
 332. ácido 4-aminohipúrico  
 333. ácido 3-amino-2-naftoico  
 60 334. ácido 4-aminooxanílico  
 335. ácido ((3-aminofenil)acético)  
 336. ácido ((4-aminofenil)acético)  
 337. ácido 4-(4-aminofenil)butanoico  
 338. 3-amino-3-fenilpropiónico ácido  
 65 339. ácido ((4-aminofeniltio)acético)  
 340. ácido ((2R,3S)-2-amino-3-(feniltio)butanoico

341. Análogos de cisteína y metionina  
 342. S-acetamidometil-L-penicilamina  
 343. S-acetamidometil-D-penicilamina  
 5 344. S-(2-aminoetil)-L-cisteína  
 345. S-bencil-L-cisteína  
 346. S-bencil-D-cisteína  
 347. S-bencil-DL-homocisteína  
 348. L-butionina  
 349. L-butioninsulfoximina  
 10 350. DL-butioninsulfoximina  
 351. S-n-butil-L-cisteína  
 352. S-t-butil-L-cisteína  
 353. S-t-butil-D-cisteína  
 354. S-carbamoil-L-cisteína  
 15 355. S-carboxietil-L-cisteína  
 356. S-carboximetil-L-cisteína  
 357. ácido L-cisteico  
 358. S-difenilmetil-L-cisteína  
 359. L-etionina (ácido 2-amino-4-(etil(tio)butírico)  
 20 360. D-etionina (ácido D-2-amino-4-(etil(tio)butírico)  
 361. S-etil-L-cisteína  
 362. S-tritil-L-homocisteína  
 363. Di-L-homocistina  
 364. cloruro de DL-metioninmetilsulfonio  
 25 365. S-4-metoxibencil-L-penicilamina  
 366. S-4-metoxibencil-L-penicilamina (Pen(4-MeOBzl)-OH)  
 367. sal de S-4-metilbencil-L-penicilamidiciclohexilamonio (Pen(4-MeBzl)-OH.DCHA)  
 368. S-metil-L-cisteína  
 369.  $\alpha$ -metil-DL-metionina  
 30 370. S-(2-(4-piridil)etil)-L-cisteína  
 371. S-(2-(4-piridil)etil)-DL-penicilamina  
 372. Di-seleno-L-cistina  
 373. L-selenometionina  
 374. DL-selenometionina  
 35 375. S-tritil-L-penicilamina  
 376. S-tritil-D-penicilamina  
 377. Di-L-cistationa  
 378. Di-DL-cistationina
- 40 **Análogos de serina, treonina y estatina**
380. ácido 2-amino-3-metoxipropiónico  
 381. L- $\alpha$ -metilserina  
 382. D- $\alpha$ -metilserina  
 45 383. ácido ((S)-2-amino-4-tritiloxibutanoico (Hse(Trt)-OH)  
 384. ácido ((RS)-2-amino-4-tritiloxibutanoico (DL-Hse(Trt)-OH)  
 385. ácido ((S)-2-amino-3-benciloxipropiónico  
 386. ácido ((R)-2-amino-3-benciloxipropiónico  
 387. ácido ((2S,3S)-2-amino-3-etoxibutanoico  
 50 388. ácido 2-amino-3-etoxibutanoico  
 389. ácido 2-amino-3-etoxipropiónico  
 390. ácido 4-amino-3-hidroxibutanoico  
 391. ácido ((R)-2-amino-3-hidroxi-3-metilbutanoico  
 392. ácido ((S)-2-amino-3-hidroxi-3-metilbutanoico  
 55 393. ácido ((RS)-2-amino-3-hidroxi-3-metilbutanoico  
 394. ácido ((3S,4S)-4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico (Sta-OH)  
 395. ácido ((2R,3R)-3-amino-2-hidroxi-5-metilhexanoico  
 396. ácido ((2R,3S)-3-amino-2-hidroxi-5-metilhexanoico  
 397. ácido ((2S,3R)-3-amino-2-hidroxi-5-metilhexanoico  
 60 398. ácido ((2S,3S)-3-amino-2-hidroxi-5-metilhexanoico  
 399. ácido ((2S,3R)-2-amino-3-hidroxi-4-metilpentanoico  
 400. ácido ((2R,3S)-2-amino-3-hidroxi-4-metilpentanoico  
 401. ácido ((2S,3RS)-2-amino-3-hidroxi-4-metilpentanoico  
 402. ácido 2-amino-3-hidroxipentanoico  
 65 403. ácido ((2S,3R)-3-amino-2-hidroxi-4-fenilbutanoico  
 404. ácido ((2R,3R)-3-amino-2-hidroxi-4-fenilbutanoico

405. ácido ((2S,3S)-2-amino-3-metoxibutanoico  
 406. ácido 2-amino-3-metoxibutanoico  
 407. ácido ((S)-2-amino-3-metoxipropiónico

## 5 Diversos aminoácidos alifáticos

409. ácido  $\alpha$ -amino-1-adamantanopropiónico  
 410. ácido 2-aminobiciclo[2.2.1]heptano-2-carboxílico (mezcla de isómeros)  
 411. ácido 3-endo-aminobiciclo[2.2.1]heptano-2-endo-carboxílico  
 10 412. ácido 3-endo-aminobiciclo[2.2.1]heptano-2-endo-carboxílico  
 413. ácido 3-endo-aminobiciclo[2.2.1]hept-5-eno-2-endo-carboxílico  
 414. ácido 1-aminociclobutano-1-carboxílico  
 415. ácido 5-amino-1,3-ciclohexadieno-1-carboxílico  
 416. ácido 1-aminociclohexano-1-carboxílico  
 15 417. ácido (( $\pm$ )-cis-2-aminociclohexano-1-carboxílico  
 418. ácido (( $\pm$ )-trans-2-aminociclohexano-1-carboxílico  
 419. ácido trans-4-aminociclohexano-1-carboxílico  
 420. ácido (( $\pm$ )-cis-3-aminociclohexano-1-carboxílico  
 421. ácido cis-4-aminociclohexano-1-carboxílico  
 20 422. ácido (( $\pm$ )-cis-2-aminociclohex-4-eno-1-carboxílico  
 423. ácido (( $\pm$ )-trans-2-aminociclohex-4-eno-1-carboxílico  
 424. ácido cis-4-aminociclohexano-1-acético  
 425. ácido 1-aminociclopentano-1-carboxílico  
 426. ácido (( $\pm$ )-cis-2-aminociclopentano-1-carboxílico  
 25 427. ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico  
 428. ácido 2-aminoheptanoico  
 429. ácido 7-aminoheptanoico  
 430. ácido 6-aminoheptanoico (ácido 6-aminocaproico)  
 431. ácido 5-aminolevulínico  
 30 432. ácido trans-4-(aminometil)ciclohexano-1-carboxílico  
 433. ácido 2-aminooctanoico  
 434. ácido 8-aminooctanoico (ácido 8-aminocaprílico)  
 435. ácido 3-(aminooxi)acético  
 436. ácido 5-aminopentanoico  
 35 437. ácido 11-aminoundecanoico

## $\beta$ -Aminoácidos

439.  $\beta$ -alanina ( $\beta$ -Ala-OH)  
 40 440. L- $\beta$ -homoalanina ( $\beta$ -homoAla-OH)  
 441. ((S)-N- $\omega$ -2,2,4,6,7-pentametilidihidrobenzofuran-5-sulfonil-L- $\beta$ -homoarginina ( $\beta$ -homoArg(Pbf)-OH)  
 442. N- $\omega$ -tosil-L- $\beta$ -homoarginina ( $\beta$ -homoArg(Tos)-OH)  
 443.  $\gamma$ -tritol-L- $\beta$ -homoasparagina ( $\beta$ -homoAsn(Trt)-OH)  
 444. éster  $\gamma$ -t-butílico de ácido L- $\beta$ -homoaspártico ( $\beta$ -homoAsp(OtBu)-OH)  
 45 445. éster  $\gamma$ -bencilico de ácido L- $\beta$ -homoaspártico ( $\beta$ -homoAsp(OBzl)-OH)  
 446. éster  $\delta$ -t-butílico de ácido L- $\beta$ -homoglutámico ( $\beta$ -homoGlu(OtBu)-OH)  
 447. éster  $\delta$ -bencilico de ácido L- $\beta$ -homoglutámico ( $\beta$ -homoGlu(OBzl)-OH)  
 448. N- $\delta$ -tritol-L- $\beta$ -homoglutamina ( $\beta$ -homoGln(Trt)-OH)  
 449. O-t-butil-L- $\beta$ -homohidroxiprolina ( $\beta$ -homoHyp(tBu)-OH)  
 50 450. L- $\beta$ -homoisoleucina ( $\beta$ -homolle-OH)  
 451. DL- $\beta$ -leucina (DL- $\beta$ -Leu-OH)  
 452. L- $\beta$ -homoleucina ( $\beta$ -homoLeu-OH)  
 453. L-N- $\omega$ - $\beta$ -homolisina ( $\beta$ -homoLys(-)-OH)  
 454. L-N- $\omega$ -2-benciloxycarbonil- $\beta$ -homolisina ( $\beta$ -homoLys(Z)-OH)  
 55 455. L- $\beta$ -homometionina ( $\beta$ -homoMet-OH)  
 456. L- $\beta$ -fenilalanina ( $\beta$ -Phe-OH)  
 457. D- $\beta$ -fenilalanina (D- $\beta$ -Phe-OH)  
 458. L- $\beta$ -homofenilalanina ( $\beta$ -homoPhe-OH)  
 459. L- $\beta$ -homoprolina ( $\beta$ -homoPro-OH)  
 60 460. O-t-butil-L- $\beta$ -homoserina ( $\beta$ -homoSer(tBu)-OH)  
 461. O-bencil-L- $\beta$ -homoserina ( $\beta$ -homoSer(Bzl)-OH)  
 462. O-bencil-L- $\beta$ -homotreonina ( $\beta$ -homoThr(Bzl)-OH)  
 463. L- $\beta$ -homotriptófano ( $\beta$ -homoTrp-OH)  
 464. O-t-butil-L- $\beta$ -homotirosina ( $\beta$ -homoTyr(tBu)-OH)  
 65 465. L- $\beta$ -homovalina ( $\beta$ -homoVal-OH)

	466. ácido ((R)-3-amino-4-(3-benzotienil)butírico
	467. ácido ((S)-3-amino-4-(3-benzotienil)butírico
	468. ácido 3-aminobiciclo[2.2.2]octano-2-carboxílico (mezcla de isómeros)
5	469. ácido ((R)-3-amino-4-(4-bromofenil)butírico
	470. ácido ((S)-3-amino-4-(4-bromofenil)butírico
	471. ácido ((R)-3-amino-4-(2-clorofenil)butírico
	472. ácido ((S)-3-amino-4-(2-clorofenil)butírico
	473. ácido ((R)-3-amino-4-(3-clorofenil)butírico
10	474. ácido ((S)-3-amino-4-(3-clorofenil)butírico
	475. ácido ((R)-3-amino-4-(4-clorofenil)butírico
	476. ácido ((S)-3-amino-4-(4-clorofenil)butírico
	477. ácido 3-amino-3-(4-clorofenil)propiónico
	478. ácido ((R)-3-amino-4-(2-cianofenil)butírico
	479. ácido ((S)-3-amino-4-(2-cianofenil)butírico
15	480. ácido ((R)-3-amino-4-(3-cianofenil)butírico
	481. ácido ((S)-3-amino-4-(3-cianofenil)butírico
	482. ácido ((R)-3-amino-4-(4-cianofenil)butírico
	483. ácido ((S)-3-amino-4-(4-cianofenil)butírico
20	484. ácido ((R)-3-amino-4-(2,4-diclorofenil)butírico
	485. ácido ((S)-3-amino-4-(2,4-diclorofenil)butírico
	486. ácido ((R)-3-amino-4-(3,4-diclorofenil)butírico
	487. ácido ((S)-3-amino-4-(3,4-diclorofenil)butírico
	488. ácido ((R)-3-amino-4-(3,4-difluorofenil)butírico
25	489. ácido ((S)-3-amino-4-(3,4-difluorofenil)butírico
	490. ácido ((R)-3-amino-4-(2-fluorofenil)butírico
	491. ácido ((S)-3-amino-4-(2-fluorofenil)butírico
	492. ácido ((R)-3-amino-4-(3-fluorofenil)butírico
	493. ácido ((S)-3-amino-4-(3-fluorofenil)butírico
30	494. ácido ((R)-3-amino-4-(4-fluorofenil)butírico
	495. ácido ((S)-3-amino-4-(4-fluorofenil)butírico
	496. ácido ((R)-3-amino-4-(2-furil)butírico
	497. ácido ((S)-3-amino-4-(2-furil)butírico
	498. ácido ((R)-3-amino-5-hexenoico
35	499. ácido ((S)-3-amino-5-hexenoico
	500. ácido ((R)-3-amino-5-hexenoico
	501. ácido ((S)-3-amino-5-hexenoico
	502. ácido ((R)-3-amino-4-(4-yodofenil)butírico
	503. ácido ((S)-3-amino-4-(4-yodofenil)butírico
40	504. ácido ((R)-3-amino-4-(2-metilfenil)butírico
	505. ácido ((S)-3-amino-4-(2-metilfenil)butírico
	506. ácido ((R)-3-amino-4-(3-metilfenil)butírico
	507. ácido ((S)-3-amino-4-(3-metilfenil)butírico
	508. ácido ((R)-3-amino-4-(4-metilfenil)butírico
45	509. ácido ((S)-3-amino-4-(4-metilfenil)butírico
	510. ácido ((R)-3-amino-4-(1-naftil)butírico
	511. ácido ((S)-3-amino-4-(1-naftil)butírico
	512. ácido ((R)-3-amino-4-(2-naftil)butírico
	513. ácido ((S)-3-amino-4-(2-naftil)butírico
50	514. ácido ((R)-3-amino-4-(4-nitrofenil)butírico
	515. ácido ((S)-3-amino-4-(4-nitrofenil)butírico
	516. ácido ((R)-3-amino-4-pentafluorofenilbutírico
	517. ácido ((S)-3-amino-4-pentafluorofenilbutírico
	518. ácido ((R)-3-amino-6-fenil-5-hexenoico
55	519. ácido ((S)-3-amino-6-fenil-5-hexenoico
	520. ácido ((R)-3-amino-5-fenilpentanoico
	521. ácido ((S)-3-amino-5-fenilpentanoico
	522. ácido ((R)-3-amino-4-(3-piridil)butírico
	523. ácido ((S)-3-amino-4-(3-piridil)butírico
60	524. ácido ((R)-3-amino-4-(4-piridil)butírico
	525. ácido ((S)-3-amino-4-(4-piridil)butírico
	526. ácido ((R)-3-amino-4-(2-tienil)butírico
	527. ácido ((S)-3-amino-4-(2-tienil)butírico
	528. ácido ((R)-3-amino-4-(3-tienil)butírico
	529. ácido ((S)-3-amino-4-(3-tienil)butírico
65	530. ácido 3-amino-3-(2-tienil)propiónico
	531. ácido 3-amino-4,4,4-trifluorobutírico

532. ácido ((R)-3-amino-4-(2-trifluorometilfenil)butírico  
 533. ácido ((S)-3-amino-4-(2-trifluorometilfenil)butírico  
 534. ácido ((R)-3-amino-4-(3-trifluorometilfenil)butírico  
 535. ácido ((S)-3-amino-4-(3-trifluorometilfenil)butírico  
 536. ácido ((R)-3-amino-4-(4-trifluorometilfenil)butírico  
 537. ácido ((S)-3-amino-4-(4-trifluorometilfenil)butírico  
 538. ácido ((R)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-acético  
 539. ácido ((S)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-acético  
 540. ácido 1,2,5,6-tetrahidropiridin-3-carboxílico (guvacina)  
 541. HCl de H-L-β-Homopro-OH clorhidrato de ácido (S)-2-(2-pirrolidinil)acético  
 542. H-DL-β-Leu-OH ácido (1)-3-Amino-4-metilpentanoico  
 543. H-DL-β-Homoleu-OH ácido (1)-3-Amino-5-metilcaproico  
 544. H-DL-β-Phe-OH ácido (1)-3-Amino-3-fenilpropiónico  
 545. L-Homophe-OEt HCl  
 546. D-Homophe-OEt HCl  
 547. N-Bencil-L-Homophe-OEt HCl  
 548. N-Bencil-D-Homophe-OEt HCl  
 549. ácido ((1)-3-(amino)-4-(4-bifenilil)butírico  
 550. clorhidrato de ácido ((1)-3-amino-4-(4-bifenilil)butírico  
 551. clorhidrato de (+)-etil (S)-2-amino-4-ciclohexilbutirato  
 552. clorhidrato de (-)-etil (R)-2-amino-4-ciclohexilbutirato

**N-α-Metil-aminoácidos**

554. N-α-metil-L-alanina (MeAla-OH)  
 555. N-α-metil-D-alanina (D-MeAla-OH)  
 556. N-α-metil-L-aloisoleucina (MeAllole-OH)  
 557. N-α-metil-D-aloisoleucina (D-MeAllole-OH)  
 558. N-α-metil-N-ω-tosil-L-arginina (MeArg(Tos)-OH)  
 559. N-α-metil-N-ω-2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonil-D-arginina (D-MeArg(Pbf)-OH)  
 560. N-α-metil-N-ω-tosil-D-arginina (D-MeArg(Tos)-OH)  
 561. ácido N-α-metil-L-aspártico  
 562. éster β-t-butílico de ácido N-α-metil-L-aspártico (MeAsp(OtBu)-OH)  
 563. ácido N-α-metil-D-aspártico  
 564. éster β-t-butílico de ácido N-α-metil-D-aspártico (D-MeAsp(OtBu)-OH)  
 565. N-α-metil-4-cloro-L-fenilalanina (Me(4-Cl-Phe)-OH)  
 566. N-α-metil-4-cloro-D-fenilalanina (D-Me(4-Cl-Phe)-OH)  
 567. éster γ-t-butílico de ácido N-α-metil-L-glutámico (MeGlu(OtBu)-OH)  
 568. éster γ-t-butílico de ácido N-α-metil-D-glutámico (D-MeGlu(OtBu)-OH)  
 569. N-α-metilglicina (sarcosina; Sar-OH)  
 570. N-α-metil-N-im-tritil-L-histidina (MeHis(Trt)-OH)  
 571. N-α-metil-N-im-tritil-D-histidina (D-MeHis(Trt)-OH)  
 572. N-α-metil-trans-L-4-hidroxiprolina  
 573. N-α-metil-L-isoleucina (Melle-OH)  
 574. N-α-metil-L-leucina (MeLeu-OH)  
 575. N-α-metil-D-leucina (D-MeLeu-OH)  
 576. N-α-metil-N-ε-t-L-lisina (MeLys(-)-OH)  
 577. N-α-metil-N-ε-2-clorobenciloxycarbonil-L-lisina (MeLys(2-Cl-Z)-OH)  
 578. N-α-metil-4-nitro-L-fenilalanina (MePhe(4-NO<sub>2</sub>)-OH)  
 579. N-α-metil-L-norleucina (MeNle-OH)  
 580. N-α-metil-L-norvalina (MeNva-OH)  
 581. N-α-metil-L-fenilalanina (MePhe-OH)  
 582. N-α-metil-D-fenilalanina (D-MePhe-OH)  
 583. N-α-metil-L-fenilglicina (MePhg-OH)  
 584. N-α-metil-L-prolina  
 585. N-α-metil-O-bencil-L-serina (MeSer(Bzl)-OH)  
 586. sal de N-α-metil-O-bencil-L-serindiciclohexilamonio (MeSer(Bzl)-OH.DCHA)  
 587. N-α-metil-O-t-butil-L-serina (MeSer(tBu)-OH)  
 588. N-α-metil-O-t-butil-L-treonina (MeThr(tBu)-OH)  
 589. N-α-metil-L-triptófano (MeTrp-OH)  
 590. N-α-metil-DL-triptófano (DL-MeTrp-OH)  
 591. N-α-metil-O-bencil-L-tirosina (MeTyr(Bzl)-OH)  
 592. N-α-metil-O-t-butil-L-tirosina (MeTyr(tBu)-OH)

593. N- $\alpha$ -metil-O-metil-L-tirosina (MeTyr(Me)-OH)  
 594. N- $\alpha$ -metil-O-bencil-D-tirosina (D-MeTyr(Bzl)-OH)  
 595. N- $\alpha$ -metil-L-valina (MeVal-OH)  
 596. N- $\alpha$ -metil-D-valina (D-MeVal-OH)

5

**Aminoalcoholes**

598. L-alaninol  
 599. D-alaninol  
 10 600. alcohol 2-aminobencílico  
 601. alcohol 3-aminobencílico  
 602. alcohol 4-aminobencílico  
 603. ((R)-(-)-2-aminobutanol  
 604. ((S)-(+)-2-aminobutanol  
 15 605. 4-aminobutanol  
 606. 4-amino-2-butanol  
 607. alcohol 2-amino-5-clorobencílico  
 608. (( $\pm$ )-cis-2-aminociclohexanol  
 609. (( $\pm$ )-trans-2-aminociclohexanol  
 20 610. trans-4-aminociclohexanol  
 611. ((1R,2S)-(-)-2-amino-1,2-difeniletanol  
 612. ((1S,2R)-(+)-2-amino-1,2-difeniletanol  
 613. 2-(2-aminoetoxi)etanol  
 614. alcohol  $\alpha$ -(1-aminoetil)-4-hidroxibencílico  
 25 615. 2-amino-2-etil-1,3-propanodiol  
 616. 6-aminohexanol  
 617. 1-amino-4-(2-hidroxietil)piperazina  
 618. ((1R,2S)-(+)-cis-1-amino-2-indanol  
 619. ((1S,2R)-(-)-cis-1-amino-2-indanol  
 30 620. ((1S,2R)-(+)-2-amino-3-metoxifenilpropanol  
 621. (( $\pm$ )-cis-2-aminometilcicloheptanol  
 622. (( $\pm$ )-1-aminometilciclohexanol  
 623. (( $\pm$ )-cis-2-aminometilciclohexanol  
 624. (( $\pm$ )-trans-2-aminometilciclohexanol  
 35 625. (( $\pm$ )-cis-2-aminometilciclooctanol  
 626. 6-amino-2-metil-2-heptanol (heptaminol)  
 627. alcohol  $\alpha$ -aminometil-3-hidroxibencílico (norfenilefrina)  
 628. alcohol  $\alpha$ -aminometil-4-hidroxibencílico (octopamina)  
 629. alcohol  $\alpha$ -aminometil-4-hidroxi-3-metoxibencílico (normetaefrina)  
 40 630. 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol  
 631. 2-amino-2-metilpropanol ( $\beta$ -aminoisobutanol)  
 632. ((1R,2R)-(-)-2-amino-1-(4-nitrofenil)-1,3-propanodiol  
 633. ((1S,2S)-(+)-2-amino-1-(4-nitrofenil)-1,3-propanodiol  
 634. 5-aminopentanol  
 45 635. 1-amino-3-fenoxi-2-propanol  
 636. ((R)-(-)-2-amino-1-feniletanol  
 637. ((S)-(+)-2-amino-1-feniletanol  
 638. 2-(4-aminofenil)etanol  
 639. ((1R,2R)-(-)-2-amino-1-fenil-1,3-propanodiol  
 50 640. ((1S,2S)-(+)-2-amino-1-fenil-1,3-propanodiol  
 641. 3-amino-3-fenilpropanol  
 642. ((RS)-3-amino-1,2-propanodiol  
 643. ((S)-(+)-3-amino-1,2-propanodiol  
 644. ((R)-(-)-1-amino-2-propanol  
 55 645. ((S)-(+)-1-amino-2-propanol  
 646. 3-amino-1-propanol  
 647. N- $\omega$ -2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonil-L-argininol (Arg(Pbf)-ol)  
 648. N- $\omega$ -tosil-L-argininol  
 649. N- $\beta$ -tritol-L-asparaginol (Asn(Trt)-ol)  
 60 650. L-asparaginol (Asn-ol)  
 651. N- $\beta$ -tritol-D-asparaginol (D-Asn(Trt)-ol)  
 652. D-asparaginol (D-Asn-ol)  
 653. éster  $\beta$ -t-butílico de L-aspartimol (Asp(OtBu)-ol)  
 654. éster  $\beta$ -t-butílico de D-aspartimol (D-Asp(OtBu)-ol)  
 65 655. DL-4-clorofenilalaninol

656.  $\beta$ -ciclohexil-L-alaninol  
657. S-t-butil-L-cisteinol (Cys(tBu)-ol)  
658. S-t-butil-D-cisteinol (D-Cys(tBu)-ol)  
5 659. 1,1-difenil-L-alaninol  
660. L-glutaminol (Gln-ol)  
661. N- $\gamma$ -tritol-L-glutaminol (Gln(Trt)-ol)  
662. éster  $\gamma$ -t-butílico de L-glutamol (Glu(OtBu)-ol)  
663. éster  $\gamma$ -bencílico de L-glutamol (Glu(OBzl)-ol)  
10 664. éster  $\gamma$ -t-butílico de D-glutamol (D-Glu(OtBu)-ol)  
665. éster  $\gamma$ -bencílico de D-glutamol (D-Glu(OtBu)-ol)  
666. etanolamina (Gly-ol)  
667. N-im-t- L-histidinol  
668. N-im-tritol-L-histidinol  
669. N-im-bencil-L-histidinol  
15 670. 1-hidroxietiletoxipiperazina  
671. N-(2-hidroxietil)piperazina  
672. N-(2-hidroxietil)-1,3-propanodiamina  
673. 3-endo-hidroximetilbiciclo[2.2.1]hept-5-enil-2-endo-amina  
674. (( $\pm$ )-cis-2-hidroximetil-4-ciclohexenil-1-amina  
20 675. (( $\pm$ )-cis-2-hidroximetil-1-ciclohexilamina  
676. (( $\pm$ )-trans-2-hidroximetil-1-ciclohexilamina  
677. (( $\pm$ )-cis-2-hidroximetil-trans-4-fenil-1-ciclohexilamina  
678. 3-hidroxipiperidina  
679. 4-hidroxipiperidina  
25 680. L-isoleucinol (Ile-ol)  
681. L-leucinol (Ile-ol)  
682. D-leucinol (D-Ile-ol)  
683. L-terc-leucinol ((S)-(-)-2-amino-3,3-dimetil-1-butanol)  
684. N- $\epsilon$ -t-L-lisinol (Lys(-)-ol)  
30 685. N- $\epsilon$ -benciloxycarbonil-L-lisinol (Lys(Z)-ol)  
686. N- $\epsilon$ -2-clorobenciloxycarbonil-L-lisinol (Lys(2-Cl-Z)-ol)  
687. N- $\epsilon$ -t-D-lisinol (D-Lys(-)-ol)  
688. N- $\epsilon$ -benciloxycarbonil-D-lisinol (D-Lys(Z)-ol)  
689. N- $\epsilon$ -2-clorobenciloxycarbonil-D-lisinol (D-Lys(2-Cl-Z)-ol)  
35 690. L-metioninol (Met-ol)  
691. D-metioninol (D-Met-ol)  
692. ((1R,2S)-(-)-norefedrina  
693. ((1S,2R)-(+)-norefedrina  
694. L-norleucinol  
40 695. L-norvalinol  
696. L-fenilalaninol  
697. D-fenilalaninol (D-Phe-ol)  
698. L-fenilglicinol (Phg-ol)  
699. D-fenilglicinol (D-Phg-ol)  
45 700. 2-(2-piperidil)etanol  
701. 2-(4-piperidil)etanol  
702. 2-piperidilmetanol  
703. L-prolinol (Pro-ol)  
704. D-prolinol (D-Pro-ol)  
50 705. O-bencil-L-serinol (Ser(Bzl)-ol)  
706. O-t-butil-L-serinol (Ser(tBu)-ol)  
707. O-bencil-D-serinol (D-Ser(Bzl)-ol)  
708. O-t-butil-D-serinol (D-Ser(tBu)-ol)  
709. O-butil-L-treoninol (Thr(tBu)-ol)  
55 710. O-t-butil-D-treoninol (Thr(tBu)-ol)  
711. O-butil-D-treoninol (Thr(tBu)-ol)  
712. L-triptofanol (Trp-ol)  
713. D-triptofanol (D-Trp-ol)  
714. O-bencil-L-tirosinol (Tyr(Bzl)-ol)  
60 715. O-t-butil-L-tirosinol (Tyr(tBu)-ol)  
716. O-bencil-D-tirosinol (D-Tyr(Bzl)-ol)  
717. L-valinol (Val-ol)  
718. D-valinol (D-Val-ol)

65 **Otros**

720. Norleucina  
721. Etionina  
722. Ornitina  
5 723. ácido Thi-OH (-)-(R)-4-tiazolidincarboxílico  
724. éster trimetílico de 2-fosfonoglicina  
725. ácido iminodiacético  
726. ácido ((1)-2-aminoheptanedioico  
727. ácido ((1)-2-aminopimélico  
10 728. ácido 2-[2-(amino)etoxi]etoxi}acético  
729. ácido 8-(amino)-3,6-dioxaoctanoico  
730. ácido 1-azetidín-3-carboxílico  
731. ácido ((1R,4S)-(+)-4-(amino)-2-ciclopenteno-1-carboxílico  
732. cicloleucina  
15 733. homocicloleucina  
734. lactama de Freidinger  
735. ácido 1,2,3,4-tetrahidronorharman-3-carboxílico  
736. ácido 4-(aminometil)benzoico  
737. ácido 3-(aminometil)benzoico  
20 738. ácido 4-Abz-OH 4-(amino)benzoico  
739. ácido 3-Abz-OH 3-(amino)benzoico  
740. ácido 2-Abz-OH 2-(amino)benzoico  
741. ácido 2-(amino)isobutírico  
742. ácido 12-(amino)dodecanoico  
25 743. ácido 8-(amino)caprílico  
744. ácido 7-(amino)enántico  
745. ácido 6-(amino)caproico  
746. ácido 5-(amino)pentanoico  
747. ácido 4-(amino)butírico  
30 748. ácido N'-diaminoacético  
749. ácido L-2,3-diaminopropiónico  
750. ácido N-β-L-2,3-diaminopropiónico  
751. ácido ((R)-4-(amino)-3-(Z-amino)butírico  
752. ácido ((S)-4-(amino)-3-(Z-amino)butírico  
35 753. HCl de 1,6-hexanodiamina  
754. 1,5-pentanodiamina  
755. N-p-fenilendiamina  
756. N-1,4-butanodiamina  
757. N-1,3-propanodiamina  
40 758. N-etilendiamina  
759. N-N-metiletildiamina  
760. 1-piperazina  
761. 1-homopiperazina

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido inmunomodulador aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de VQLRIRVAVIRA (SEC ID N°: 2) o un péptido relacionado que tiene una secuencia de aminoácidos de LVRAIQVRAVIR (SEC ID N°: 1213), VQRWLIVWRIRK (SEC ID N°: 1214), IRWRIRVWVRRRI (SEC ID N°: 1222), IFWRRIVVKKF (SEC ID N°: 1224), VRLIVAVRIWRR (SEC ID N°: 1230), VRLRIRWWVLRK (SEC ID N°: 1232), VQWRIRVRVIKK (SEC ID N°: 1238) o KQFRIRVRVIRK (SEC ID N°: 12).
- 10 2. El péptido inmunomodulador aislado de la reivindicación 1, en el que el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos de VQLRIRVAVIRA (SEC ID N°: 2) o un péptido relacionado que consiste en una secuencia de aminoácidos de LVRAIQVRAVIR (SEC ID N°: 1213), VQRWLIVWRIRK (SEC ID N°: 1214), IRWRIRVWVRRRI (SEC ID N°: 1222), IFWRRIVVKKF (SEC ID N°: 1224), VRLIVAVRIWRR (SEC ID N°: 1230), VRLRIRWWVLRK (SEC ID N°: 1232), VQWRIRVRVIKK (SEC ID N°: 1238) o KQFRIRVRVIRK (SEC ID N°: 12).
- 15 3. Un polinucleótido aislado que codifica un péptido según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
4. Una composición farmacéutica que comprende un péptido inmunomodulador aislado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 20 5. Un péptido inmunomodulador aislado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso en terapia.
6. Un péptido inmunomodulador aislado según la reivindicación 5, para su uso en un procedimiento para tratar o prevenir inflamación o una respuesta séptica.
- 25 7. Un péptido inmunomodulador aislado según la reivindicación 6, para el uso de la reivindicación 6, en el que el péptido inhibe la expresión de un gen o molécula proinflamatoria.
8. Un péptido inmunomodulador aislado según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, para el uso de esa reivindicación, en el que el péptido inhibe la expresión de TNF- $\alpha$ .
- 30 9. Un péptido inmunomodulador aislado según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para el uso de esa reivindicación, en el que la respuesta inflamatoria se induce por un microbio o un ligando microbiano que actúa sobre un receptor similar a Toll.
- 35 10. Un péptido inmunomodulador aislado según la reivindicación 9, para el uso de esa reivindicación, en el que el ligando microbiano es una endotoxina o lipopolisacárido bacteriano.

40

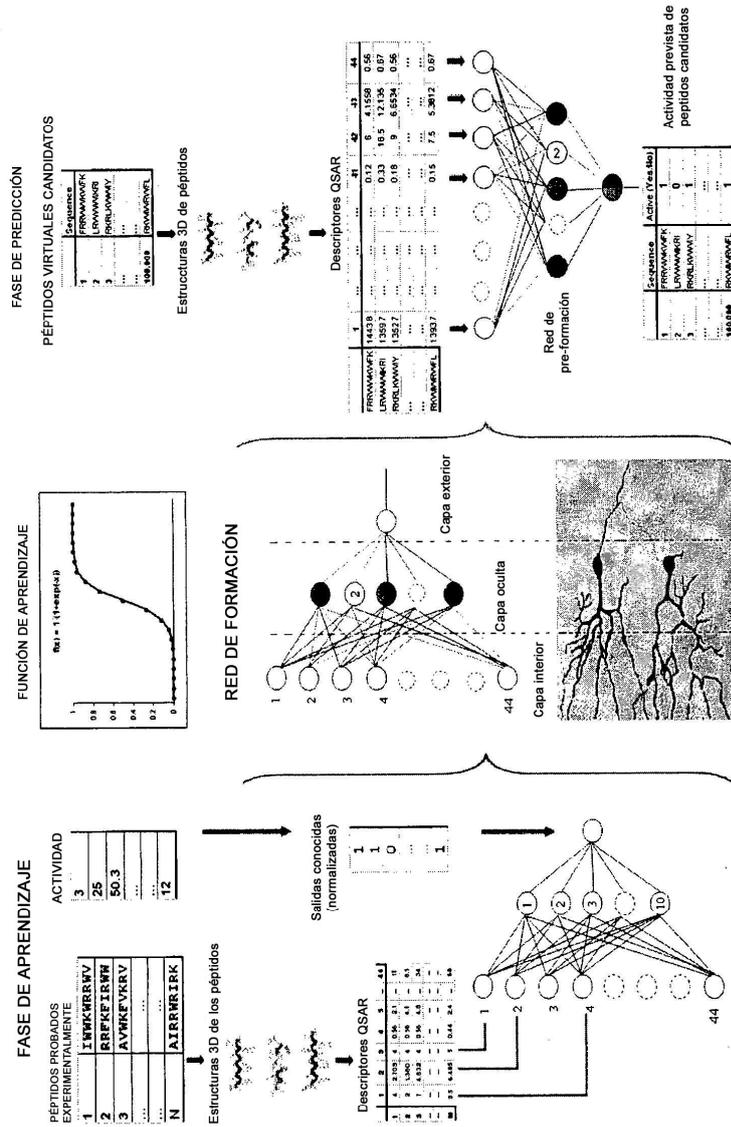
45

50

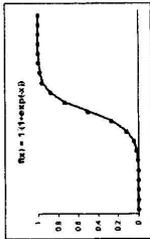
55

60

65



FUNCIÓN DE APRENDIZAJE



RED DE FORMACIÓN

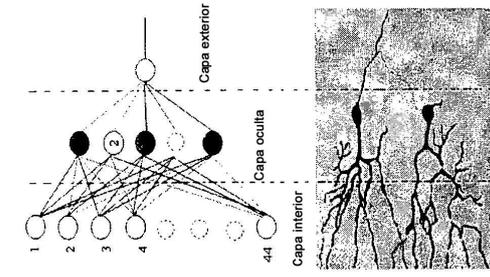


FIGURA 1

2A		Actividad de los Péptidos con determinado Aminoácido sustituido																		
Aminoácidos originales		A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
1	V	0.9	2.0	2.2	1.1	1.0	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	1.2	1.2	1.0	1.1	1.2	1.2	1.0	1.3	1.2
2	R	1.5	5.8	5.6	1.1	1.6	1.2	1.5	0.9	1.3	1.9	1.4	1.9	1.2	1.0	1.2	1.3	1.3	1.5	1.2
3	L	1.2	2.3	3.2	0.8	1.7	1.7	1.0	1.1	1.0	1.0	1.8	2.1	2.2	1.0	1.7	1.5	1.1	0.6	1.0
4	R	2.2	6	1*	1	2.5	3.2	1.4	2.3	0.9	2.1	2.0	1.6	1	1.5	1.0	1.8	1.7	2.1	1.8
5	I	3.0	2	1	1	1	1	1	1	1	1.2	1.2	1	1	1	1	1	0.9	0.8	1.4
6	R	9.3	6.4	1	1	5.9	2.6	1.1	0.9	9.3	10	1.8	1	3.3	1.0	3.3	3.3	5.5	6.1	5.1
7	V	2.1	1	1	1	4.7	4.2	0.8	4.3	1.0	1.6	1	1	4.6	1.8	4.4	2.8	1.0	1.2	1.9
8	A	1.0	2.1	2.8	0.9	0.9	0.6	1.0	0.6	1.1	1.0	0.8	2.4	0.8	0.6	0.8	1.1	1.1	1.2	0.8
9	V	1.5	3.7	4.3	1.1	2.5	2.2	1.0	1.4	1.2	0.8	1.9	3.4	2.5	1.1	1.6	1.4	1.0	0.9	1.0
10	I	0.9	1.7	1.3	1.0	0.8	0.9	1.0	0.9	0.9	1.0	1.2	1.6	0.9	0.8	1.8	1.0	0.9	1.1	0.9
11	R	1.8	1	1	2.5	1.9	1.2	2.7	0.9	2.6	3.1	2.2	1.5	2.8	1.0	2.4	2.5	3.5	4.7	2.3
12	A	1.0	2.1	1.5	1.0	0.9	0.8	1.5	0.4	1.3	1.1	0.7	1.0	1.6	0.7	0.9	0.6	0.9	1.1	1.0

FIGURA 2A

2B.		SEQ ID NOS de péptidos con determinado aminoácido sustituido																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Aminoácido original	A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
1	V	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
2	R	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288
3	L	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306
4	R	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324
5	I	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342
6	R	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
7	V	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378
8	A	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396
9	V	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414
10	I	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432
11	R	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
12	A	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468

FIGURA 2B

3A. Amino ácidos originales		Actividad de los péptidos con determinados aminoácidos sustituidos																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y		
I	1.05	1.06	0.93	0.73	0.92	1.01	1.00	0.93	0.90	1.12	0.93	0.98	0.96	1.09	1.51	0.89	1.19	1.46	0.83	
L	0.92	4.06	2.68	0.76	0.78	0.72	0.71	0.42	1.00	0.85	1.79	0.60	1.27	0.74	1.73	1.60	1.51	2.42	1.33	
P	1.12	6.04	5.14	1.97	0.87	0.65	0.82	0.47	0.91	0.80	0.64	1.00	0.81	0.50	0.62	1.07	0.98	2.67	1.83	
W	1.85	I*	I*	1.05	2.00	1.65	1.01	0.55	0.89	1.21	1.56	1.38	1.54	0.45	1.45	1.25	1.81	1.00	1.75	
K	I*	I*	I*	I*	I*	I*	I*	1.00	I*	I*	2.49	I*	2.86	1.04	I*	3.22	I*	I*	I*	
W	1.08	I*	4.78	0.51	0.98	0.83	0.69	0.51	0.60	1.07	1.03	1.33	2.13	0.51	1.16	1.39	1.08	1.00	0.91	
P	1.27	2.22	3.27	2.17	1.22	0.74	1.43	0.51	0.83	1.47	1.23	1.00	1.37	0.42	0.84	0.62	1.05	1.32	1.36	
W	1.22	8.59	3.19	1.09	1.31	1.26	1.65	0.54	2.10	1.58	1.39	1.68	1.51	0.54	1.18	1.32	1.50	1.00	1.35	
W	1.29	I*	5.14	0.87	1.64	1.33	1.18	0.57	1.02	1.04	1.52	1.23	1.59	0.54	1.66	1.45	1.02	1.00	1.01	
P	1.14	4.11	I*	0.91	1.65	0.99	0.55	0.32	1.06	1.54	1.37	1.00	1.24	0.44	1.45	1.18	0.86	1.70	1.52	
W	1.49	I*	I*	1.06	1.47	1.17	1.94	0.49	1.59	1.34	1.25	0.91	1.23	0.57	1.08	1.04	1.47	1.00	0.77	
R	6.41	2.78	I*	3.15	I*	I*	1.00	I*	I*	I*	I*	I*								
R	I*	I*	I*	I*	I*	I*	1.79	0.52	5.44	I*	I*	I*	I*	1.00	I*	2.40	2.57	2.84	I*	

FIGURA 3A

3B. Amino ácidos originales	SEQ ID NOS de peptidos con determinados aminoácidos sustituidos																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
I	19	32	45	58	71	84	97	109	121	133	146	159	169	182	193	206	219	232	240
L	20	33	46	59	72	85	97	110	97	134	147	160	170	183	194	207	220	233	241
P	21	34	47	60	73	86	98	111	122	135	148	97	171	184	195	208	221	234	242
W	22	35	48	61	74	87	99	112	123	136	149	161	172	185	196	209	222	97	243
K	23	36	49	62	75	88	100	97	124	137	150	162	173	186	197	210	223	235	244
W	24	37	50	63	76	89	101	113	125	138	151	163	174	187	198	211	224	97	245
P	25	38	51	64	77	90	102	114	126	139	152	97	175	188	199	212	225	236	246
W	26	39	52	65	78	91	103	115	127	140	153	164	176	189	200	213	226	97	247
W	27	40	53	66	79	92	104	116	128	141	154	165	177	190	201	214	227	97	248
P	28	41	54	67	80	93	105	117	129	142	155	97	178	191	202	215	228	237	249
W	29	42	55	68	81	94	106	118	130	143	156	166	179	192	203	216	229	97	250
R	30	43	56	69	82	95	107	119	131	144	157	167	180	97	204	217	230	238	251
R	31	44	57	70	83	96	108	120	132	145	158	168	181	97	205	218	231	239	252

FIGURA 3B

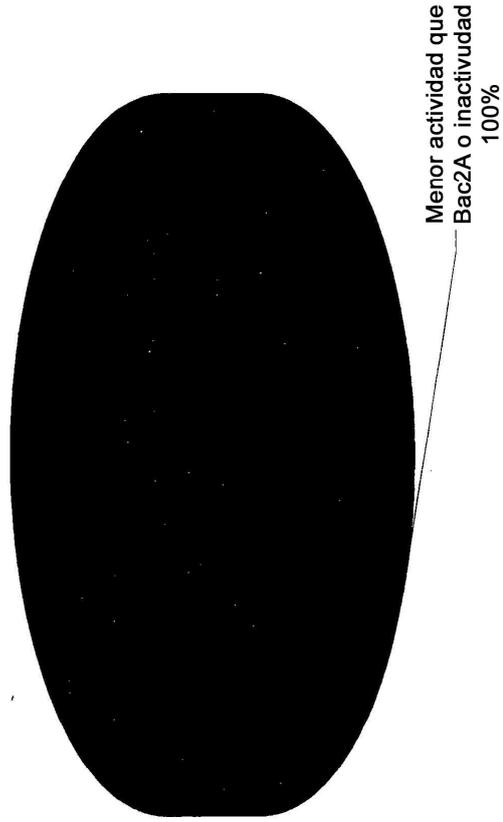


FIGURA 4

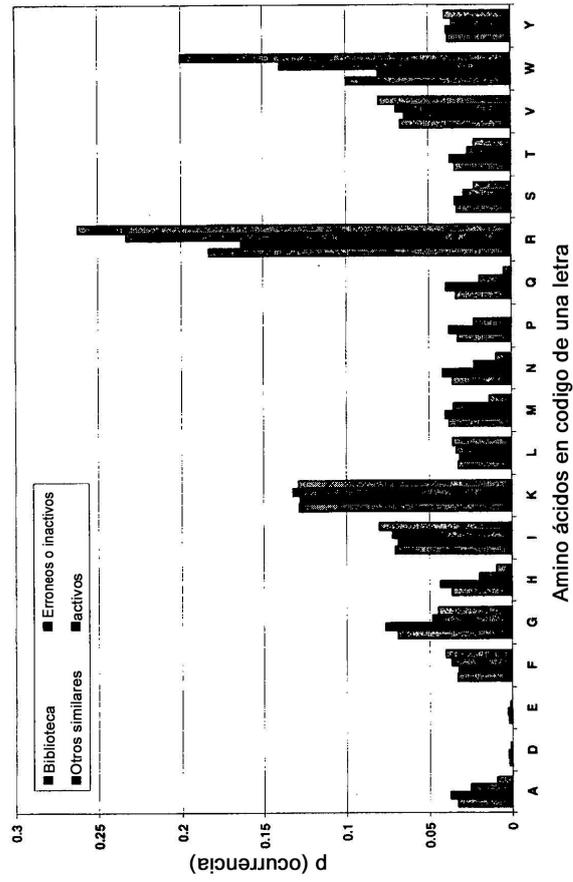


FIGURA 5

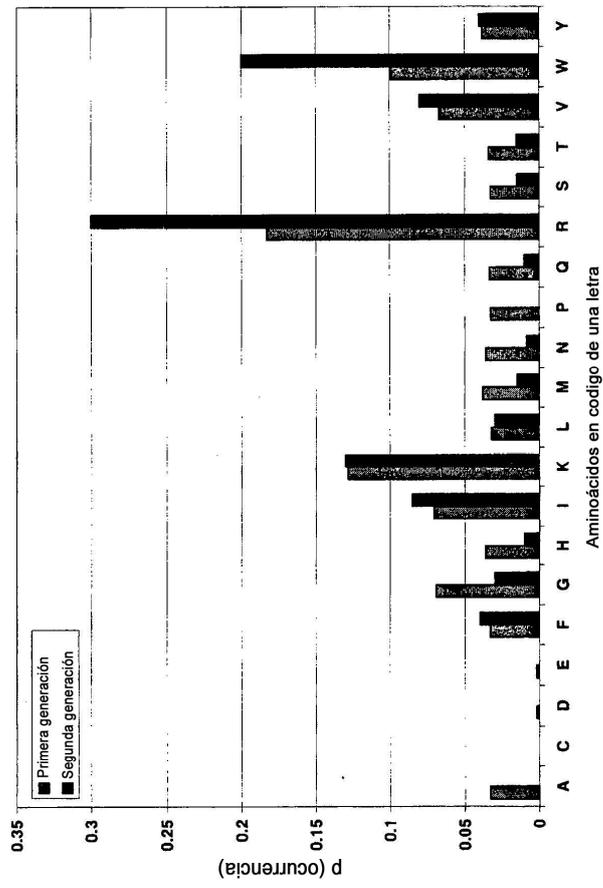


FIGURA 6

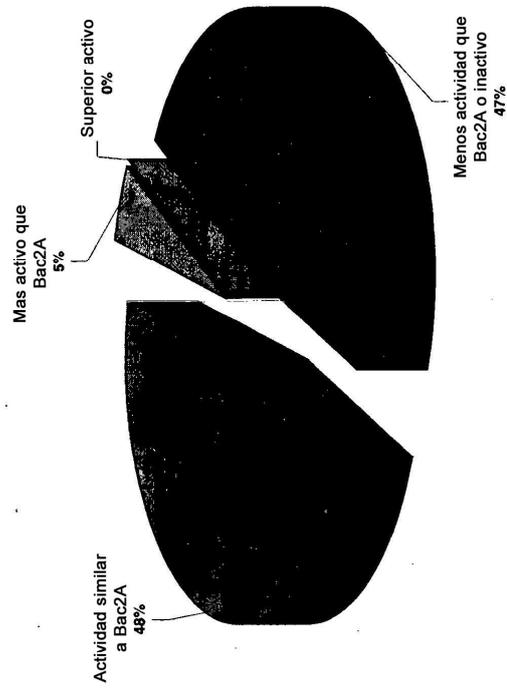


FIGURA 7

$$RS_{j \rightarrow G} = R_j^2 \sum_{i \neq j}^{N-1} \frac{1}{r_{j-i}^2} \quad (1)$$

$$RS_{G \rightarrow j} = \sum_{i < G, i \neq j}^n \frac{R_i^2}{r_{i-j}^2} \quad (2)$$

$$\sigma_{j \rightarrow G}^* = \sum_{i \neq j, i \in G}^n \frac{(\chi_j^0 - \chi_i^0) R_j^2}{r_{j-i}^2}$$

$$\sigma_{G \rightarrow j}^* = \sum_{i < G, i \neq j}^n \frac{(\chi_i^0 - \chi_j^0) R_i^2}{r_{i-j}^2} \quad (3)$$

$$\chi_{G \rightarrow j}^0 = \frac{\sum_{i \neq j, i \in G}^n \chi_i^0 (R_i^2 + R_j^2)}{\sum_{i \neq j, i \in G}^n \frac{R_i^2 + R_j^2}{r_{i-j}^2}}$$

$$\Delta N_j = Q_j + \sum_{i \neq j}^{N-1} \frac{(\chi_j - \chi_i)(R_j^2 + R_i^2)}{r_{j-i}^2} \quad (4)$$

$$\Delta N_j = Q_j + \sum_{i \neq j}^{N-1} \frac{(\chi_j - \chi_i)(R_j^2 + R_i^2)}{r_{j-i}^2} \quad (5)$$

( $Q_j$  - carga formal del átomo j)

$$\eta_j = \frac{1}{2 \sum_{j \neq i}^{N-1} \frac{R_j^2 + R_i^2}{r_{j-i}^2}}$$

$$\eta_{MOL} = \frac{1}{S_{MOL}} = \frac{1}{2 \sum_{j \neq i}^{N-1} \frac{R_j^2 + R_i^2}{r_{j-i}^2}} \quad (6)$$

$$S_j = 2 \sum_{j \neq i}^{N-1} \frac{R_j^2 + R_i^2}{r_{j-i}^2}$$

$$S_{MOL} = \sum_{j \neq i}^{N-1} \sum_{j \neq i}^{N-1} \frac{R_j^2 + R_i^2}{r_{j-i}^2} \quad (7)$$

FIGURA 8

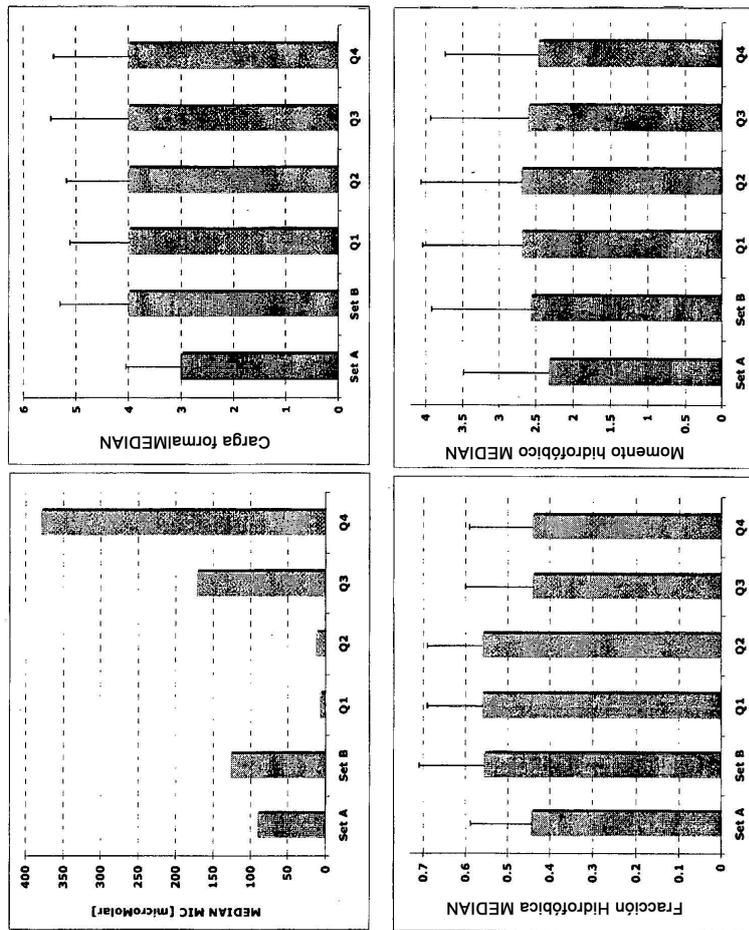


FIGURA 9



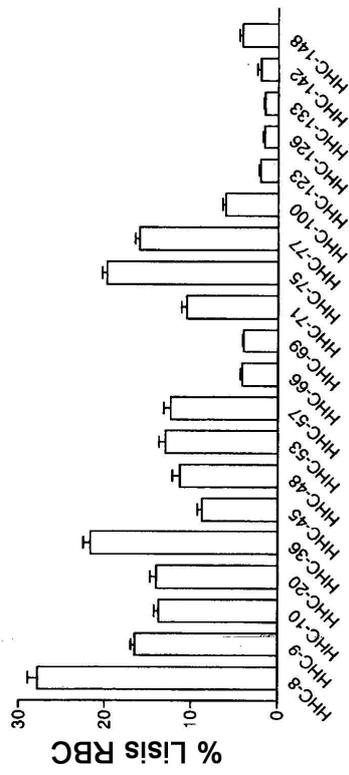


FIGURA 11

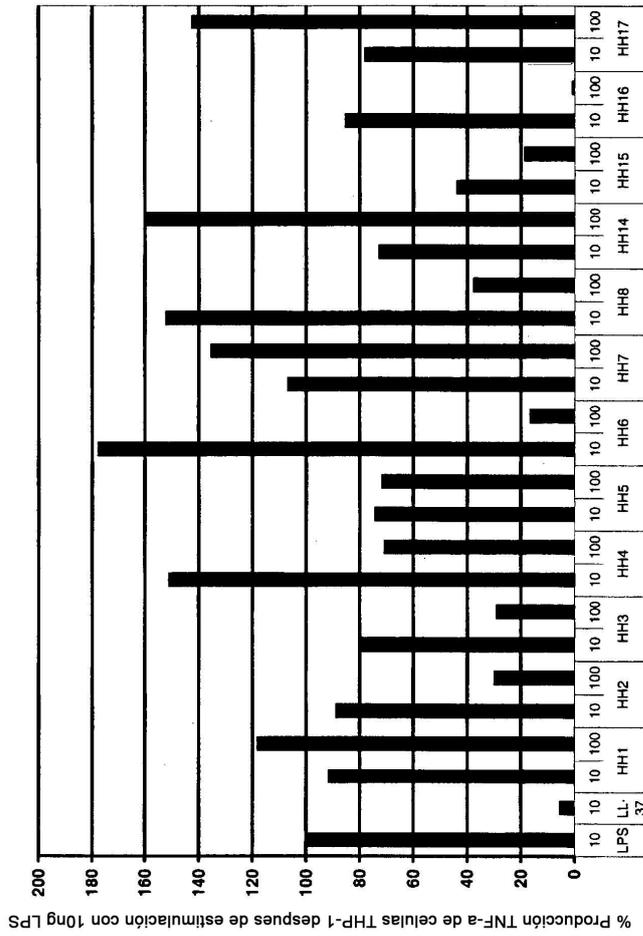


FIGURA 12



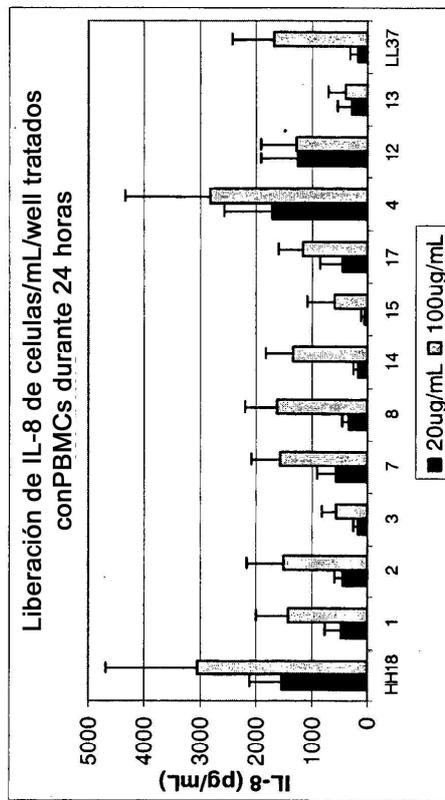


FIGURA 14

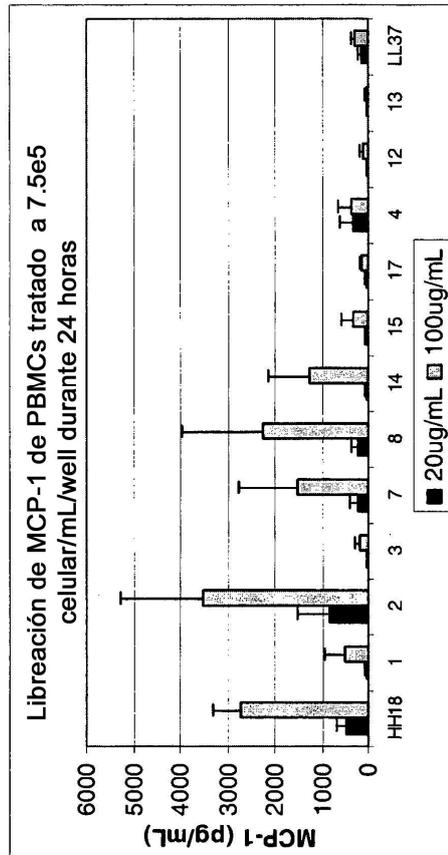


FIGURA 15

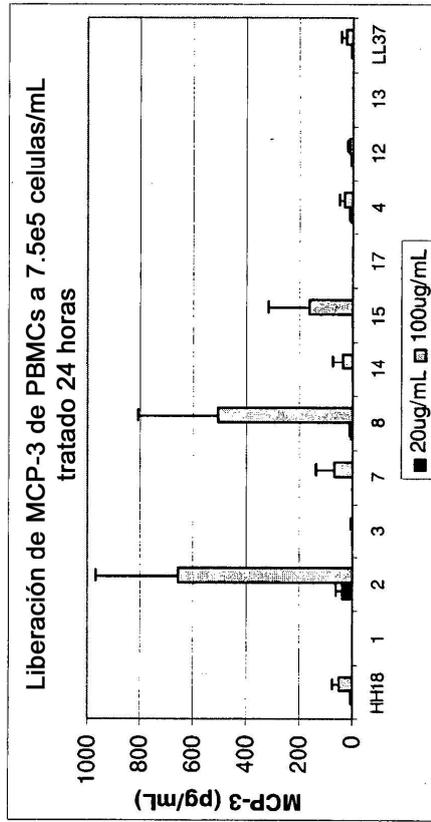


FIGURA 16

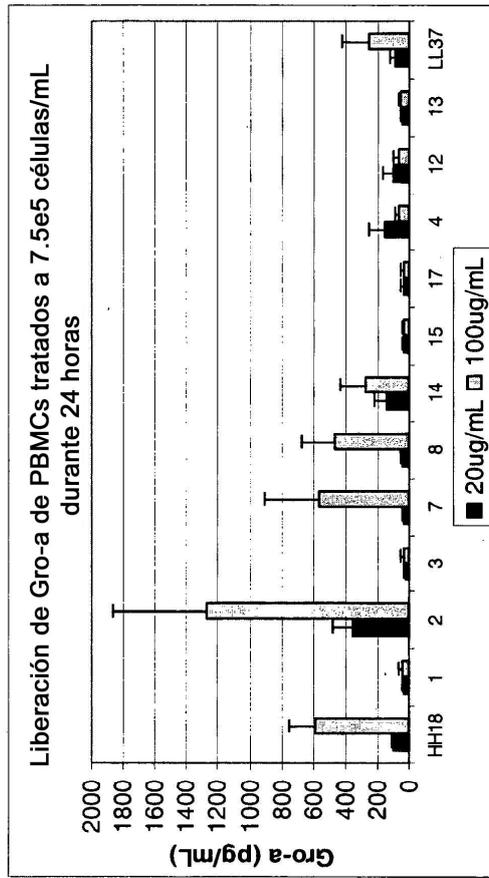


FIGURA 17

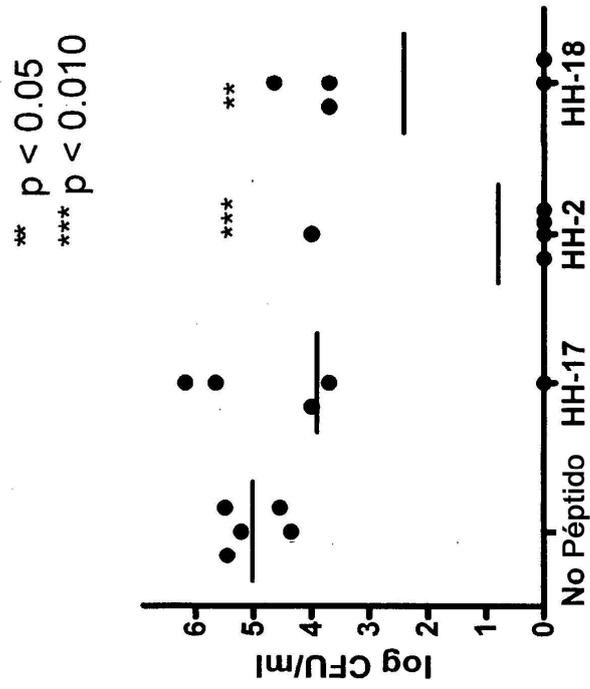


FIGURA 18



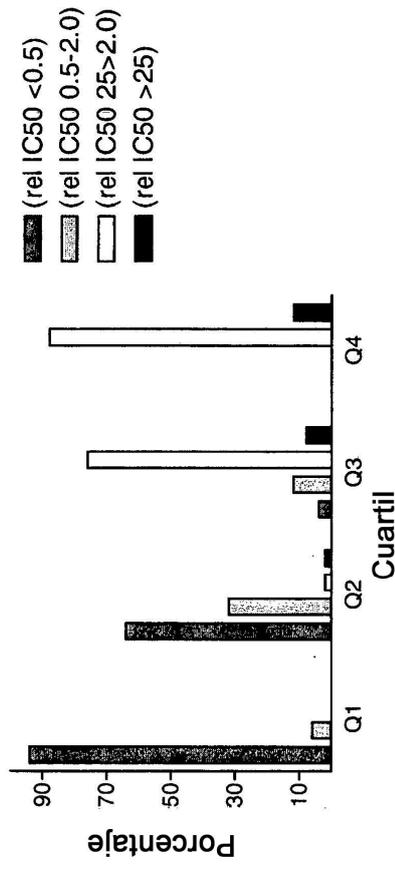


FIGURA 20